



**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



NATALIA ARAÚJO PEREIRA DE BRITO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
MUCOADESIVOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA O
TRATAMENTO DE CÂNCER COLÔNICO**

Araraquara – SP

2017

NATALIA ARAÚJO PEREIRA DE BRITO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
MUCOADESIVOS COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA O
TRATAMENTO DE CÂNCER COLÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do Grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Palmira Daflon Gremião

Co-orientadora: Valéria Maria de Oliveira Cardoso

Araraquara – SP

2017

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Nazaré e Sebastião, por todo amor e apoio
que sempre me deram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir estudar em uma das melhores universidades do país, visto que o caminho para chegar até aqui não foi fácil.

Agradeço imensamente aos meus pais, Nazaré e Sebastião, por sempre me incentivarem a avançar nos estudos e por não medirem esforços para que eu pudesse de fato avançar, além de todo amor e apoio que sempre me deram, principalmente durante os anos de faculdade. Também aos meus irmãos, Valmir e Thiago, que sempre estiveram ao meu lado.

À minha orientadora Prof. Dr. Maria Palmira Daflon Gremião, por me conceder a honra de ser sua aluna de iniciação científica.

À minha co-orientadora Valéria Maria de Oliveira Cardoso, por cada incentivo, conversa, paciência, conselho e auxílio dado durante toda a concretização desse projeto.

À mestranda Fernanda Isadora Boni, por todo auxílio que me foi dado durante a realização desse trabalho e também durante os anos de faculdade.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacotécnica, que de alguma maneira também contribuíram para a execução desse projeto.

Às meninas da República Periferia (minha segunda família durante todo o período em Araraquara) e aos meus amigos de faculdade, pessoas que tive a honra de conhecer e compartilhar histórias incríveis ao longo de todo o período acadêmico.

Ao CNPq por todo o apoio financeiro com a bolsa de iniciação científica concedida para o projeto.

*“A confiança em si mesmo é o primeiro
segredo do sucesso.”*

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados baseados em polissacarídeos naturais a partir da complexação polieletrólítica (CP) constitui uma estratégia racional para a liberação cólon-específica de fármacos. Neste trabalho, foram obtidas nanopartículas (NPs) baseadas em goma gelana (GG) e quitosana (QS), contendo o antibiótico polimixina B (PB). Inicialmente, foram avaliadas as melhores proporções poliméricas e a influência da ordem de adição dos polímeros (GG e QS) para obtenção das NPs. Os sistemas formados apresentaram elevados valores de potencial zeta (PZ) (entre 24,37 mV – 41,23 mV), indicando sua estabilidade física. Foi verificado que a adição da GG à dispersão de QS levou a formação de partículas menores (entre 575,30 nm – 974,60 nm), enquanto que a adição de QS à dispersão de GG formou partículas maiores (entre 1.762,33 nm – 27.673,33 nm). Dessa maneira, foram selecionadas para incorporação da PB as amostras obtidas com a adição de GG à dispersão de QS. Após a incorporação da PB, as NPs apresentaram diâmetro médio na faixa de 471,25 nm – 1.255,85 nm e valores positivos de PZ (entre 35,14 mV – 38,93 mV). A análise por meio da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) evidenciou a formação de NPs, através das possíveis interações entre os grupos funcionais -OH, -COOH e -NH₂ dos polieletrólitos. As características estruturais dos sistemas foram avaliadas por DRX e os dados indicaram a formação de estruturas mais organizadas e com maior grau de cristalinidade. A análise por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) evidenciou a formação de partículas em escala nanométrica, com formas regulares, esféricas e de superfície aparentemente lisa. A capacidade mucoadesiva dos sistemas foi demonstrada por meio de ensaio de mucoadesão *ex vivo*, indicando sua capacidade de permanecer em um maior intervalo de tempo em contato com a mucosa intestinal.

Palavras-chave: Complexação polieletrólítica, nanopartículas poliméricas, mucoadesão, cólon-específico.

ABSTRACT

The development of nanostructured systems based on natural polysaccharides from polyelectrolyte complexation (PC) is a rational strategy for the colon-specific drug release. In this work, nanoparticles (NPs) based on the gellan gum (GG) and chitosan (QS), containing the antibiotic polymyxin B (PB) were obtained. Initially, the best polymer ratios and the influence of the order addition of the polymers (GG and QS) to obtain the NPs were evaluated. The formed systems showed high values of zeta potential (ZP) (between 24.37 mV - 41.23 mV), indicating their physical stability. It was found the GG addition to the QS dispersion led to the formation of smaller particles (between 575.30 nm - 974.60 nm), whereas the addition of QS to the GG dispersion formed larger particles (between 1,762.33 nm - 27,673.33 nm). In this way, were selected for incorporation of PB the samples obtained with the addition of GG to the dispersion of QS. After incorporation, the NPs presented mean diameter in the range of 471,25 nm - 1,255,85 nm and positive values of PZ (between 35,14 mV - 38,93 mV). The analysis by infrared spectroscopy (IR) evidenced the formation of NPs through the possible interactions between the functional groups -OH, -COOH and -NH₂ of the polyelectrolytes. The structural characteristics of systems was evaluated by X-ray diffraction (XRD) in the data indicated the formation of more organized structures with a higher degree of crystallinity. The high resolution scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed the existence of nanometric scale particles, with regular, spherical and apparently smooth surfaces. The mucoadhesive capacity of the systems was demonstrated by *ex vivo* mucoadhesion assay, demonstrating the ability of the system to remain longer in contact with the intestinal mucosa.

Keywords: Polyelectrolyte complex, polymer nanoparticles, mucoadhesion, colon-specific.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 O cólon.....	16
2.2 Sistemas de liberação cólon-específica	17
2.3 Nanopartículas poliméricas (NPs) e a complexação polieletrólítica (CP).....	18
2.4 Polímeros Naturais.....	20
2.4.1 Goma gelana	21
2.4.2 Quitosana	22
2.5 Polimixina B.....	23
3. OBJETIVO	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Principais materiais utilizados	25
4.2 Principais equipamentos	25
5. MÉTODOS	26
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	26
5.1.1 Análise do potencial zeta em função do pH	26
5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	27
5.2.1 Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas	27
5.2.2 Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI)	28
5.2.3 Análise do potencial zeta	28
5.2.4 Análise por espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR).....	29
5.2.5 Análise por meio de difração de raios-X	29
5.2.6 Análise de forma e morfologia de superfície por microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução	29
5.2.7 Avaliação das propriedades mucoadesivas	30

5.2.8	Análise estatística	30
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS	31
6.1.1	Análise do potencial zeta em função do pH	31
6.2	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	33
6.2.1	Estudo da influência da ordem de adição e proporção polimérica na formação dos complexos polieletrólíticos	33
6.2.2	Obtenção das nanopartículas poliméricas contendo polimixina B	37
6.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	39
6.3.1	Análise das nanopartículas por espectroscopia na região de infravermelho (IV).....	39
6.3.2	Análise das nanopartículas por meio da difração de raios-X	41
6.3.3	Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de alta resolução.....	47
6.3.4	Avaliação das propriedades mucoadesivas das nanopartículas obtidas .	50
7	CONCLUSÃO.....	53
8	REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Anatomia do cólon.....	16
Figura 2 - Representação esquemática do processo de complexação polieletrólítica.....	19
Figura 3 - Estrutura da goma gelana desacetilada.....	21
Figura 4 - Representação do processo de desacetilação da quitina e formação da quitosana.....	22
Figura 5 – Estrutura primária da polimixina B: R=H refere-se à polimixina B1 e R=CH ₃ à polimixina B2.....	24
Figura 6 - Representação esquemática do processo de titulação ácido-base dos polímeros para análise do potencial zeta em função do pH.....	27
Figura 7 - Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas poliméricas.....	28
Figura 8 - Valor da carga superficial de cada polímero e do fármaco em diferentes faixas de pH.....	31
Figura 9 - Influência da incorporação da PB no tamanho e PZ das nanopartículas.....	38
Figura 10 – Espectros de IV da polimixina B, quitosana, goma gelana e nanopartículas com e sem polimixina B.....	40
Figura 11 – Difratoograma de raios-X da polimixina B, goma gelana e quitosana; respectivamente.....	43
Figura 12 – Difratoogramas de raios-X das nanopartículas sem polimixina B.....	44
Figura 13 – Difratoograma de raios-X das nanopartículas com a polimixina B (1% e 3%).....	45

Figura 14 – Fotomicrografias das amostras NP3 sem PB (A e B), NP3 com 1% de PB (C e D) e NP3 com 3% de PB (E e F), ambas nos aumentos de 25.000 e 50.000x, respectivamente.....48

Figura 15 – Fotomicrografias das amostras NP4 sem PB (G e H), NP4 com 1% de PB (I e J) e NP4 com 3% de PB (K e L), ambas nos aumentos de 25.000 e 50.000x, respectivamente.....49

Figura 16 – Força máxima e trabalho de mucoadesão da goma gelana, quitosana, nanopartículas sem fármaco e das nanopartículas com fármaco incorporado a 1% e 3%.....51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Influência da variação de massa de GG no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando GG foi gotejada na dispersão de QS.....	34
Quadro 2 – Influência da variação de massa de QS no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando GG foi gotejada na dispersão de QS.....	35
Quadro 3 – Influência da variação de massa de GG no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando QS foi gotejada na dispersão de GG.....	36
Quadro 4 – Influência da variação de massa de QS no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando QS foi gotejada na dispersão de GG.....	37

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CP	Complexação polieletrólítica
NPs	Nanopartículas poliméricas
GG	Goma gelana
QS	Quitosana
PB	Polimixina B
PZ	Potencial zeta
IV	Infravermelho
DRX	Difração de raios-X
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
TGI	Trato gastrointestinal
IRA	Insuficiência renal aguda
PdI	Índice de polidispersidade
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
pKa	Constante de ionização
FM	Força máxima
TM	Trabalho de mucoadesão

1. INTRODUÇÃO

Sistemas para liberação sítio específica de fármacos tem sido um importante objeto de pesquisa, uma vez que oferecem inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais, como capacidade de manter os níveis plasmáticos, de maximizar a resposta terapêutica e minimizar os efeitos adversos, além de possibilitar a redução na frequência de administração e, conseqüentemente, melhorar a adesão do paciente ao tratamento (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; FREIRE, 2006; LYRA et al., 2007).

Características particulares do cólon como a elevada capacidade de absorção, pH mais próximo da neutralidade, tempo de trânsito prolongado e atividade enzimática reduzida, fazem desse órgão um ambiente interessante para vetorização de fármacos, quer de ação local ou sistêmica (CHOURASIA; JAIN, 2003; LIU et al., 2003; SINHA; KUMRIA, 2003).

Sistemas nanoestruturados podem oferecer inúmeras vantagens em relação à vetorização de fármacos. Seu reduzido tamanho pode contribuir para a proteção do fármaco contra a degradação enzimática, permitir o controle das taxas de liberação do fármaco, possibilitar o prolongamento do tempo de residência do fármaco no local de ação/absorção, contribuindo para o gradiente de concentração local e, conseqüentemente, melhorando a eficácia da terapia (HUA et al., 2015). Além disso, esses sistemas têm sido muito explorados para a liberação de fármacos, principalmente aqueles que apresentam problemas de estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e/ou permeabilidade nas porções superiores do trato gastrointestinal (TGI) (FREIRE et al., 2006).

O uso de polissacarídeos naturais, bem como suas misturas para a obtenção de sistemas nanoestruturados, visando à liberação cólon-específica de fármacos, tem sido alvo de estudos em nosso grupo de pesquisa. Esses materiais oferecem uma série de vantagens, como baixa toxicidade e, principalmente, a possibilidade de serem obtidos em abundância a partir de fontes renováveis. Além disso, suas propriedades podem ser moduladas de acordo com as necessidades específicas (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; BHARDWAJ et al., 2000; KULKARNI et al., 2011; SINHA; KUMRIA, 2001).

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo natural aniônico amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas cólon-específicos de fármacos

(AGNIHOTRI; JAWALKAR; AMINABHAVI, 2006; BABU et al., 2010; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; PATIL et al., 2006; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; RAJINIKANTH; MISHRA, 2007). Suas reconhecidas propriedades mucoadesivas agregam importantes vantagens aos sistemas, pois são capazes de interagir com a mucina, presente no muco, e estabelecer um contato mais íntimo com a membrana mucosa (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005). Além disso, a GG é um material seletivamente degradado pelas enzimas produzidas pela microbiota colônica.

A quitosana (QS) é um polissacarídeo catiônico que possui ampla aplicabilidade na área de liberação de fármacos e sua obtenção se dá a partir da reação de desacetilação parcial do polímero natural (quitina) extraído de exoesqueleto de crustáceos e insetos. Facilmente dissolvida em soluções de ácidos fracos diluídos, como ácido acético, devido à protonação dos grupos aminos, a QS possui propriedades físico-químicas importantes, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, capacidade mucoadesiva e permeabilidade. Além disso, a elevada densidade de carga positiva da QS confere ao polímero uma boa capacidade mucoadesiva, pois permite que ela interaja com grupos carregados negativamente presentes no muco (AMIDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

As características acima citadas fazem desses polímeros materiais interessantes e promissores no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados destinados a liberação de fármacos. Além disso, as propriedades mucoadesivas que esses materiais apresentam podem agregar importantes vantagens aos sistemas de liberação controlada de fármacos, pois são capazes de prolongar o tempo de residência e estabelecer um contato mais íntimo com a membrana mucosa e, assim, melhorar a permeabilidade e absorção do fármaco (CARDOSO, 2014; HÄGERSTRÖM, 2003; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010).

A polimixina B (PB), um antibiótico polipeptídico catiônico, é bastante conhecido por sua potencial atividade bactericida contra bactérias gram-negativas. Seu mecanismo de ação é caracterizado pelo aumento da permeabilidade na membrana da bactéria quando, através de interações eletrostáticas, estabelecem ligações com as moléculas de lipopolissacarídeos aniônicos presentes nessa membrana celular. Ao estabelecer essa interação, a PB promove uma perturbação

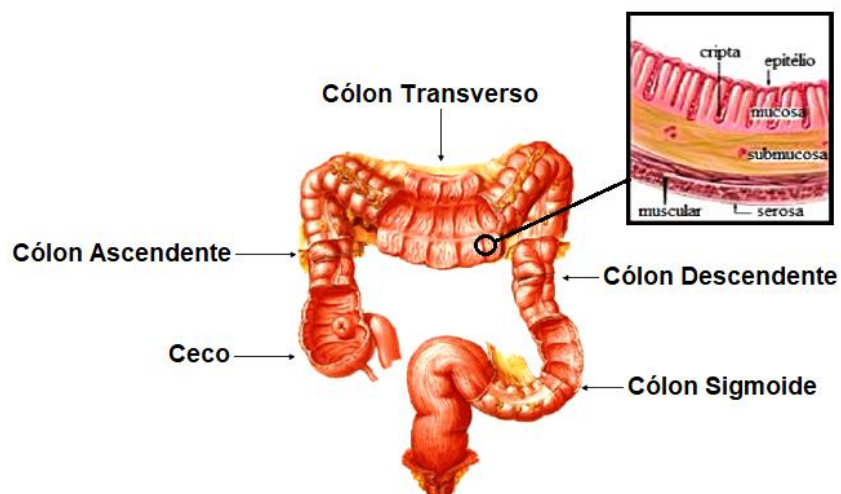
da membrana deslocando os íons (estabilizadores da membrana), o que, conseqüentemente, leva a perda do conteúdo interno da célula, desencadeando a morte celular (KWA et al., 2008). A sua elevada solubilidade em água, bem como sua reconhecida toxicidade, fazem desse fármaco potencial candidato para ser veiculado em sistemas de liberação oral de fármacos, uma vez que muitos efeitos colaterais indesejáveis podem ser evitados. Assim, neste estudo a PB foi utilizada como fármaco modelo a ser incorporado nos nanosistemas a base de GG e QS.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O cólon

O cólon (Figura 1), ou intestino grosso, é dividido em **ceco** (região que se une ao intestino delgado, no qual se localiza o apêndice vermiforme), **cólon ascendente** (localizado na região inferior e a direita do abdômen, que ascende em direção ao fígado), **cólon transverso** (ao lado direito do abdômen e que se estende até o lado esquerdo, em direção ao baço), **cólon descendente** (porção que se posiciona ao lado esquerdo do abdômen no sentido descendente) e **cólon sigmoide** (ligado ao reto e com formato de um “S”) (FADDA; BASIT, 2005; RUSSO; TURNER, 2004).

Figura 1 – Anatomia do cólon.



Fonte: Adaptado de NETTER, Frank H.. Atlas de Anatomia Humana. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000 e do site Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology. Acessado em: 10/08/2017.

O cólon possui pH na faixa de 6-7, cerca de 1,5 metros de comprimento, 6,5 centímetros de diâmetro (FREIRE et al., 2006) e sua parede é constituída por quatro camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa, sendo essa última formada por um epitélio cilíndrico simples, que possui criptas contendo células caliciformes e enterócitos, capazes de realizar o processo de absorção de líquidos (RUSSO; TURNER, 2004; FREIRE et al., 2006) e a secreção de muco (PEDREIRO, 2015).

O muco é uma camada de gel viscoelástica composta por água (95%), lipídeos, sais inorgânicos e glicoproteínas, que reveste a mucosa do cólon e garante sua proteção e lubrificação. A principal glicoproteína do muco é a mucina, negativamente carregada devido as terminações de ácido siálico, ácido sulfônico ou L-frutose de suas cadeias laterais (GANDHI e ROBINSON, 1994; KHANVILKAR et al., 2001; PEREZVILAR e HILL, 2004; SALAMAT-MILLER et al., 2005). A espessura do muco pode aumentar ou diminuir sob a ação de dietas e determinadas patologias intestinais. Além disso, parte do muco é constantemente removida devido a passagem do bolo fecal (CARVALHO et al., 2014; PEDREIRO, 2015).

A microbiota do cólon é composta de 400 a 1000 espécies diferentes de bactérias, sendo a maioria anaeróbica estrita, responsáveis pela produção de diversas enzimas com atividades redutoras e hidrolíticas, envolvidas nos processos de fermentação de polissacarídeos e proteínas. As funções realizadas pelo cólon compreendem a absorção de água, nutrientes e eletrólitos, secreção de muco para lubrificação, proteção da parede intestinal e a formação do bolo fecal (BASIT, 2005; BEDANI & ROSSI, 2009; FREIRE et al., 2006).

O tempo de trânsito no cólon é de cerca de 22-36 horas, podendo aumentar ou diminuir dependendo de vários fatores como dietas ricas em fibras, stress, determinados medicamentos, o gênero dos indivíduos e presença de certas patologias (FREIRE et al., 2006).

Por apresentar um maior tempo de trânsito, pH aproximadamente neutro e menor atividade enzimática, o cólon demonstra ser um órgão muito interessante para absorção de fármacos, já que permite o maior tempo de residência do fármaco em um ambiente menos agressivo, melhorando a absorção e, conseqüentemente, sua eficácia (FREIRE et al., 2006; FRIEND, 2005).

2.2 Sistemas de liberação cólon-específica

O principal propósito dos sistemas de vetorização de fármacos é restringir a presença do fármaco apenas no órgão ou tecido alvo, podendo também controlar a quantidade e/ou a velocidade de liberação desse fármaco no local. Assim, esses sistemas são capazes de minimizar a ocorrência de efeitos colaterais locais, além de promover a liberação seletiva do fármaco, diminuindo o surgimento de efeitos adversos (LYRA et al., 2007; SANTUS & BAKER, 2003; TORCHILIN, 2000; VILLANOVA et al., 2010).

Visto que o desafio de vetorizar fármacos para a região do cólon é grande, o sucesso na obtenção de sistemas cólon-específicos baseia-se na capacidade de proteger o fármaco contra a degradação nas porções superiores do TGI, seja pelo ambiente ácido do estômago e/ou por ação de enzimas digestivas, já que tal situação poderia resultar na baixa biodisponibilidade e distribuição do fármaco para os órgãos vizinhos, contribuindo para o aparecimento de efeitos adversos (BASIT, 2005; PINTO, 2010; HUNTER et al., 2012; GAMBOA & LEONG, 2013).

Assim, sistemas nanoestruturados a base de polímeros biodegradáveis mucoadesivos, como GG e QS, representam uma importante ferramenta tecnológica para se alcançar a liberação cólon-específica de fármacos, além de agregar importantes vantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas quando comparadas aos sistemas convencionais.

2.3 Nanopartículas poliméricas (NPs) e a complexação polieletrólítica (CP)

As NPs são sistemas carreadores de fármacos cujo o diâmetro é inferior a 1 μm e que podem ser desenvolvidos utilizando-se polímeros sintéticos ou naturais, (SCHAFFAZICK et al., 2003). Podem ser divididos em nanocápsulas e nanoesferas, sendo as nanocápsulas sistemas reservatórios constituídos por um núcleo oleoso e um revestimento polimérico, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídas por uma matriz polimérica. Em ambos, o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no interior ou na matriz polimérica, ou ainda adsorvido à superfície da sua estrutura (SCHAFFAZICK et al., 2003; WU et al., 2008).

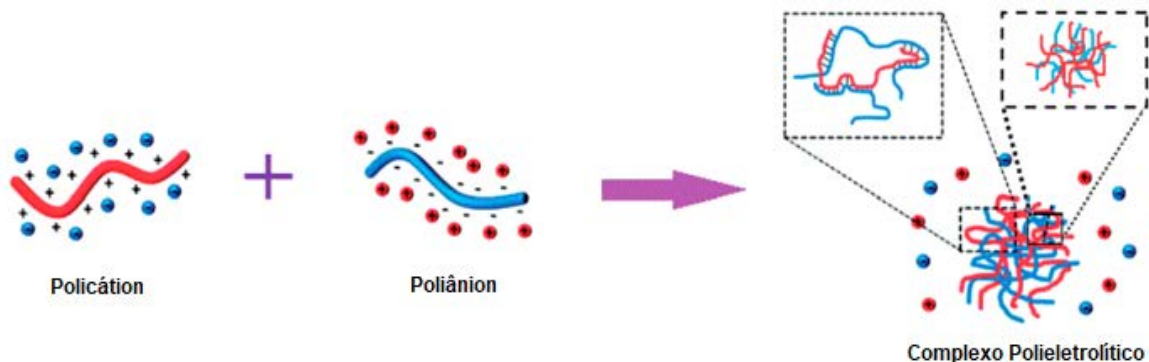
No cólon, as reduzidas dimensões dos nanocarreadores contribuem para uma melhor difusão através do muco, permitindo uma maior absorção do fármaco pelo

epitélio do intestino e, conseqüentemente, melhorando a biodisponibilidade (KUMARI et al., 2010).

Atualmente, existem vários métodos para obtenção de NPs, no entanto, cada um deles influencia diretamente em características como tamanho, forma, biocompatibilidade e toxicidade (MANMODE et al., 2009). Dentre as técnicas empregadas para obtenção de NPs está a CP, uma técnica bastante utilizada devido a rapidez para execução, possibilidade de ser realizada em temperatura ambiente e sob agitação moderada, além de ser capaz de minimizar danos ao fármaco, pois não requer condições agressivas durante a obtenção dos sistemas (LANKALAPALLI & KOLAPALLI, 2009; MAKHLOF et al., 2011).

A CP baseia-se na complexação entre polieletrólitos de cargas opostas (Figura 2), presentes em meio aquoso, devido a existência de interações eletrostáticas. Tais interações podem também ocorrer a partir de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (LEE et al., 1997; MAKHLOF et al., 2011).

Figura 2 - Representação esquemática do processo de complexação polieletrólítica.



Fonte: Adaptado de A. D. KULKARNI et al., 2016.

Durante a realização da CP, é de fundamental importância determinar o pH do meio em que se pretende obter os sistemas, além de adequar a concentração e a ordem de adição dos polímeros a serem utilizados, pois são fatores que influenciam diretamente em parâmetros como tamanho e estabilidade das NPs (BERGER et al., 2004; FUKUDA & KIKUCHI, 1978; HAMMAN, 2010; LEE et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1990).

Desta maneira, a realização da CP utilizando os polímeros naturais GG e QS constitui uma plataforma tecnológica promissora para obtenção de sistemas

nanoestruturados, já que esses polímeros apresentam grupos funcionais -OH, -COOH e -NH₂ capazes de formar ligações cruzadas entre suas cadeias (AMIDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; OSMALEK; FROELICH & TASARE, 2014).

2.4 Polímeros Naturais

O uso de polissacarídeos naturais, como QS e GG, no preparo das NPs é uma abordagem racional e promissora em razão das vantagens que esses materiais oferecem, como baixo custo, biocompatibilidade, atoxicidade e capacidade de aderir às mucosas quando em ambiente fisiológico. Além disso, esses materiais são biodegradáveis e obtidos a partir de fontes renováveis (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; BHARDWAJ et al., 2000; KULKARNI et al., 2011; SEVERINO, P. et al., 2011; SINHA; KUMRIA, 2001; VILLANOVA, J.C.O. et al., 2010).

O uso de polissacarídeos naturais isolados ou misturas poliméricas para a obtenção de sistemas mucoadesivos, visando à liberação cólon-específica de fármacos, tem sido objeto de estudos em nosso grupo de pesquisa. Cardoso e colaboradores (2016), em estudos com hidrogéis de GG reticulada ionicamente com amido retrogradado, demonstraram a capacidade dos materiais em formar estruturas tridimensionais fortes, estáveis, altamente resistentes e muito promissoras como sistemas mucoadesivos para entrega de fármacos.

Boni e colaboradores (2015), utilizando-se da técnica de gelificação ionotrópica, com íons trivalentes (Al³⁺), como agente de reticulação, obtiveram microesferas de GG e demonstraram a capacidade mucoadesiva dos sistemas, que também foram capazes de controlar a liberação de cetoprofeno em meio ácido e alcalino. Da mesma maneira, através da geleificação ionotrópica utilizando íons Al³⁺, Prezotti e colaboradores (2014) desenvolveram micropartículas de gelana/pectina altamente mucoadesivas, os quais foram capazes de controlar as taxas de liberação de fármacos ao longo de todo o TGI.

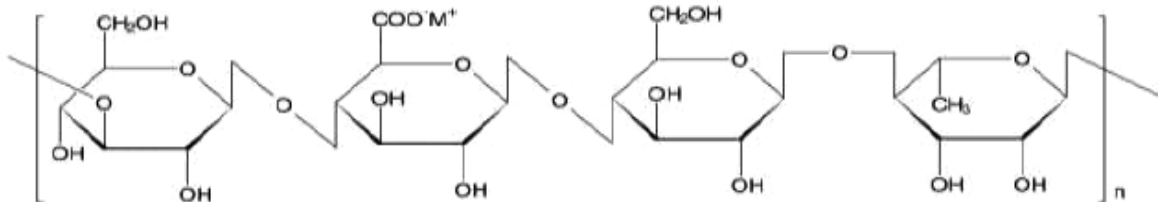
Em estudos com dispersões sólidas e NPs baseadas em QS e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose para vetorização da zidovudina, Pedreiro (2015) observou que, através do método de CP, os complexos obtidos foram promissores no sentido de promover o maior controle das taxas de liberação e o aumento da biodisponibilidade da zidovudina.

2.4.1 Goma gelana

A GG é um polissacarídeo aniônico de cadeia linear, constituído por unidades repetidas dos tetrassacarídeos α -L-ramnose, β -D-glicose e β -D-ácido glucurônico na proporção molar de 1:2:1 e que apresenta dois tipos de substituintes acila em sua estrutura: L- gliceril na posição 6 e L-acetil na posição 2 (OSMALEK; FROELICH & TASARE, 2014; VILELA, 2014).

Obtida por fonte natural, a GG é produzida pela bactéria *Sphingomonas elodea* e comercializada na sua forma desacetilada, onde, por meio de hidrólise alcalina, acaba perdendo seus substituintes L- gliceril e L-acetil, sendo então denominada de GG de baixo grau de acetilação (Figura 3), caracterizada pelo seu elevado poder gelificante (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013; OSMALEK; FROELICH & TASARE, 2014; PICONE, 2012; VILELA, 2014).

Figura 3 - Estrutura da goma gelana desacetilada.



Fonte: Adaptado de MAO; TANG; SWANSON, 2000.

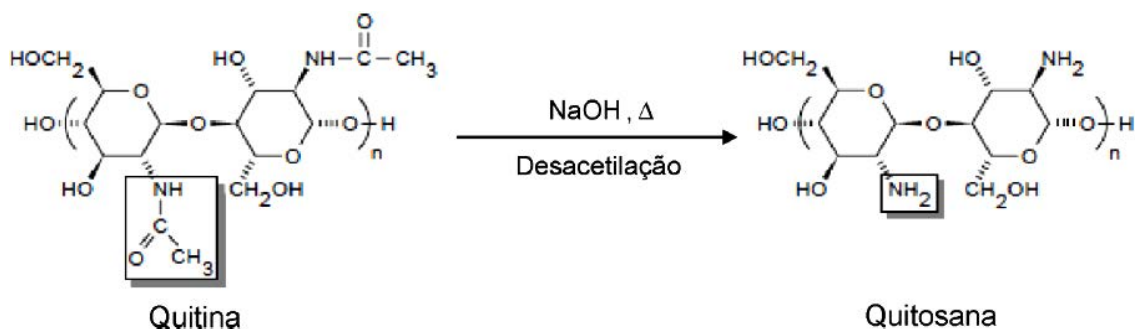
A solução aquosa de GG apresenta um pH em torno de 5,0. Sobre elevada temperatura, suas cadeias apresentam-se em um estado desordenado (cadeia simples) e na conformação enovelada. A medida que essa solução vai se resfriando, as cadeias de GG vão mudando sua conformação para um estado mais ordenado (duplas-hélices), que se agregam formando zonas de junção e dão origem a hidrogéis termorreversíveis. Na presença de cátions mono, di ou trivalentes, as duplas-hélices da GG se complexam por meio de ligações de hidrogênio, formando uma rede tridimensional. Tal característica faz da GG um material interessante para o desenvolvimento de diversos tipos de sistemas de liberação controlada de fármacos (CHANDRASEKARAN et al., 1998; KIRCHMAJER et al., 2014; MIYOSHI et al., 1996; VILELA, 2014).

A GG possui uma constante de ionização (pKa) próximo a 3,5, resistência a baixos valores de pH e elevada capacidade de retenção de água, o que favorece o intumescimento de suas cadeias e permite a sua interação com as cadeias de mucina presentes no muco, levando ao processo de mucoadesão. Essa interação pode ocorrer devido ao entrelaçamento das cadeias poliméricas com as cadeias da mucina, ou ainda devido a habilidade dos grupos hidroxila e carbonila da GG formarem ligações de hidrogênio com as moléculas da mucina, promovendo um contato mais íntimo com a mucosa, o que, conseqüentemente, prolonga o tempo de residência na mucosa (BONI, 2014; OSMALEK; FROELICH & TASARE, 2014; PICONE, 2012; PREZOTTI; CURY & EVANGELISTA, 2014).

2.4.2 Quitosana

A QS é um polissacarídeo catiônico obtido pelo processo de desacetilação parcial da quitina (Figura 4), abundantemente extraída do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Possui estrutura linear rígida, estéreo-regular e com volumosos anéis de piranose, sendo semelhante a celulose. É constituída por unidades de 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose, unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (AZEVEDO et al., 2007; DASH et al., 2011; FARRIS et al., 2011).

Figura 4 - Representação do processo de desacetilação da quitina e formação da quitosana.



Fonte: PICONE, 2012.

Possuindo um valor de pKa entre 6,2-7, a QS apresenta três grupos funcionais reativos: um grupo amino na posição C-2, grupos hidroxilas primários na posição C-3 e grupos hidroxilas secundários nas posições e C-6; capazes de formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (CLAESSON & NINHAM, 1992; SEVERINO,

P. et al., 2011; SHAHIDI et al., 1999; YAO et al., 1997). É facilmente dissolvida em soluções de ácidos fracos diluídos, como ácido acético, devido à protonação de seus grupos aminos (FARRIS et al., 2011; SEVERINO, P. et al., 2011; SHAHIDI et al., 1999; VILELA, 2014).

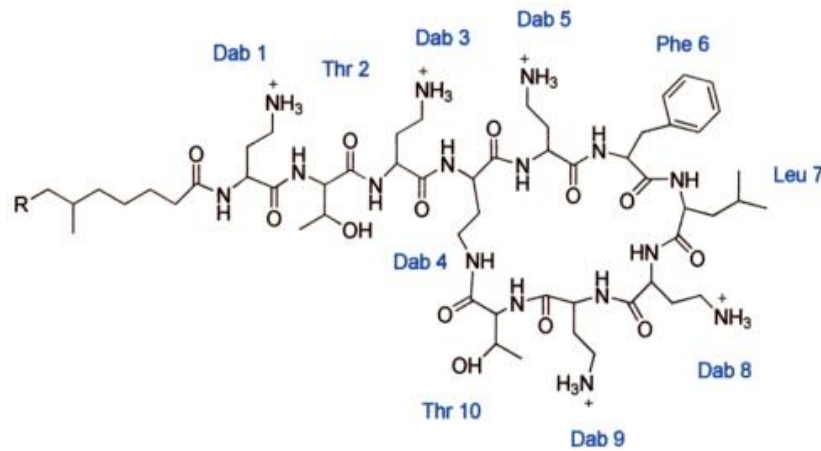
A QS é um polímero que possui elevada capacidade mucoadesiva devido a presença de grupos hidroxila e amina em sua estrutura, os quais são capazes de estabelecer interações supramoleculares com as cadeias de mucina e prolongar o seu tempo de residência na mucosa. A habilidade mucoadesiva da QS é reconhecida e faz dela um material interessante para uso em sistemas de liberação controlada de fármacos (AMIDI et al., 2010; DA SILVA et al., 2007; DEACON et al., 2000; EDSMAN e HAGERSTROM, 2005; FIEBRIG et al., 1995; LEE et al., 2000; HE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2010; VASIR et al., 2003).

Assim, a complexação da QS com um polissacarídeo aniônico, como a GG, é uma abordagem interessante para desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, pois tal combinação é capaz de gerar sistemas com maior resistência à exposição ao pH ácido e a degradação enzimática nas porções superiores do TGI, que contribui para o controle das taxas de liberação do fármaco (GEORGE & ABRAHAM, 2006; HUGUET et al., 1996; SEZER & AKBUGA, 1999; VLLASALIU et al., 2010).

2.5 Polimixina B

A PB é um antibiótico decapeptídeo policatiônico cíclico, caracterizado pela presença de um anel heptapeptídeo ligado a uma cadeia lateral tripeptídica com um ácido graxo na sua extremidade (Figura 5) (KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009; MEREDITH et al. 2009). Pode apresentar até quatro isômeros, diferentes entre si apenas pelo ácido graxo da extremidade da molécula: a presença do ácido 6-metiloctanóico identifica a PB1 (isômero principal), o ácido 6-metilheptanóico a PB2, o ácido octanóico a PB3 e o ácido heptanóico a PB4 (HERMES, 2013). Possui um pKa em torno de 8 – 9, sendo sintetizada por cepas de *Bacillus polymyxa* e comercialmente encontrada na forma de pó liofilizado para solução injetável, como sulfato de polimixina B (KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009).

Figura 5 – Estrutura primária da polimixina B: R=H refere-se à polimixina B1 e R=CH3 à polimixina B2.



Fonte: MEREDITH et al. 2009.

O mecanismo de ação da PB baseia-se na formação de ligações com componentes do envelope celular de bactérias gram-negativas (fosfolipídeos e lipopolissacarídeos - LPS), promovendo deslocamento dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , o que leva a ruptura da membrana celular, resultando na morte da bactéria (KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009; MEREDITH et al. 2009). Em indivíduos normais, a PB possui uma meia-vida de 6 – 7 horas e sua secreção ocorre lentamente por filtração glomerular (KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009).

No entanto, a PB é conhecida principalmente devido a sua alta toxicidade, que parece estar relacionada a quantidade de D-aminoácidos e de ácidos graxos presentes na molécula, além de ser dependente da concentração e do tempo de exposição ao fármaco (INSUA et al., 2017; KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009).

A PB é capaz de causar nefrotoxicidade, a partir do mesmo mecanismo que utiliza para destruir bactérias gram-negativas (MENDES & BURDMANN, 2009), caracterizada principalmente pelo surgimento da insuficiência renal aguda (IRA), manifestação de albuminúria (presença de albumina na urina), cilindrúria (presença de cilindros renais na urina), azotemia (presença de ureia no sangue) e do aumento dos níveis plasmáticos do fármaco sem aumento na dosagem, que, conseqüentemente, acaba levando ao surgimento da neurotoxicidade, caracterizada pela ocorrência de rubor facial, vertigem, sonolência, formigamento, apneia (pausa

na respiração), ataxia (perda da coordenação) e irritações nas meninges (FALAGAS & KASIAKOU, 2006; KWA et al., 2008; MENDES & BURDMANN, 2009).

Considerando todas as limitações da administração convencional da PB, relativo aos seus efeitos colaterais, a necessidade de explorar novas tecnologias farmacêuticas, como a nanotecnologia, que permitam o direcionamento sítio-específico da PB é uma estratégia racional que pode ser intensamente explorada, abrindo portas para criação de alternativas para o tratamento de diversos tipos de doenças como, por exemplo, o câncer de cólon.

3. OBJETIVO

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas, a base de GG e QS, através da CP, para liberação cólon-específica do fármaco.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Principais materiais utilizados

- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich®);
- Goma gelana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich®);
- Ácido clorídrico, teor 37% (Quimis);
- Ácido acético P.A (Quimis);
- Hidróxido de sódio (Grupo Química®);
- Mucina tipo II (SigmaAldrich®);
- Polimixina B (Sigma®);
- Tween 20 (Sigma®).

4.2 Principais equipamentos

- Agitador magnético (Quimis);
- Analisador de tamanho e potencial zeta das partículas ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments) acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator;
- Analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro System®);

- Balança analítica (Owa labor; Bel Engineering);
- Centrífuga (Sorvall TC);
- Ultracentrífuga (ThermoScientific);
- Peagômetro (Micronal);
- Equipamento de difração de raios-X (DRX) (SIEMENS);
- Espectrômetro de absorção na região do infravermelho por transformações de Fourier utilizando-se acessório para reflexão atenuada total (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy – ATR) da VERTEX 70 (BRUKER);
- Liofilizador micromódulo (Thermo Scientific TM) acoplado a uma bomba de vácuo.

5. MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

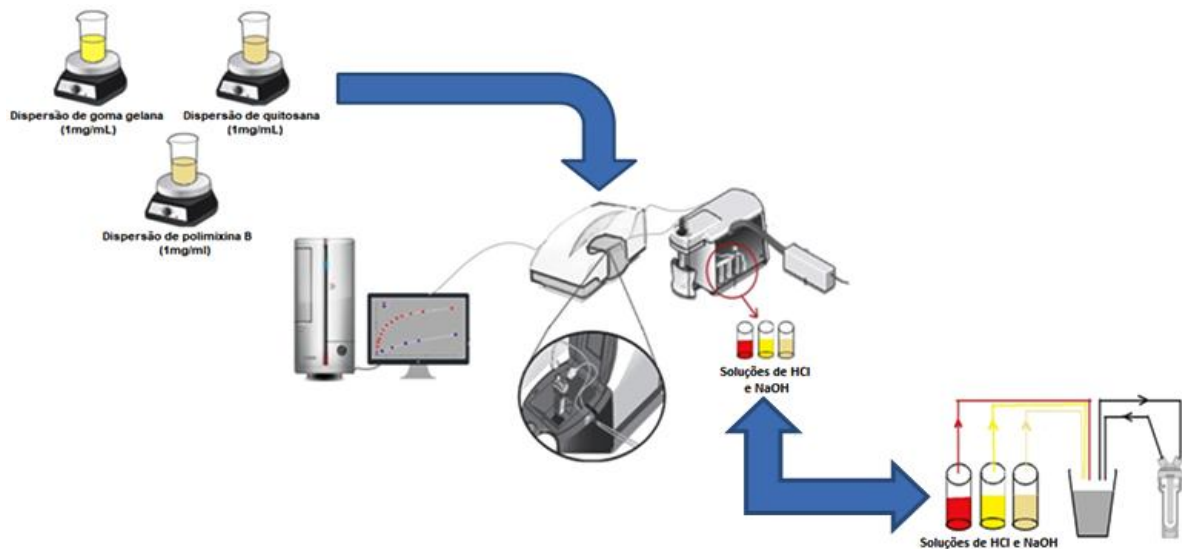
5.1.1 Análise do potencial zeta em função do pH

Para avaliar a influência do pH na carga superficial dos polímeros isolados com a finalidade de determinar o melhor valor de pH para obtenção de complexos polieletrólíticos, foi utilizado o analisador de partículas Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments) com ângulo de detecção de 90°, equipado com um Autotitulado MPT-2 (Multi Purpose Titrator) (Figura 6).

O estudo foi realizado seguindo o modelo de Smoluchowski a uma temperatura de 25 ° C e as medidas de potencial zeta (PZ) das dispersões poliméricas foram realizadas através da titulação ácido-base. Para titulação da GG e da PB, foram preparadas uma solução (1 mg/mL) em água purificada e titulada com NaOH 0,01 M e 0,2 M e HCl 0,1 M. Já para as medidas de PZ da QS, foi preparada uma solução (1 mg/mL) em ácido acético 0,1 M e titulada com NaOH 0,05 M e 0,1 M e HCl 0,2 M.

Neste estudo, a faixa de pH avaliada foi de 1,5 a 7,5 com intervalos de 0,7, e uma tolerância requerida de 0,2. Todas as medidas e as curvas foram realizadas em triplicata.

Figura 6 - Representação esquemática do processo de titulação ácido-base dos polímeros para análise do potencial zeta em função do pH.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1 Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas

Uma solução estoque de QS (4,5 mg/mL) em ácido acético 0,1 M foi preparada e mantida sob agitação magnética por 24 horas (overnight) a temperatura ambiente (~25 °C). A partir dela, foi obtida uma dispersão de QS (1,5 mg/mL), também em ácido acético 0,1 M. A dispersão de GG (1,0 mg/mL) foi obtida em água purificada, sob agitação magnética (30 min) a uma temperatura de 80 °C e filtrada com membrana 0,45 µm.

As NPs foram obtidas através da CP entre QS e GG, de acordo com o método proposto por Makhlof et al. (2011), com algumas adaptações. Para obtenção das nanopartículas, um estudo preliminar foi realizado a fim de avaliar a influência das proporções e da ordem de adição dos polímeros na formação dos complexos.

Assim, os sistemas foram obtidos a partir do gotejamento, com seringa e agulha sem bisel 23G 1" (0,6 x 25 mm), sob agitação em Ultra Turrax (11.000 rpm) por 5 minutos (Figura 7), para redução do tamanho das partículas. Esse processo foi

realizado através de duas técnicas: a) adição da dispersão de GG à dispersão a QS e b) adição da QS à dispersão de GG.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas poliméricas.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A incorporação do fármaco foi realizada a partir da adição da PB à dispersão de QS, nas concentrações de 1,0% e 3,0% em relação à massa total de polímeros.

5.2.2 Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl)

O diâmetro médio e o Pdl das nanopartículas em dispersão foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) no equipamento Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments), em triplicatas, com 10 determinações do diâmetro para cada uma delas.

5.2.3 Análise do potencial zeta

O PZ das dispersões de nanopartículas foi determinado, de forma indireta a partir da análise do movimento browniano das partículas, em analisador de

partículas Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Instruments), em triplicatas, com 10 determinações para cada uma delas.

5.2.4 Análise por espectroscopia de absorção na região de infravermelho (FTIR)

Para avaliar as possíveis interações entre o fármaco e os materiais poliméricos, foi realizado estudo em espectroscopia na região do infravermelho por transformações de Fourier, utilizando-se acessório para reflexão atenuada total (Attenuated Total Reflectance – ATR) da VERTEX 70 (BRUKER).

Neste estudo, foram analisados o fármaco, polímeros, nanopartículas sem e com fármaco. Para a análise, as amostras foram previamente congeladas a - 80°C por 24 horas e, em seguida, liofilizadas (24 horas). Os espectros foram obtidos abrangendo uma região de 400 a 4000 cm^{-1} .

5.2.5 Análise por meio de difração de raios-X

A identificação de estruturas cristalinas e/ou amorfas do fármaco, polímeros e das nanopartículas com ou sem fármaco foram avaliadas em difratômetro de raios-X (DRX), da marca Siemens, modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commander, a uma velocidade do goniômetro de 0,05° s⁻¹, sob radiação monocromática de Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) e com varredura de raios-X de ângulo aberto 2 θ entre 4° e 70°. Para realização do teste, as amostras foram previamente congeladas a - 80°C e liofilizadas por 24 horas.

5.2.6 Análise de forma e morfologia de superfície por microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução

A análise da forma e morfologia de superfície das nanopartículas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução (MEV-FEG) - *JEOL JSM-7500F*.

Para a realização da análise, as amostras, preparadas conforme o item 5.2.1, foram diluídas em dispersão aquosa de Tween 20 na proporção 1:20 para evitar

aglomeração após processo de secagem, e fixadas sobre substrato metálico. Em seguida, as amostras foram colocadas em dessecador para secagem por 3 dias. No momento da análise, as amostras foram revestidas com material condutor (carbono) e as fotomicrografias foram obtidas em diferentes aumentos.

5.2.7 Avaliação das propriedades mucoadesivas

A análise das propriedades mucoadesivas dos polímeros e das nanopartículas sem e com fármaco foi realizada em Analisador Universal de Textura (*TA-XT2 Texture Analyser – Stable Micro Systems*) no modo “compression”. Para a realização da análise, cada amostra foi congelada (- 80°C por 24 horas) e liofilizada (24 horas).

O ensaio foi realizado utilizando-se tecido intestinal suíno previamente congelado, o qual, no momento da análise, foi descongelado sob temperatura ambiente e mantido em solução salina, com o intuito de assegurar a qualidade e integridade da camada de muco (VARUM et al., 2010). Secções do tecido (aproximadamente 4 cm²) foram colocadas sobre um suporte acrílico e, em seguida, receberam 2 gotas de solução tampão fosfato 6,8.

Com auxílio de fita dupla-face, as amostras foram cuidadosamente fixadas em uma sonda cilíndrica metálica (10 mm), que foi movida perpendicularmente em direção à membrana mucosa, a uma velocidade constante de 1 mm/s, sob uma força de compressão pré-determinada de 0,981 N e introduzida a 0,3 mm de profundidade, a partir da superfície da mucosa. O tempo de contato foi de 120 segundos para pré-hidratação das nanopartículas, sem a aplicação de força durante esta fase. Após esse tempo, a sonda foi removida, a uma velocidade de 20 mm/s e a força máxima de mucoadesão (N) e o trabalho da mucoadesão (N.s) foram determinados para cada amostra em triplicata.

5.2.8 Análise estatística

Quando aplicável, as diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software *Origin 9.0*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

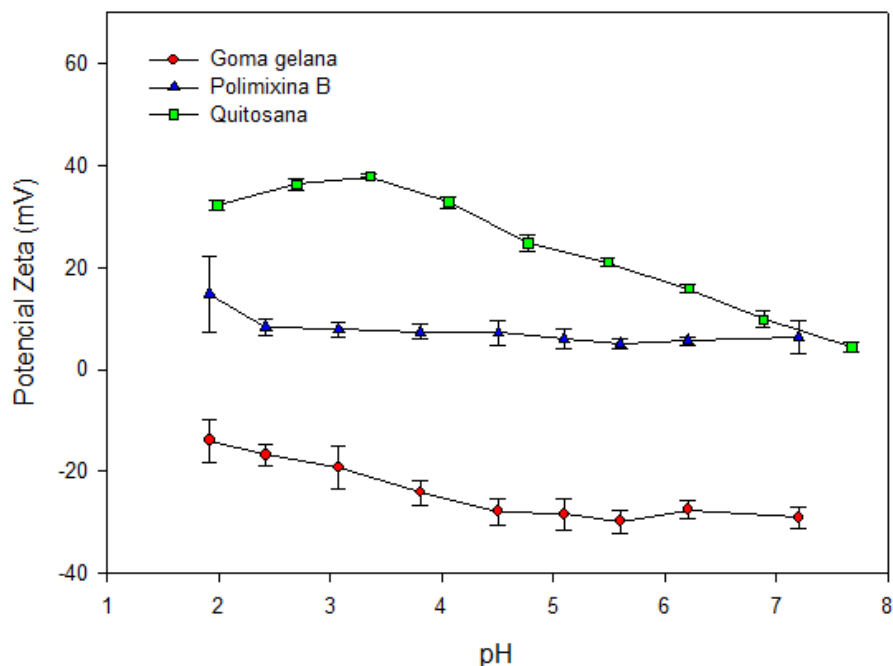
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

6.1.1 Análise do potencial zeta em função do pH

A formação dos complexos polieletrólíticos ocorre através de interações eletrostáticas entre polieletrólitos de cargas opostas. Trata-se de um processo rápido, que minimiza a degradação do fármaco e que pode ser realizado em meio aquoso, sob temperatura ambiente e utilizando agitação moderada (LANKALAPALLI & KOLAPALLI, 2009; MAKHLOF et al., 2011; PEDREIRO, 2015).

O pH é uma propriedade importante que pode influenciar na densidade de carga dos materiais poliméricos e resultar em sua precipitação. Nesse sentido, a adequação do pH para o delineamento de um sistema de liberação é uma estratégia racional para sucesso na obtenção dos complexos polieletrólíticos (LANKALAPALLI & KOLAPALLI, 2009). Dessa forma, neste estudo foi avaliado o PZ das dispersões poliméricas em função da variação do pH e os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Valor da carga superficial de cada polímero e do fármaco em diferentes faixas de pH.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

A QS permaneceu carregada positivamente durante toda faixa de pH estudada, devido a ionização dos grupos amino presentes na cadeia polimérica. Entre os valores de pH 2 à 5,0 a QS apresentou PZ entre + 37,8 mV e + 25 mV. Por outro lado, acima do pH 6,0 foi observado um decréscimo na densidade de carga, atingindo + 4,5 mV em pH 7,4. Provavelmente, essa redução da carga positiva da QS em baixos valores de pH está relacionado com a desprotonação dos grupamentos amino da QS à medida que o pH se aproxima do seu valor de pKa (6,2 – 7,0) (PICONE & CUNHA, 2013).

A GG apresentou-se carregada negativamente durante toda faixa de pH estudada, devido a ionização dos grupos carboxílicos presentes na sua estrutura. A semelhança da QS, dependendo do pKa e pH do meio, esses grupos carboxílicos podem estar mais ou menos ionizados. Assim, em baixos valores de pH, a GG apresentou um PZ de aproximadamente - 17 mV, enquanto, na faixa entre pH 4,5 a 7,2 a GG exibiu um PZ em torno de - 30 mV. Quando a GG é submetida a valores de pH acima de seu pKa, a sua densidade de carga negativa aumenta devido à dissociação dos grupos carboxílicos do ácido glucurônico (JONG; VAN DE VELDE, 2007; PICONE; CUNHA, 2013). Em contrapartida, em menores valores de pH, a dissociação ocorre nos grupos carboxílicos laterais das moléculas da GG, reduzindo seu caráter aniônico.

A PB apresentou um comportamento semelhante àquele observado para a QS, mantendo-se carregada positivamente durante toda faixa de pH estudada, também devido a ionização dos grupos amino presentes na sua estrutura. A PB exibiu PZ entre + 15 mV a + 7,62 mV em baixos valores de pH, entretanto, acima do pH 4,5 foi notado um decréscimo na sua densidade de carga, atingindo + 5,67 mV em pH 7,4. Provavelmente, essa redução da carga positiva da PB em baixos valores de pH também está relacionada com a desprotonação dos grupamentos amino da PB à medida que o pH se aproxima do seu valor de pKa (8 – 9).

Para a formação dos complexos polieletrólíticos, o maior grau de ionização dos polímeros é requerido. Nesse sentido, para obtenção das nanopartículas foi escolhido pH 5,0, pois neste valor de pH, tanto os polímeros quanto a PB (PZ +6 mV) apresentaram maior grau de ionização e, dessa forma, minimiza-se a ocorrência de agregação dos polímeros no momento da mistura das dispersões poliméricas, garantindo o sucesso na obtenção dos sistemas.

6.2 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.2.1 Estudo da influência da ordem de adição e proporção polimérica na formação dos complexos polieletrólíticos

Diversos fatores como grau de ionização, densidade de carga, concentração e distribuição de carga de cada polieletrólito, razão e ordem da mistura dos polímeros, flexibilidade das cadeias, temperatura, força iônica e pH do meio de reação podem influenciar de maneira significativa a formação e estabilidade dos complexos polieletrólíticos (HAMMAN, 2010; DASH et al., 2011). A escolha das melhores condições para obtenção dos sistemas é uma estratégia importante e racional para obtenção dos sistemas nanoparticulados.

A formação dos complexos polieletrólíticos pode acontecer em três etapas. Na primeira, ocorre a atração eletrostática entre os polieletrólitos de cargas opostas. Em seguida, em busca de uma adaptação conformacional, a partir de interações como ligações de hidrogênio, força de van der Waals e outras interações supramoleculares, os complexos formam os chamados complexos principais, uma espécie de núcleo. Por último, pode ocorrer a formação de complexos secundários ao redor desse núcleo resultando em um aumento do diâmetro das partículas (A. D. KULKARNI et al., 2016; SAETHER et al., 2008).

Neste estudo foram avaliados os fatores: ordem de adição dos polímeros e variação de massa polimérica. Inicialmente, a GG foi adicionada à dispersão de QS, variando a massa de GG (0,5 – 3,0 mg) e mantendo-se constante a de QS (4,5 mg). Em seguida, variou-se a massa de QS (0,75 - 4,5 mg) fixando a de GG (3,0 mg). Posteriormente, mesmo procedimento foi realizado, porém com adição da QS na dispersão de GG. A nomenclatura e composição das amostras estão apresentadas nos Quadros 1 e 2.

Em ambos os estudos foram avaliados tamanho de partícula, PDI, PZ e aparência macroscópica das dispersões, classificando-as como: solução límpida (L), levemente opalescente (LO), opalescente (O) ou agregado (A) (Quadros 1 e 2).

Durante o processo de obtenção dos complexos polieletrólíticos a partir da adição da GG, cuja massa foi variável, à dispersão de QS, observou-se que a formação dos complexos ocorreu de forma espontânea, sendo detectado pelo efeito Tyndal de turvação do meio. Verificou-se também que a adição de maior

concentração de GG à dispersão de QS tornou o meio mais opalescente, indicando a formação dos complexos.

Os dados estatísticos mostraram que, de maneira geral, não houve diferença significativa no tamanho das partículas entre as amostras do Quadro 1 ($p > 0,05$), exceto para a amostra NP6 que apresentou maior diâmetro médio (975,60 nm), maior Pdl (0,77) e maior PZ (+41,23 mV) ($p < 0,05$). Provavelmente, as maiores concentrações de ambos os polímeros resultaram na formação de partículas maiores, devido ao maior número de cadeias poliméricas disponíveis para complexação. Apesar da elevada carga positiva dessa amostra ser uma característica interessante para garantir a estabilidade, o elevado valor de Pdl indicou a heterogeneidade de tamanho dessa amostra.

Também não foram encontradas diferenças significativas nos valores de PZ e Pdl ($p > 0,05$) entre as todas amostras apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Influência da variação de massa de GG no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando GG foi gotejada na dispersão de QS.

Amostras	Massa (mg)		Tamanho partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Pdl	Classificação visual
	GG	QS				
NP1	0,5	4,5	574,30	15,73	0,66	LO
NP2	1	4,5	642,37	24,37	0,63	LO
NP3	1,5	4,5	642,90	29,83	0,66	LO
NP4	2	4,5	581,20	40,50	0,50	LO
NP5	2,5	4,5	714,17	40,63	0,59	LO
NP6	3	4,5	975,60	41,23	0,77	O

Fonte: Elaborado pelo Autor.

No caso dos resultados obtidos com a variação somente da massa de QS (Quadro 2), verificou-se que, apesar dos elevados valores de PZ (entre 33,90 mV – 39,57 mV), o diâmetro médio das partículas foi maior (na faixa de 838,07 nm - 1051,37 nm) ($p < 0,05$). Esse comportamento é semelhante àquele observado na amostra NP6, relacionado a formação de complexos secundários maiores.

Para as amostras apresentadas no Quadro 2 também não foram encontradas diferenças significativas nos valores de PZ e Pdl ($p > 0,05$).

Entretanto, no caso da amostra NP7, foi visualizada a separação de fase do meio, caracterizada pela formação de um precipitado volumoso em um sobrenadante límpido. Essa separação, provavelmente, se deve a diminuição da repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, resultando em um PZ nulo, conforme verificado no Quadro 2, o que induziu a forte agregação entre as partículas (A. D. KULKARNI et al., 2016) e tornou inviável a realização das medidas no DLS para evitar danos ao equipamento.

Quadro 2 – Influência da variação de massa de QS no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando GG foi gotejada na dispersão de QS.

Amostras	Massa (mg)		Tamanho partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Pdl	Classificação visual
	GG	QS				
NP7	3	0,75	0,00	0,00	0,00	A
NP8	3	1,5	882,13	33,90	0,64	O
NP9	3	2,25	838,07	38,53	0,65	O
NP10	3	3	880,77	39,23	0,71	O
NP11	3	3,75	867,87	39,57	0,65	O
NP12	3	4,5	1051,37	37,87	0,79	O

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados apresentados nos Quadros 3 e 4 são relativos ao estudo realizado com os complexos obtidos invertendo-se a ordem de adição dos polímeros, ou seja, com a adição da QS na GG. Além desse processo, a variação de massa dos polímeros também foi avaliada.

Os dados apresentados no Quadro 3 mostraram que, apesar dos elevados valores de PZ (entre 31,73 mV - 34,87 mV), a adição da QS à dispersão de GG levou a formação de partículas muito grandes, da ordem de micrômetros (na faixa de 7.547,67 nm - 27.673,33 nm), e com elevado Pdl (0,25 e 0,99). Provavelmente, esse aumento no tamanho das partículas ocorreu devido a adição da QS na GG ter

favorecido a formação de complexos secundários, uma vez que as cadeias de QS possuem muitas cargas positivas, atribuídas ao excesso de grupamentos amina protonados. Assim, ao ser adicionada à dispersão de GG, a QS possivelmente conseguiu interagir com uma maior quantidade de cadeias desse poliânion, resultando no aumento do tamanho dos sistemas formados (A. D. KULKARNI et al., 2016; MOURA NETO, 2013; SCHATZ et al., 2004; SAETHER et al., 2008).

Quadro 3 – Influência da variação de massa de GG no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando QS foi gotejada na dispersão de GG.

Amostras	Massa (mg)		Tamanho partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Pdl	Classificação visual
	QS	GG				
NP13	4,5	0,5	1762,33	32,73	0,99	LO
NP14	4,5	1	7547,67	31,73	0,38	O
NP15	4,5	1,5	11629,67	34,87	0,53	O
NP16	4,5	2	12356,00	34,10	0,25	O
NP17	4,5	2,5	13658,33	33,63	0,51	O
NP18	4,5	3	27673,33	31,63	0,72	O

Fonte: Elaborado pelo Autor.

O mesmo comportamento foi observado para os sistemas obtidos com a variação da massa de QS e fixando a massa de GG (Quadro 4), que, apesar de elevados valores de PZ (entre 18,77 mV - 38,70 mV), também apresentaram partículas com tamanho na escala micrométrica (na faixa de 10.196,67 nm - 22.596,67 nm) e elevado Pdl (0,69 – 1,00).

Quadro 4 – Influência da variação de massa de QS no tamanho, Pdl e PZ das nanopartículas, quando QS foi gotejada na dispersão de GG.

Amostras	Massa (mg)		Tamanho partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Pdl	Classificação visual
	QS	GG				
NP19	0,75	3	10196,67	18,77	0,90	O
NP20	1,5	3	15163,33	33,73	1,00	O
NP21	2,25	3	14156,00	33,57	0,69	O
NP22	3	3	19926,67	35,53	1,00	O
NP23	3,75	3	22596,67	38,70	0,72	O
NP24	4,5	3	18801,67	33,30	0,75	O

Fonte: Elaborado pelo Autor.

De maneira geral, os resultados evidenciaram que a adição da QS na dispersão de GG aumentou significativamente o tamanho das partículas obtidas, a semelhança dos resultados obtidos por Moura Neto (2013), em estudo sobre a obtenção de nanopartículas a partir da complexação polieletrólítica entre QS e galactomanana sulfatada.

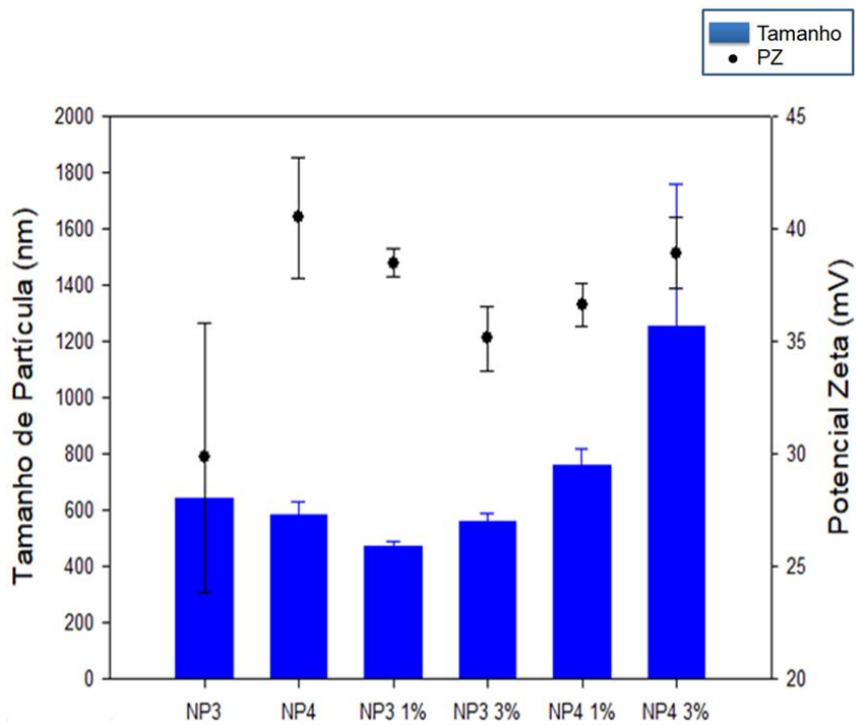
Nesse sentido, os resultados demonstraram que o gotejamento da GG às dispersões de QS parece ser uma alternativa mais adequada para obtenção de sistemas nanoestruturados. Assim, foram selecionadas as amostras NP3 e NP4 (Quadro 1), para a incorporação da PB, cujo tamanho (642, 90 nm \pm 12,04 e 581, 20 nm \pm 52,10, respectivamente), Pdl (0,66 e 0,50, respectivamente) e valores de PZ (29,83 mV e 40,50 mV, respectivamente) foram considerados mais adequados para incorporação da PB.

6.2.2 Obtenção das nanopartículas poliméricas contendo polimixina B

Para incorporação do fármaco nas amostras selecionadas (NP3 e NP4), a PB foi adicionada à dispersão de QS (1,0% e 3,0% em relação à massa total de

polímeros). Após o processo de CP entre os polímeros e o fármaco, novamente foram avaliados os parâmetros de tamanho das partículas, Pdl e PZ das dispersões dos sistemas obtidos, sendo os resultados apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Influência da incorporação da PB no tamanho e PZ das nanopartículas.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstraram que nas amostras NP3 e NP4 (sem fármaco) não foram encontradas diferenças significativas no tamanho de partícula ($p > 0,05$), no entanto, um maior valor de PZ foi exibido pela amostra NP4 ($p < 0,05$), que pode ser atribuído a maior quantidade de carga positiva proveniente da QS, que está em maior quantidade (4,5 mg) em relação a massa de GG (2 mg).

De maneira geral, a incorporação da PB (1% e 3%) não influenciou de maneira significativa no tamanho das partículas ($p > 0,05$), exceto para a amostra NP4 com 3% de PB, que apresentou maior tamanho ($p < 0,05$). Provavelmente, o maior número de moléculas do fármaco e maior concentração de GG (2 mg) levaram ao maior número de interações entre fármaco e polímeros, ou ainda, o fármaco pode ter ocupado os espaços intersticiais presentes na rede polimérica, levando a expansão

dessa rede e resultando em partículas maiores (PREZOTTI et al, 2012; CARDOSO, 2014).

Observou-se também que a presença e o aumento da concentração do fármaco nas amostras estudadas não influenciaram de maneira significativa nos valores de PZ ($p > 0,05$), exceto para a amostra de NP3 com 1% de PB, o qual apresentou um aumento significativo do valor do PZ ($p < 0,05$) (Figura 9). Os elevados valores de PZ observados em todas as amostras indicaram a estabilidade adequada dos sistemas. Valores elevados, em módulo, de PZ estão diretamente relacionados a sistemas fisicamente mais estáveis, uma vez que a tendência a agregação nessas condições é menor devido a repulsão eletrostática (PARVEEN et al., 2010).

Também foram observados elevados valores de Pdl nas amostras (0,51 e 0,75), indicando a heterogeneidade de tamanho desses sistemas.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

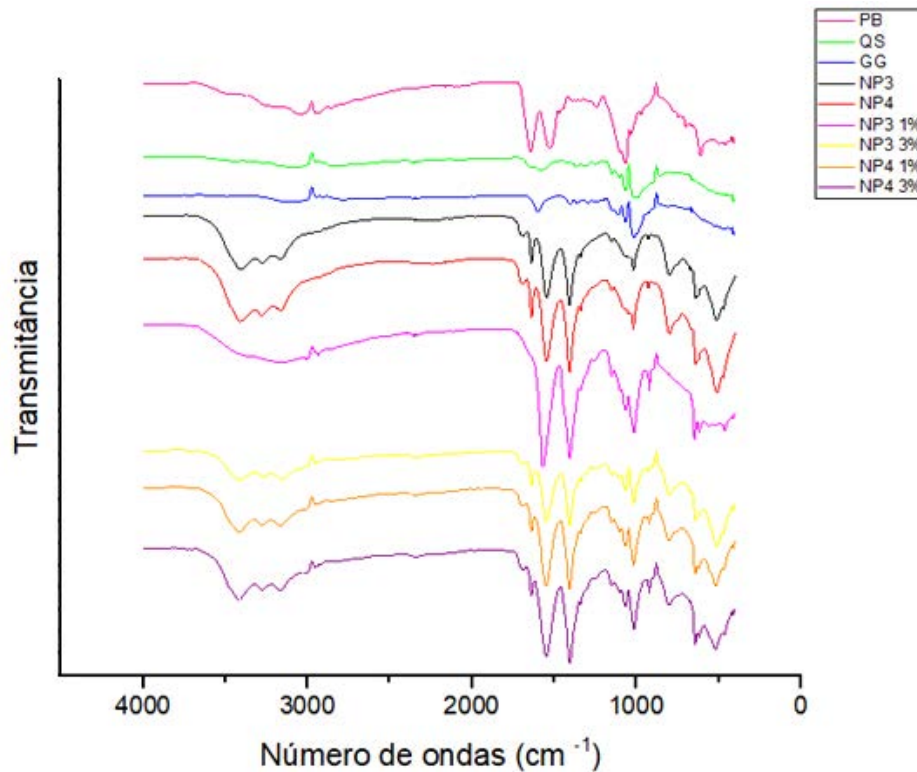
6.3.1 Análise das nanopartículas por espectroscopia na região de infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do IV é uma técnica relativamente simples, capaz de detectar diferentes grupos funcionais presentes em uma determinada amostra, através da emissão da radiação infravermelha sob essa amostra. A radiação é absorvida sempre que a sua frequência for igual a frequência vibracional natural das moléculas ou devido ao movimento vibracional ou rotacional dessas moléculas provocar uma variação do momento dipolar (FIORINI, 2000; SOLOMONS, 2005).

Desse modo, uma molécula química, ao absorver radiação eletromagnética do tipo IV, sofre um aumento na amplitude de suas vibrações axiais e angulares, que é convertido em um gráfico no computador e plotado em porcentagem de transmitância *versus* o número de onda (LEITE & PRADO, 2012; SOLOMONS, 2005).

Os espectros do fármaco, polímeros livres e das nanopartículas sem e com fármaco estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Espectros de IV da polimixina B, quitosana, goma gelana e nanopartículas com e sem polimixina B.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O espectro de IV da PB apresentou bandas características em 1638 cm^{-1} e 1538 cm^{-1} , atribuídas a estiramento vibracional do grupo N-H da amida I e II (LI, 2014). Um ligeiro deslocamento dessas bandas foi observado nas regiões 1549 cm^{-1} e 1408 cm^{-1} , respectivamente, após a incorporação da PB nas NPs. Tais mudanças indicam uma provável interação da PB com os polímeros presentes nas NPs. Além disso, o pico amplo entre 3650 cm^{-1} e 3150 cm^{-1} , atribuído ao estiramento O-H da PB (LI, 2014) foi mantido em todas as amostras, indicando a presença das moléculas de água quimicamente ligadas e provável formação de NH_3 .

No espectro da QS observou-se bandas típicas nas regiões 1640 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} , referentes a amida I, ao estiramento N-H do grupo NH_2 , e a amida III, respectivamente. As bandas entre $3.000\text{-}3.600\text{ cm}^{-1}$, 2800 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} , são atribuídas aos estiramentos O-H, C-H e C-O respectivamente (YADAV, SHIVAKUMAR, 2012). Um pequeno deslocamento observado nas bandas da QS na região de 1500 cm^{-1} (que representam os grupos CONH_2 e NH_2), bem como a maior

intensidade da banda de NH_2 nas NPs, indicam a provável protonação dos grupos NH_2^+ da QS e interação com o poliânion GG para a formação das NPs.

No espectro da GG foram observadas bandas em 3300 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento do grupo OH presente no anel de glucopiranosose, e as bandas 2900 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} e 1018 cm^{-1} , são correspondentes as vibrações de C-H do grupo CH_2 , de C-C, dos ânions carboxilatos (COO^-) e do estiramento C-O do ácido carboxílico, respectivamente (AGNIHOTRI et al., 2006; PEREIRA et al., 2011).

Para os espectros das NPs, as bandas entre 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} referentes aos polímeros isolados, foram mantidas, apresentando um pequeno deslocamento com aumento de intensidade, podendo ser indicativos da ocorrência de interações intermoleculares entre os componentes das amostras. Além disso, o pico amplo entre 3650 cm^{-1} e 3150 cm^{-1} , atribuído ao estiramento O-H da PB (LI, 2014) foi mantido em todas as amostras, indicando a presença das moléculas de água quimicamente ligadas.

Dessa forma, algumas mudanças na intensidade de absorção de determinadas regiões, observadas nos dados obtidos pela espectroscopia na região de IV, sugerem que a PB foi incorporada aos sistemas e que ocorreram interações entre o fármaco e os polímeros. Entretanto, não foi observado o surgimento de novos picos nos espectros das nanopartículas.

6.3.2 Análise das nanopartículas por meio da difração de raios-X

DRX é uma técnica de caracterização estrutural de materiais cristalinos através da interação dos feixes de raios-X com os elétrons dos átomos desses materiais (KARJALAINEN et al., 2005). Os cristais são estruturas sólidas que possuem um arranjo ordenado de seus átomos e os raios-X, ao atravessarem um material cristalino, acabam sofrendo difração construtiva ou destrutiva (BLEICHER & SASAKI, 2000).

A análise da estrutura cristalina utilizando a técnica de DRX baseia-se na incidência do feixe de raios-X monocromáticos sobre a amostra, que está na forma de um pó muito fino. Ao receber a radiação, cada átomo do cristal reflete uma onda espalhada, coerente com a radiação incidente, emitindo raios-X que são difratados (BARROSO et al., 2002; KARJALAINEN et al., 2005). Quando a difração desses raios produz uma interferência construtiva, ocorre a intensificação do raio emitido

pelos átomos do cristal, obedecendo a Lei de Bragg (BLEICHER & SASAKI, 2000; MENESES, 2007; ALBERS, A. P. F. et al., 2002):

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

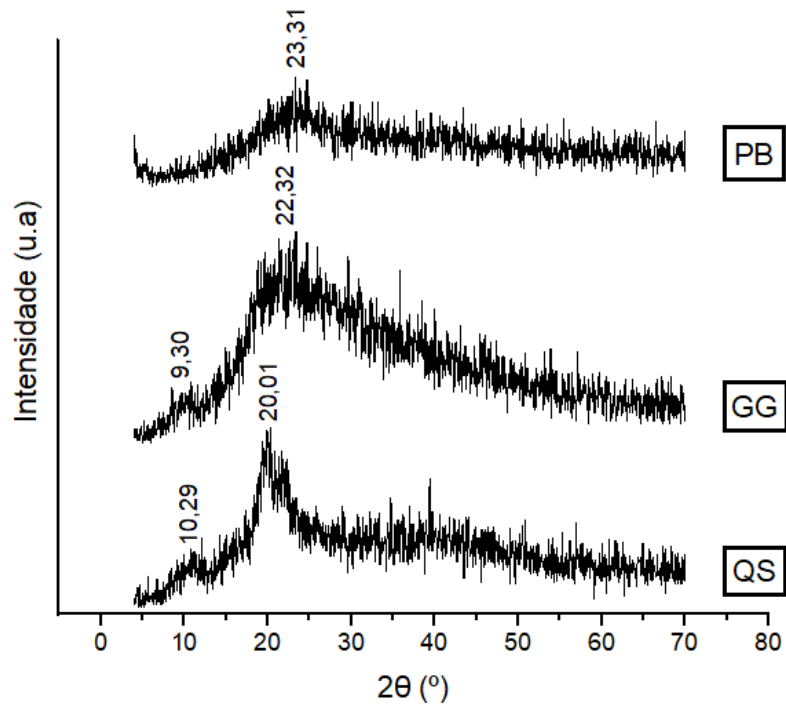
Em que n = número inteiro; λ = comprimento de onda da radiação, d = distância entre os planos cristalinos; θ = ângulo de incidência.

A intensificação do raio emitido é detectada pelo equipamento e registrada na forma de picos finos em um difratograma de intensidade do raio em função do ângulo de espalhamento (BARROSO et al., 2002; KARJALAINEN et al., 2005). Deste modo, os difratogramas obtidos através da análise de DRX do fármaco, polímeros e nanopartículas sem e com fármaco estão representados nas Figuras 11 - 13.

Na Figura 11 estão representados os difratogramas dos polímeros isolados (GG e QS) e da PB. O padrão de difração correspondente a PB apresentou um halo amorfo com somente um pico mais alargado na região de $23,31^\circ$ (2θ), perfil típico de materiais semicristalinos. Tal resultado é semelhante ao observado por Kimakhe e colaboradores (1999), em estudo sobre as atividades biológicas da liberação sustentada da PB a partir do biomaterial de fosfato de cálcio.

O mesmo padrão de difração característico de materiais semicristalinos foi observado nos difratogramas referentes a GG e QS, com a presença de um grande halo amorfo com picos característicos, os quais para a GG, foram observados picos nas regiões $9,30^\circ$ e $22,32^\circ$ (2θ), semelhante àqueles encontrados por Cardoso (2014) e Yang e colaboradores (2013). No caso da QS, foram observados picos nas regiões $10,29^\circ$ e $20,01^\circ$ (2θ), equivalente àqueles encontrados por Pedreiro (2015) e Li e colaboradores (2009).

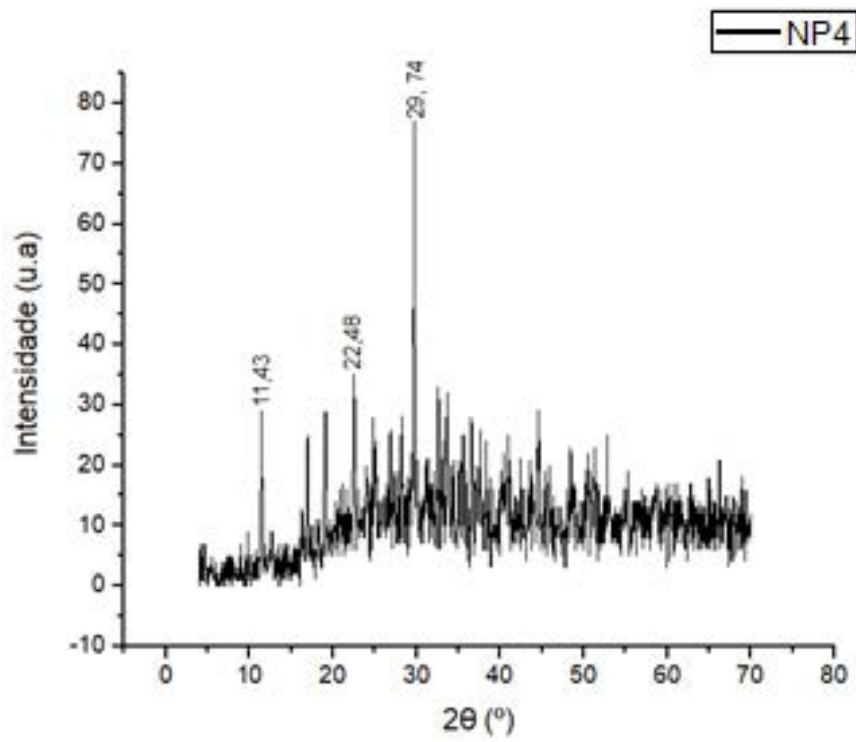
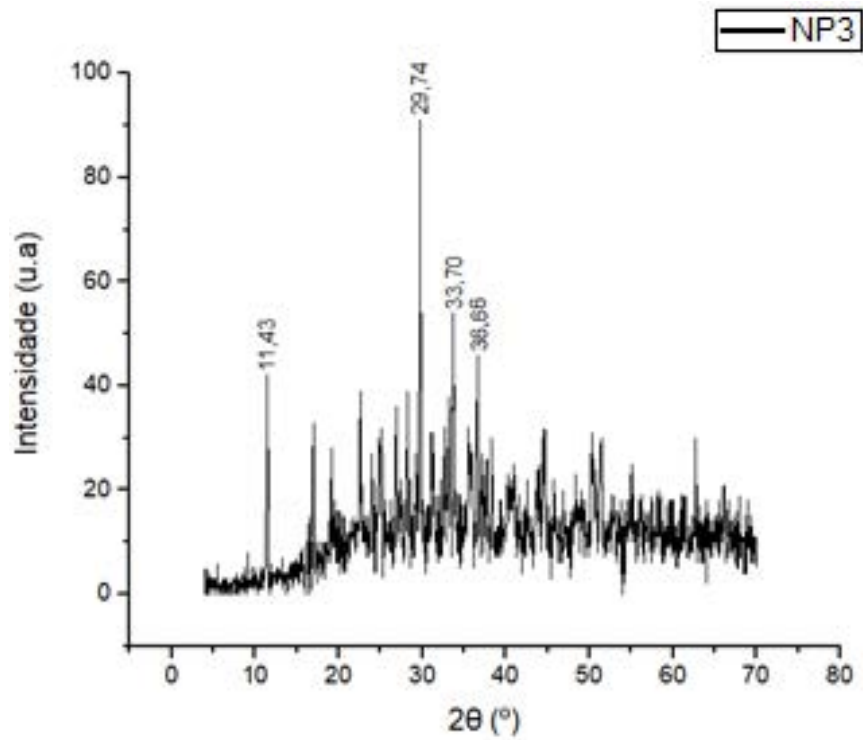
Figura 11 – Difratoograma de raios-X da polimixina B, goma gelana e quitosana; respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Ao analisar os difratogramas correspondentes às nanopartículas sem fármaco (Figura 12), observou-se a presença de vários picos intensos e bem definidos, nas regiões de $11,43^\circ$; $22,48^\circ$; $22,65^\circ$ e $29,74^\circ$ (2θ), característicos de estruturas cristalinas, a semelhança daqueles encontrados nos difratogramas da GG e QS. O aparecimento desses picos pode estar relacionado à formação de uma estrutura mais organizada após o processo de complexação entre os polímeros GG e QS, uma vez que a formação de ligações cruzadas entre seus grupos funcionais $-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$, resulta na formação de uma rede tridimensional ordenada e mais cristalina. Observou-se também que a variação da concentração de GG (de 1,5 para 2,0 mg) nas nanopartículas parece não ter influenciado nos padrões de difração de raios-X, ou seja, não alterou de maneira significativa a cristalinidade das NPs.

Figura 12 – Difratogramas de raios-X das nanopartículas sem polimixina B.

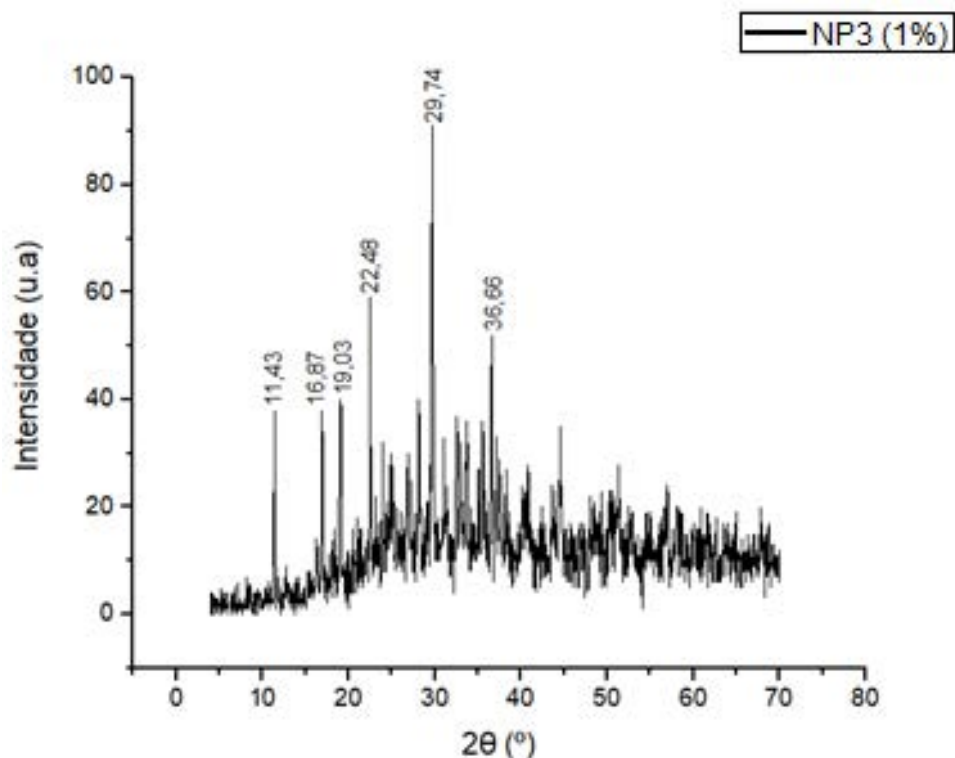


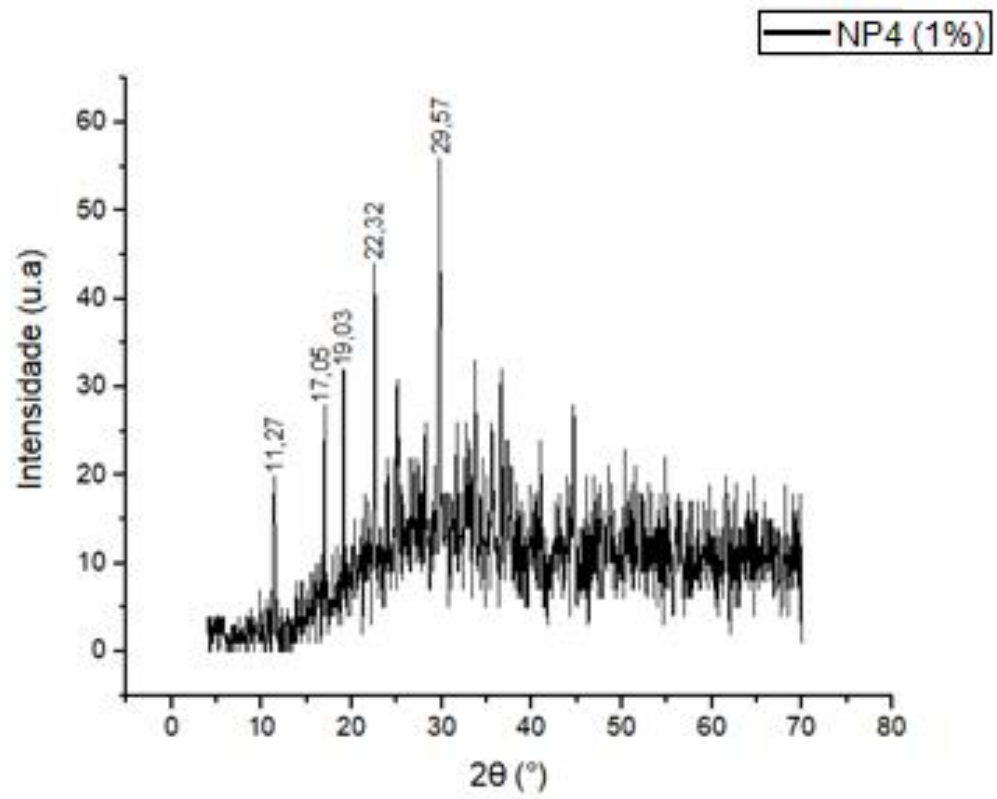
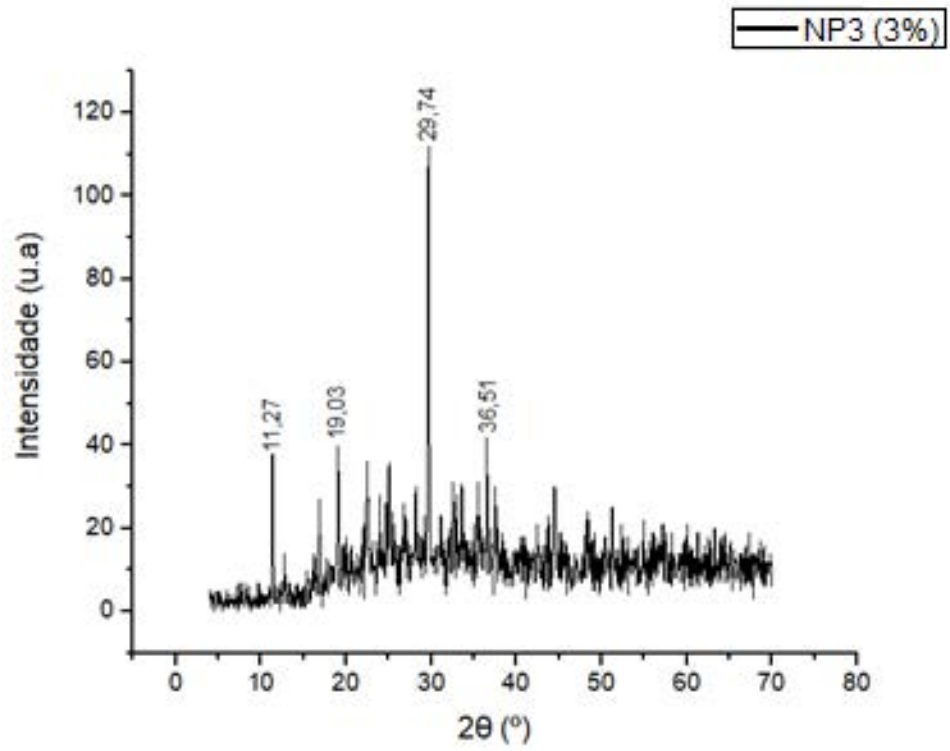
Fonte: Elaborado pelo Autor.

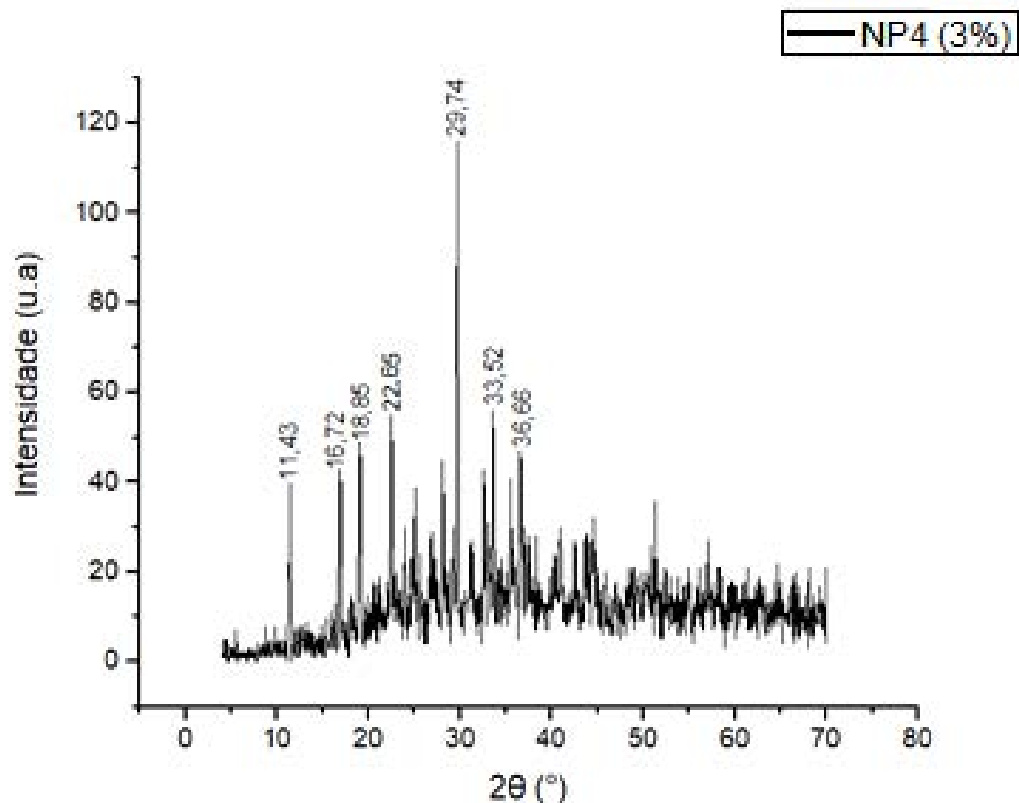
Os picos em $11,43^\circ$; $22,48^\circ$; $22,65^\circ$ e $29,74^\circ$ (2θ), correspondentes as possíveis interações da GG com QS, foram preservados nos difratogramas das nanopartículas com PB (Figura 13). Além disso, verificou-se o surgimento de novos picos em $16,72^\circ$; $16,87^\circ$; $17,05^\circ$; $18,85^\circ$; $19,03^\circ$; $22,32^\circ$; $33,52^\circ$; $36,51^\circ$ e $36,66^\circ$ (2θ), que pode estar relacionado a uma maior reorganização estrutural, resultante da complexação polieletrólítica entre os polímeros e fármaco, favorecendo a formação de uma rede tridimensional mais compacta e cristalina (PU et al., 2011).

De uma maneira geral, nos difratogramas das nanopartículas contendo fármaco não foi possível verificar a presença de picos de cristalinidade correspondentes aos da PB, possivelmente, devido a sobreposição de novos picos sugestivos do aumento da cristalinidade desses sistemas, ou ainda, sugerindo que houve a dispersão do fármaco, na sua forma molecular, na matriz polimérica. Esse comportamento é semelhante àquele observado por Pedreiro (2015), em estudos sobre nanopartículas poliméricas mucoadesivas a base de QS e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose contendo zidovudina.

Figura 13 – Difratograma de raios-X das nanopartículas com a polimixina B (1% e 3%).







Fonte: Elaborado pelo Autor.

6.3.3 Morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de alta resolução

A MEV-FEG é uma técnica muito utilizada para a obtenção de informações sobre a morfologia de diversos materiais e vem sendo muito utilizada para a análise e caracterização de diversos sistemas farmacêuticos. A imagem é formada pela incidência de um feixe de elétrons de alta energia na superfície do material a ser analisado, em ambiente a vácuo, sendo parte desse feixe emitido por elétrons secundários ou retroespalhados, e coletado por um detector que converte este sinal em imagem (MENESES, 2007).

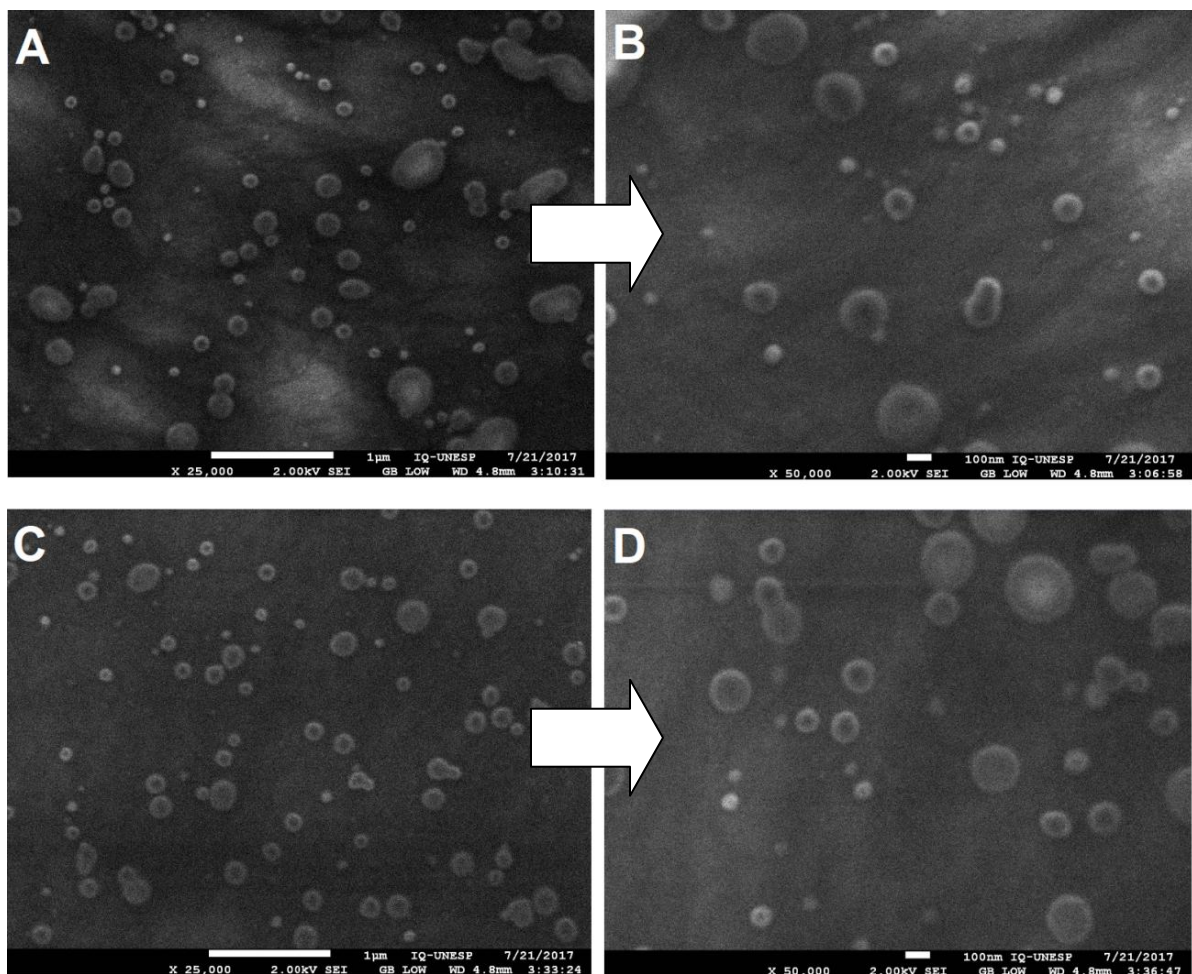
Para avaliar a forma e a superfície das nanopartículas sem e com fármaco, foi realizada a análise por MEV-FEG, sendo as fotomicrografias obtidas apresentadas nas Figuras 14 - 15.

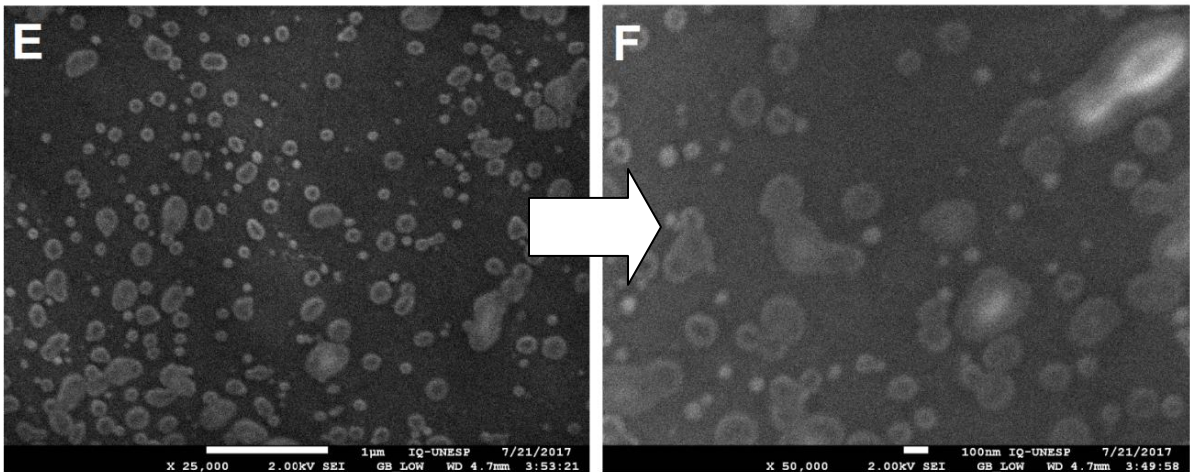
A partir das fotomicrografias (Figuras 14 e 15) foi possível verificar a formação de partículas de escala nanométrica, com formas regulares, esféricas e de superfície aparentemente lisa. Além disso, foi possível observar que a adição do fármaco não

alterou a morfologia das partículas, que mantiveram-se esféricas e com superfície lisa.

Algumas partículas maiores foram observadas em todas as imagens, sugerindo a ocorrência de aglomeração das nanopartículas devido ao processo de secagem. Suspensões coloidais são sistemas que, geralmente, apresentam uma significativa estabilidade física, que é garantida pela condição de equilíbrio entre as forças de atração e repulsão, e em razão do movimento Browniano (SCHAFFAZICK et al., 2003). Entretanto, durante a secagem, as moléculas de água podem ter provocado o arraste das partículas, aumentando a força de atração entre elas e resultando na formação de aglomerados.

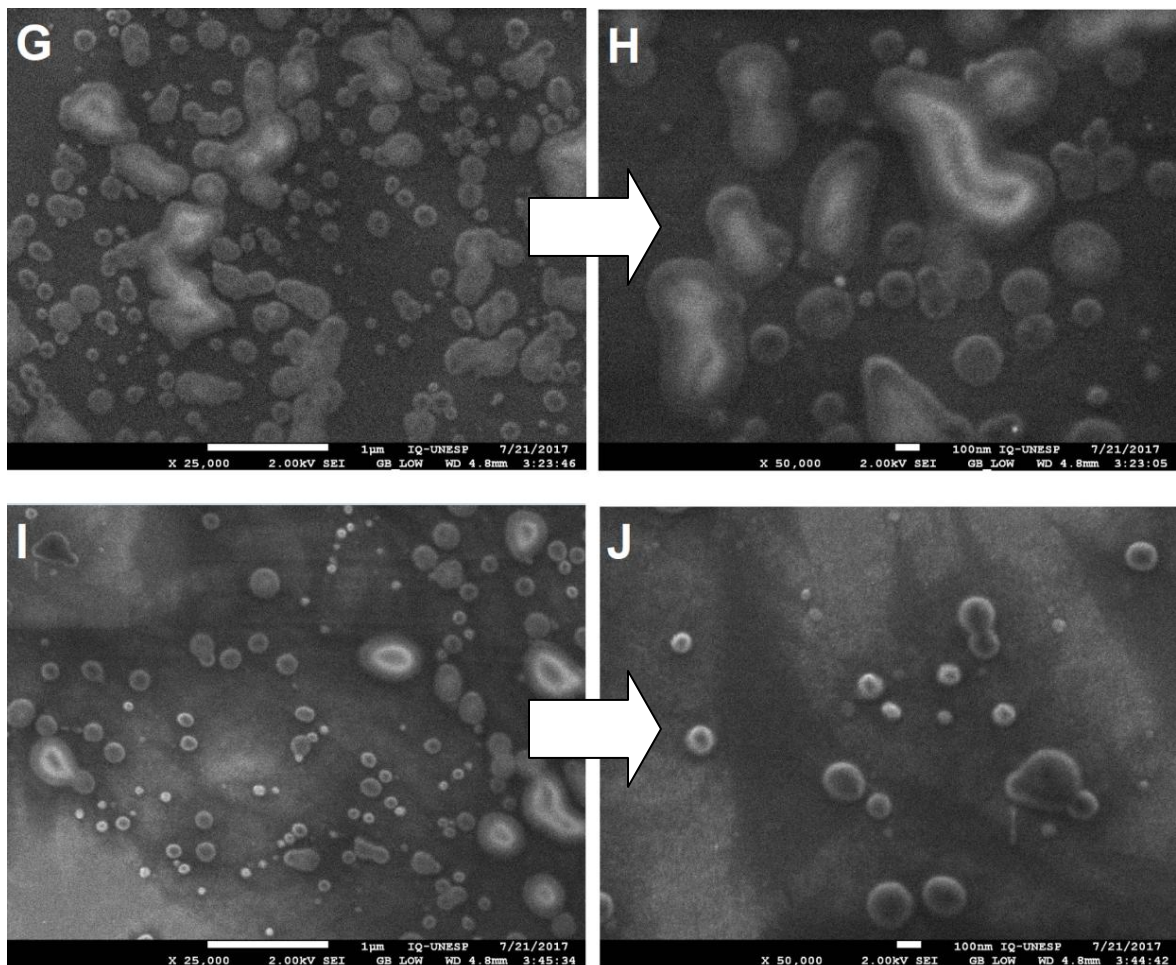
Figura 14 – Fotomicrografias das amostras NP3 sem PB (A e B), NP3 com 1% de PB (C e D) e NP3 com 3% de PB (E e F), ambas nos aumentos de 25.000 e 50.000x, respectivamente.

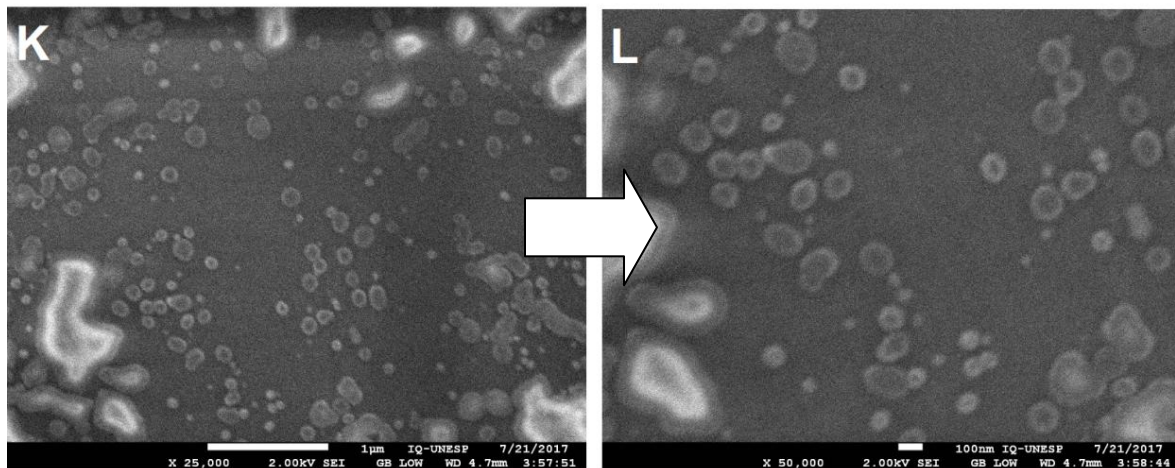




Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 15 – Fotomicrografias das amostras NP4 sem PB (G e H), NP4 com 1% de PB (I e J) e NP4 com 3% de PB (K e L), ambas nos aumentos de 25.000 e 50.000x, respectivamente.





Fonte: Elaborado pelo Autor.

6.3.4 Avaliação das propriedades mucoadesivas das nanopartículas obtidas

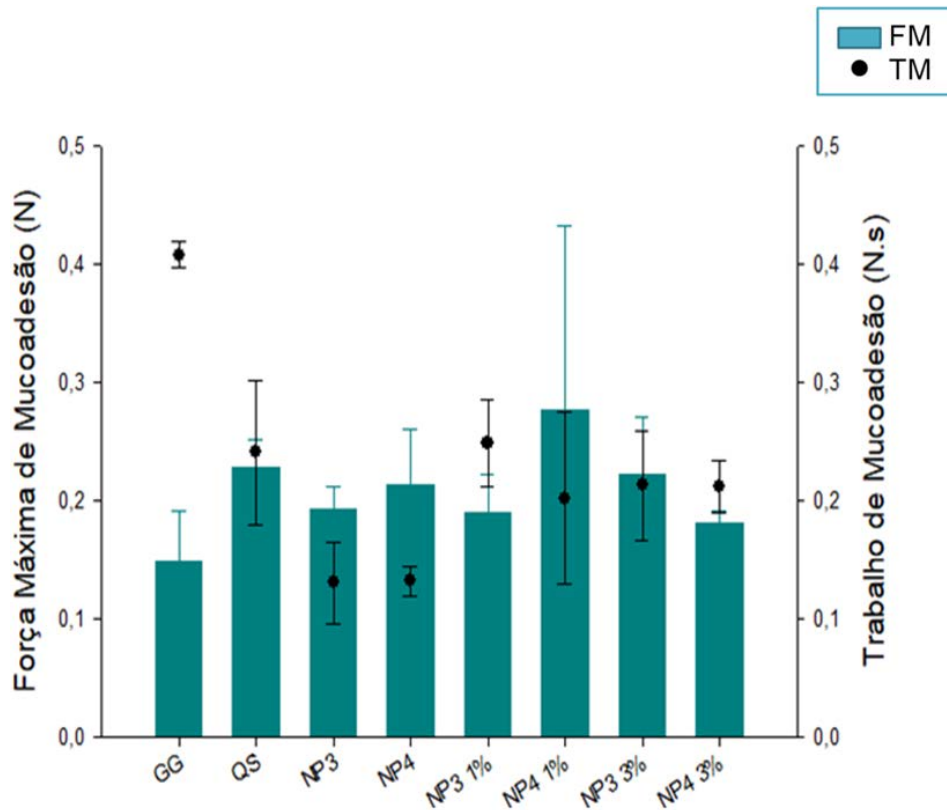
Propriedades mucoadesivas são características que agregam importantes vantagens aos sistemas carreadores de fármacos, quando o objetivo é aumentar a absorção do fármaco em uma região específica, no caso o cólon. O contato mais íntimo desses sistemas com a mucosa intestinal contribui para prolongamento do tempo de permanência do sistema no local de ação, melhorando a absorção do fármaco e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica.

O uso de polímeros com propriedades mucoadesivas, assim como a concentração desses materiais, hidrofília, flexibilidade das cadeias, capacidade de intumescimento e a presença de grupos funcionais fazem desses materiais interessantes para garantir o sucesso na liberação do fármaco (CARVALHO, 2009; FIGUEIRAS et al., 2007).

O analisador de textura é um equipamento bastante utilizado para avaliar a mucoadesão em sistemas de liberação. Tecido intestinal de porco foi utilizado neste ensaio devido a sua semelhança anatômica e fisiológica com o do ser humano (KARARLI, 1995; VARUM et al., 2010).

No estudo de mucoadesão “*ex vivo*” foram avaliados a força máxima (FM) e o trabalho de mucoadesão (TM) dos polímeros e das nanopartículas sem e com fármaco, sendo os resultados apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Força máxima e trabalho de mucoadesão da goma gelana, quitosana, nanopartículas sem fármaco e das nanopartículas com fármaco incorporado a 1% e 3%.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

De acordo com a Figura 16, é possível verificar que tanto GG como a QS apresentam importante capacidade mucoadesiva. Entre elas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para FM ($p > 0,05$), entretanto, TM exibido pela GG ($p < 0,05$) foi maior, indicando que a GG pode ter estabelecido uma maior interação com as cadeias de mucina, presentes no muco, através da teoria da difusão, já que em ambiente fisiológico, ambas, GG e mucina, estão carregadas negativamente. Tal comportamento também foi relatado por Panchal e colaboradores (2012), em estudos com comprimidos mucoadesivos para administração da rosuvastatina cálcica utilizando gomas naturais, entre elas a GG e a QS.

Por outro lado, a interação da mucina com QS pode ocorrer, primordialmente, através da atração eletrostática dos grupamentos amino da QS carregados positivamente e os grupos negativos do ácido siálico da mucina (teoria eletrônica)

(DA SILVA et al., 2007; DEACON et al., 2000; EDSMAN e HAGERSTROM, 2005; FIEBRIG et al., 1995; LEE et al., 2000; HE et al., 1998; VASIR et al., 2003).

Após a complexação entre GG e QS (NP3 e NP4) observou-se que a FM dos polímeros foi mantida nas amostras, uma vez que, estatisticamente, não foram encontradas diferenças significativas entre a FM dos polímeros em relação as amostras ($p > 0,05$). Entretanto, ambas as amostras apresentaram uma diminuição significativa do TM em relação aos polímeros isolados ($p < 0,05$), o que pode ser atribuído à formação de uma estrutura com uma malha polimérica altamente compacta, com reduzida flexibilidade das cadeias e menor quantidade de grupos funcionais livres para estabelecer contato com as cadeias da mucina, diminuindo a capacidade mucoadesiva dos sistemas (CRCAREVSKA et al., 2008; CARDOSO, 2014). Além disso, esse comportamento pode ser indicativo de que a CP levou a formação de uma estrutura mais organizada, o que corrobora com os estudos de DRX.

Entre as amostras NP3 e NP4 não foram encontradas diferenças significativas para o TM e FM ($p > 0,05$).

De maneira geral, a presença e o aumento da concentração do fármaco quando a GG estava na menor (1,5 mg/mL) ou maior (2,0 mg/mL) concentração não influenciaram de maneira significativa os parâmetros FM e TM ($p > 0,05$), exceto para a amostra de NP3 com 1% de PB, que apresentou um aumento do TM ($p < 0,05$).

Sendo assim, as propriedades mucoadesivas dos sistemas foram evidenciadas e tal resultado indica a capacidade dos sistemas em interagir com a camada de muco intestinal.

7 CONCLUSÃO

Nanopartículas poliméricas a base de GG e QS contendo ou não PB (1% e 3%), foram obtidas com sucesso pela técnica de CP. A adição da GG à dispersão de QS favoreceu a formação de partículas menores (na faixa de 575,30 nm – 974,60 nm) e com elevados valores de PZ (entre 29,37 mV – 41,23 mV), indicando a adequada estabilidade física dos sistemas.

Após estudos prévios para determinar as melhores condições para obtenção das nanopartículas, os sistemas selecionados para a incorporação do fármaco apresentaram diâmetro médio da ordem de 550 - 650 nm e PZ superior a + 30 mV, características promissoras, pois podem favorecer a interação dos sistemas com a mucina presente no muco colônico, já que esta possui carga superficial negativa.

A formação das nanopartículas, através das interações entre os grupos funcionais -OH, -COOH e -NH₂ dos polieletrólitos, foi evidenciada pela espectroscopia no IV.

A análise de MEV evidenciou a formação de sistemas nanométricos com morfologia esférica e de superfície lisa, enquanto os dados de DRX indicaram a formação de estruturas mais organizadas e com maior grau de cristalinidade.

A mucoadesão dos sistemas foi demonstrada, indicando sua capacidade de permanecer por mais tempo em contato com a mucosa intestinal.

Os resultados obtidos neste estudo foram favoráveis, indicando que foi possível o desenvolvimento de um sistema promissor com capacidade para vetorização de fármacos para tratamento de doenças do cólon, como, por exemplo, o câncer colorretal.

8 REFERÊNCIAS

ABHIJEET D. KULKARNI, YOGESH H. VANJARI, KARAN H. SANCHETI, HARUN M. PATEL, VEENA S. BELGAMWAR, SANJAY J. SURANA & CHANDRAKANTSING V. PARDESHI. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44(7), p. 1615-1625, January 13 2016. ISSN: 2169-1401. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>>. Acessado em: 20/08/2017.

ABHIJEET D. KULKARNI, YOGESH H. VANJARI, KARAN H. SANCHETI, HARUN M. PATEL, VEENA S. BELGAMWAR, SANJAY J. SURANA & CHANDRAKANTSING V. PARDESHI. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44(7), p. 1615-1625, January 13 2016. ISSN: 2169-1401. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>>. Acessado em: 20/08/2017.

AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Development of Novel Interpenetrating Network Gellan Gum-Poly (vinyl alcohol) Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Carvedilol†. *Drug Development and Industrial Pharmacy* v. 31, n. 6, p. 491-503, 2005.

AGNIHOTRI, S. A.; JAWALKAR, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, n. 3, p. 249-261, 2006.

ALBERS, A. P. F. et al . Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. *Cerâmica*, São Paulo , v. 48, n. 305, p. 34-37, Mar. 2002 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132002000100008&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 10/08/2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0366-69132002000100008>.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Delineamento e Formas Farmacêuticas: Considerações Biofarmacêuticas e Farmacocinéticas. In: Allen, L. V.,

Popovich, N. G., Ansel, H.C. (Ed). Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8ªed. Artmed, p. 158-179, 2007.

ALVAREZ-LORENZO, C.; BLANCO-FERNANDEZ, B.; PUGA, A. M.; CONCHEIRO, A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 9, p. 1148-1171, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society, 2016. 52.

AMIDI, M. et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 62, n. 1, p. 59-82, Jan 31 2010. ISSN 0169-409x.

ANDRADE, S. M. S.; PEREIRA, F. L. Câncer Colorretal Sincrônico - Relato de Caso e Revisão de Literatura. *Rev bras Coloproct*, 2007; 27 (1): 069-079.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L. M.; COSTA, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 23, p. 27-34, 2007.

BABU, R. J.; SATHIGARI, S.; KUMAR, M. T.; PANDIT, J. K. Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin. *Current Drug Delivery*, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2010.

BARROSO, R.C.; ANJOS, M.J.; LOPES, R.T.; JESUS, E.F.O.; BRAZ, D.; CASTRO, C.R.F.; UHL, A. Analysis of matrix characterization by X-ray diffraction and synchrotron radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 65, n. 4 – 5, p. 501-505, 2002.

BASIT, A. W. Advances in colonic drug delivery. *Drugs*, v. 65, n. 14, p. 1991-2007, 2005.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. *J Port Gastreterol.*, Lisboa , v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009.

BEDI, A.; PASRICHA, P. J.; AKHTAR, A. J.; BARBER, J. P.; BEDI, G. C.; GIARDIELLO, F. M.; ZEHNBAUER, B. A.; HAMILTON, S. R.; JONES, R. J. Inhibition

of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Research*, v. 55, n. 9, p. 1811-1816, 1995.

BERGER, J., REIST, M., MAYER, J. M., FELT, O., & GURNY, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35- 52.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n. 10, p. 1025-1038, 2000.

BLEICHER, L; SASAKI, J. M. Introdução à Difração de raios-X em cristais. Universidade Federal do Ceará, 2000. Disponível em: <<http://www.raiosx.ufc.br/site/wp-content/uploads/downloads/2013/01/apostila.pdf>>. Acessado em: 10/08/2017.

Boni, F. I., Prezotti, F. G., & Cury, B. S. F. (2015). Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (just-accepted), 1-29.

BONI, Fernanda Isadora. Microesferas de goma gelana reticulada para liberação controlada de fármacos. 2014. 63 f. , 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/124293>>. Acessado em: 08/08/2017.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIAO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

BRUSHI, M.L.; PANZERI, H.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G.; GREMIAO, M.P.D. Sistemas de liberacao de farmaco intrabolsa periodontal. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v.42, n.1, p. 31-47, 2006.

CANEVAROLO Jr, S. V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: Artliber, 2004.

CARDOSO, Valéria Maria de Oliveira Cardoso. Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon-específica de fármacos. 2014. 198 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122044>>. Acessado em: 05/03/2017.

CARVALHO, C. F.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos – Propriedades, Metodologias e Aplicações. Polímeros [online]. 2014, vol.24, n.2, pp.203-213. ISSN 0104-1428.

CARVALHO, Flávia Chiva. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. 2009. 143 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99051>>. Acessado em: 08/08/2017.

CHAN, E.; LEE, B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. Journal of colloid and interface science, v. 338, n. 1, p, 63-72, 2009.

CHANDRASEKARAN, R.; MILLANE, R. P.; ARNOTT, S.; ATKINS, E. D. T. The crystal structure of gellan. Carbohydrate Research, v. 175, n. 1, p. 1-15, 1988.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, v. 6, n. 1, p. 33-66, 2003.

COIMBRA, P. Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

DA SILVA, C.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. Adsorption Isotherms of Mucin on Granules Containing Chitosan Microspheres. Adsorption Science & Technology, v. 25, n. 10, p. 781-789, 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2016. ISSN 1751-6161.

DEACON, M. P., MCGURK, S., ROBERTS, C. J., WILLIAMS, P. M., TENDLER, S. J., DAVIES, S. J., DAVIS, S. S., & HARDING, S. E. (2000). Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. *Biochemical Journal*, 348(3), 557–563.

DIAS, A. P. T. P.; GOLLNER, A. M.; TEIXEIRA, M. T. B. Câncer Colorretal Rastreamento, Prevenção e Controle. *HU rev, Juiz de Fora*, v.33, n.4, p.125-131, out./dez. 2007.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the nonoral routes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 57, n. 1, p. 3-22, 2005.

EHRKE, M. J. Immunomodulation in cancer therapeutics. *International Immunopharmacology*, v. 3, n. 8, p. 1105-1119, 2003.

ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H.; CONCEIÇÃO, J.; LOBO, J. M. S. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 126, p. 631-648, 2015.

FADDA, H. M.; BASIT, A. W. Gastrointestinal tract: obstacles or opportunities in drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 1, p. 52-59, 2005.

FALAGAS, M. E.; KASIALOU, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, 10:R27, 2006.

FIEBRIG, I., HARDING, S. E., ROWE, A. J., HYMAN, S. C., & DAVIS, S. S. (1995). Transmission electron microscopy studies on pig gastric mucin and its interactions with chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 28(3), 239-244.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R., VEIGA, F. Sistemas mucoadesivos de administração de fármacos na cavidade oral: Mecanismo de mucoadesão e polímeros mucoadesivos. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2007; (4) 2: 216-233.

FIORINI, E. J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Unicamp. 2000. Disponível em : <<http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/FTIR.pdf>>. Acessado em 08/08/2017.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 319-335, 2006.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 2, p. 247-265, 2005.

FUKUDA, H., & KIKICHI, Y. (1978). In vitro clot formation on the polyelectrolyte complexes of sodium dextran sulfate with chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research*, 12(4), 531-539.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials*, v. 20, n. 15, p. 1427-1435 ,1999.

GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 0, 2013.

GANDHI, R. B.; ROBINSON, J. R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 13, n. 1, p. 43-74, 1994.

GEORGE, M., & ABRAHAM, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1-14.

HAGESAETHER, E.; HIORTH, M.; SANDE, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, n. 2, p. 325-331, 2009.

HAGERSTROM, H. Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery. *Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis*, 2003. n. 293, 76p. (Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy).

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166(1), 75-88.

HUA, S.; MARKS, E.; SCHNEIDER, J. J.; KEELY, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine*, v. 11, n. 5, p. 1117-32, 2015.

HUGUET, M. L., NEUFELD, R. J., & DELLACHERIE, E. (1996). Calcium alginate beads coated with polycationic polymers: Comparison of chitosan and DEAE-dextran. *Process Biochemistry*, 31(4), 347-353.

HUNTER, A. C.; ELSOM, J.; WIBROE, P. P.; MOGHIMI, S. M. Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 8, Supplement 1, n. 0, p. S5-S20, 2012.

JAIN, A.; JAIN, S. K.; GANESH, N.; BARVE, J.; BEG, A. M. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine*, v. 6, n. 1, p. 179-90, 2010.

JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. *Food Hydrocolloids*, v. 21, n. 7, p. 1172-1187, 2007.

KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RATANEN, J.; AATONEN, J.; YLIRRUSI, J. Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 1-2, p. 27-32, 2005.

KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M. D.; FLANAGAN, D. R. Drug transfer through mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, n. 2–3, p. 173-193, 2001.

KIMAKHE, S.; BOHIC, S.; LARROSE, C.; REYNAUD, A.; PILET, P.; GIUMELLI, B.; HEYMANN, D.; DACULSI, G. Biological activities of sustained polymyxin B release from calcium phosphate biomaterial prepared by dynamic compaction: An in vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*, v. 47, n. 1, p. 18-27, 1999.

KIRCHMAJER, D. M.; STEINHOFF, B.; WARREN, H.; CLARK, R.; PANHUIS M. H. Enhanced gelation properties of purified gellan gum. *Carbohydrate Research*, v. 388, p.125-129, 2014.

KULKARNI, R. V.; MANGOND, B. S.; MUTALIK, S.; SA, B. Interpenetrating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem–resin complex for controlled release application. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, n. 2, p. 1001-1007, 2011.

KUMAR SINGH YADAV, Hemant; SHIVAKUMAR, H. G. In vitro and in vivo evaluation of pH-sensitive hydrogels of carboxymethyl chitosan for intestinal delivery of theophylline. *ISRN pharmaceuticals*, v. 2012, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KWA, A. L.; TAM, V. H.; FALAGAS, M. E. Polymyxins: A Review of the Current Status Including Recent Developments. *Annals Academy of Medicine*, vol. 37 No. 10, October 2008.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, India*, v. 71, n. 5, p. 481-487, 2009.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.T. QUITOSANA: POLÍMERO FUNCIONAL COM POTENCIAL INDUSTRIAL BIOMÉDICO. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 672-678, 2009.

LEE, J. W., KIM, S. Y., KIM, S. S., LEE, Y. M., LEE, K. H., & KIM, S. J. (1999). Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 73(1), 113-120.

LEE, K. Y., PARK, W. H., & HA, W. S. (1997). Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(4), 425-432.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LEITE, D. O.; PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, 2504, 2012.

LI, V. Advancing silver nanostructures towards antibacterial applications. Doctor of Philosophy (PhD), Applied Sciences, RMIT University. 2014.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, n. 1, p. 1-6, 2009.

LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, v. 24, n. 19, p. 3333-3343, 2003.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação de Fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 5, p. 445-451, 4/18/ 2011. ISSN 0928-0987.

MANMODE, A. S.; SAKARKAR, D. M.; MAHAJAN, N. M. Nanoparticles – Tremendous Therapeutic Potential: A Review. *International Journal of PharmTech Research*, v. 1 n. 4, p. 1020-1027, 2009.

MAO R.; TANG J.; SWANSON B. G. Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. *Carbohydrate Polymers*, v. 41, n. 4, p. 331-338, 2000.

MENDES, Carlos Alberto Caldeira; BURDMANN, Emmanuel A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , v. 55, n. 6, p. 752-759, 2009.

MENESES, C. T. Estudo da cristalização de nanopartículas de NiO por difração e absorção de raios-X. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Departamento de Física. Tese apresentada ao da, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física. Fortaleza, janeiro de 2007.

MEREDITH, J. J.; DUFOUR, A.; BRUCH, M. D. Comparison of the Structure and Dynamics of the Antibiotic Peptide Polymyxin B and the Inactive Nonapeptide in Aqueous Trifluoroethanol by NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 113, No. 2, 2009.

MISHRA, J.; DRUMMOND, J.; QUAZI, S. H.; KARANKI, S. S.; SHAW, J. J.; CHEN, B.; KUMAR, N. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 86, n. 3, p. 232-50, 2013.

MOURA NETO, E. Síntese de Nanopartículas da Galactomanana da Fava Danta (*Dimorphandra gardneriana*) Modificada. 2013. 147 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MIYOSHI, E., TAKAYA, T., & NISHINARI, K. (1996). Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 30(2–3), 109-119.

NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.

NETTER, Frank H.. Atlas de Anatomia Humana. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

OLIVEIRA, A. T.; QUEIROZ, A. P. A. PERFIL DE USO DA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA ORAL: A IMPORTÂNCIA DA ORIENTAÇÃO FARMACÊUTICA. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde*, v. 3, n. 4, p. 24-29, 2012.

OLIVEIRA, G. F. et al. Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 10/15/ 2010. ISSN 0144-8617.

OLIVEIRA, S. S. M. Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação in vitro e in vivo. 2014. 100f Doutorado em Ciências Farmacêuticas (Tese). Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo (USP), 2014.

ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R. M.; GASCÓN, A. R.; PEDRAZ, J. L. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. *Cancer Therapy*, v. 3, n. 1, p. 131-8, 2005.

OSMAŁEK, T.; FROELICH, A.; TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 466, n. 1–2, p. 328-340, 2014.

PANCHAL, A. V.; MEHTA, M.; SHAH, V. H.; UPADHYAY, U. Formulation and in vitro evaluation mucoadhesive bilayered buccal tablets of rosuvastatin calcium.

International journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 3, n. 8, p. 2733 – 2740, 2012.

PANI, S.; COOK, E. J.; HORROCKS, J. A.; JONES, J. L.; SPELLER, R. D. Characterization of breast tissue using energy-dispersive X-ray diffraction computed tomography. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 68, n. 10, p. 1980-1987, 2010.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 1, p. 44-54, 2008.

PARVEEN, S.; MITRA, M.; KRISHNAKUMAR, S.; SAHOO, S. K. Retraction notice to Enhanced Antiproliferative Activity of Carboplatin loaded Chitosan-Alginate Nanoparticles in Retinoblastoma Cell Line [Acta Biomaterialia 6 (2010) 3120–3131]. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 8, p. 3120-3131, 2010.

PATIL, S.; SHARMA, S.; NIMBALKAR, A.; PAWAR, A. Study of Formulation Variables on Properties of Drug-Gellan Beads by Factorial Design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 32, n. 3, p. 315-326, 2006.

PEDREIRO, Liliane Neves. Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal. 2015. 149 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Araraquara, 2015.

PEDREIRO, L. N. Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina. 2012. (Mestre). Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

PEREIRA, D. R. et al. Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 17, n. 10, p. 961-972, 2011. ISSN 1937-3384.

PEREZ-VILAR, J.; HILL, R. L. Mucin Family of Glycoproteins. In: EDITORS-IN-CHIEF: WILLIAM, J. L. e LANE, M. D. (Ed.). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. New York: Elsevier, 2004. p.758-764. ISBN 978-0-12-443710-4.

PICONE, C. S. F. Formação de nanopartículas por associação de biopolímeros e surfactantes. Campinas, SP: [s.n], 2012. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. Chitosan–gellan electrostatic complexes: Influence of preparation conditions and surfactant presence. *Carbohydrate Polymers*, v. 94, n. 1, p. 695-703, 4/15/ 2013. ISSN 0144-8617.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 395, n. 1–2, p. 44-52, 2010.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydrate Polymers*, v. 113, n. 0, p. 286-295, 11/26/ 2014. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171400695X> >.

PREZOTTI, F. G. et al. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 38, n. 11, p. 1354-9, Nov 2012. ISSN 1520-5762.

PU, H.; CHEN, L.; LI, X.; XIE, F.; YU, L.; LI, L. An Oral Colon-Targeting Controlled Release System Based on Resistant Starch Acetate: Synthetization, Characterization, and Preparation of Film-Coating Pellets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 10, p. 5738-5745, 2011.

RAJINIKANTH, P.; MISHRA, B. Preparation and in vitro characterization of gellan based floating beads of acetohydroxamic acid for eradication of *H. pylori*. *Acta Pharmaceutica*. 57: 413 p. 2007.

RUSSO, J. M.; TURNER. Gastrointestinal tract anatomy, overview: In *Encyclopedia of Gastroenterology*, edited by JOHNSON, New York, p. 223-227, 2004.

SAETHER, H.V.; HOLME, H. K.; MAURTAD, G.; SMIDSOD, O.; STOKKE, B.T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. 2008.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.

SANTUS, G.; BAKER, R. W. Pharmaceuticals, Controlled Release of. In: EDITOR-INCHIEF: ROBERT, A. M. (Ed.). *Encyclopedia of Physical Science and Technology* (Third Edition). New York: Academic Press, 2003. p.791-803. ISBN 978-0-12-227410-7.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 5, 726-737, 2003.

SCHATZ, C.; DOMARD, A.; VITON, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules*, Vol. 5, No. 5, 2004.

SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A.; MALMONGE, Sônia M. and SOUTO, Eliana B.. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros [online]* 2011, vol.21, n.5, pp.361-368. Epub Nov 23, 2011. ISSN 0104-1428.

SEZER, A. D., & AKBUGA, J. (1999). Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 16(6), 687-696.

SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.; GLAVAS DODOV, M.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, n. 3, p. 565-578, 2008.

SINHA, R.; KIM, G. J.; NIE, S.; SHIN, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 8, p. 1909-17, 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, n. 1–2, p. 19-38, 2001.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 18, n. 1, p. 3-18, 2003.

SOLOMONS, T. W. Graham; Fryhle, Craig B. *Química Orgânica*, vol. 1 e 2, 8ª ed. LTC, Editora S.A: Rio de Janeiro, 2005.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 1, p. 54-59, 2010.

Sulfato de polimixina B equivalente a 500.000 UI de polimixina B base. Resp. Téc: Joyce Ap. Pires Bueno Tonelli Porto. CRF-SP 38.678. São Paulo: Opem Representação Importadora Exportadora e Distribuidora Ltda. 2015. Bula de remédio.

TAKAHASHI, T., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y., & NAGAI, T. (1990). Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. *International Journal of Pharmaceutics*, 61(1-2), 35-41.

TORCHILIN, V. P. Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 11, Supplement 2, n. 0, p. S81-S91, 2000.

VALADARES, L. F.; LINARES, E. M.; GALEMBECK, F. Electrostatic Adhesion of Nanosized Particles: The Cohesive Role of Water. *J. Phys. Chem. C*, Vol. 112, No. 23, 2008.

VARUM, F. J.; VEIGA, F.; SOUSA, J. S.; BASIT, A. W. An investigation into the role of mucusthickness on mucoadhesion in the gastrointestinal tract of pig. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 4, p. 335-341, 2010.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 255, n. 1–2, p. 13-32, 2003.

VILLANOVA, Janaina C. O.; OREFICE, Rodrigo L. and CUNHA, Armando S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros [online]* 2010, vol.20, n.1, pp.51-64. Epub Mar 05, 2010. ISSN 0104-1428.

VLLASALIU, D.; EXPOSITO-HARRIS, R.; HERAS, A.; CASETTARI, L.; GARNETT, M.; ILLUM, L.; STOLNIK, S. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 400, n. 1–2, p. 183-193, 2010.

WANG, C.; HO, P. C.; LIM, L. Y. Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 400, n. 1-2, p. 201-10, 2010.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? *Clin. Pharmacokinet*, v.40(2), p. 77-84, 2001.

WU, D. Y.; MEURE, S.; SOLOMON, D. Self-healing polymeric materials: A review of recent developments. *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 5, p. 479-522, 2008.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2003.

YANG, F.; XIA, S.; TAN, C.; ZHANG, X. Preparation and evaluation of chitosan-calciumgellan gums beads for controlled release of protein. *European Food Research And Technology*, v. 237, n. 4, p. 467-479, 2013.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 235, n. 1-2, p. 115, 2002.

ZHANG, J.; LI, X.; ZHANG, D.; XIU, Z. Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying. *Journal of Microencapsulation*, v. 24, n. 4, p. 303-322, 2007.