

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

CRISTIANE DO NASCIMENTO SAVIANI

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas
poliméricas com propriedades mucoadesivas para o
tratamento de câncer colônico.**

Araraquara
2016

CRISTIANE DO NASCIMENTO SAVIANI

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas
poliméricas com propriedades mucoadesivas 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

Coorientadora: Fabíola Garavello
Prezotti

Araraquara
2016

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó por me acompanharem nessa jornada, mesmo à distância. Agradeço o apoio que me deram quando tudo pareceu complicado demais e por me lembrarem todos os dias que eu sempre terei um lugar para voltar, caso eu resolva partir. Ao meu pai, sempre confiante e sereno, por me transmitir tranquilidade; à minha mãe, por compartilhar comigo toda a luz, fé e amor durante todos os dias desses últimos cinco anos; ao meu irmão, por descontrair meus finais de semana e à minha avó, por todos os *Nam-myoho-rence-kyo* milagrosos destinados à minha felicidade. A vocês, o meu sentimento de eterna gratidão.

Agradeço ao Bruno, meu amor e melhor amigo, por toda a paciência que dedicou a mim e por todos os momentos maravilhosos que dividimos, me proporcionando energia para as minhas viagens e para a minha rotina.

Agradeço imensamente a minha casa em Araraquara, a República Lolitas. Todas que dividiram comigo essa história, que entenderam a minha ausência e que estiveram por perto, tornando colorida e divertida, dentro do possível, essa etapa da minha vida. Um agradecimento especial à Gabriela Harano, que foi minha fiel companheira e cuja falta foi absurdamente sentida quando nossos caminhos foram para direções diferentes.

Minha gratidão aos meus amigos de turma: Ana Tereza, Débora Kawai, Beatriz Cernic, Leandro Giovanni, Tiago Gatti, Raissa Carmona. Os momentos que compartilhamos ficarão guardados com muito carinho na memória.

Agradeço à professora Maria Palmira e à Fabíola, orientadora e co-orientadora, por se disponibilizarem a me ajudar a elaborar este trabalho, sempre com muita paciência e dedicação.

À todas as pessoas da farmacotécnica que estiveram comigo neste período: Fernanda, Liliane, Natália, Valéria, as técnicas Natália e Marga, muito obrigada por toda a ajuda e por me auxiliarem com as minhas dúvidas. Agradeço especialmente ao Jovan Duran, que fez o impossível para me ajudar e por demonstrar uma paciência sem fim.

À CNPQ pelo apoio financeiro por meio de uma bolsa de iniciação científica concedida à realização desse projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da nanoesfera e nanocápsula

Figura 2: Estrutura da goma gelana nativa (A) e desacetilada / baixo grau de acetilação (B)

Figura 3: Estrutura química da pectina

Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional de pectina em presença de íons Ca^{2+}

Figura 5: Processo de obtenção de nanopartículas pelo método de nebulização seguida de geleificação ionotrópica

Figura 6: Espectro de absorção do resveratrol em água destilada

Figura 7: Pico de máxima absorção de soluções de goma gelana, pectina e cloreto de alumínio em água destilada

Figura 8: Curva analítica de absorbância versus concentração de resveratrol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central e valores dos níveis -1, 0 e +1

Tabela 2: Composição das nanopartículas e valores dos níveis das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central

Tabela 3: Valores de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das nanopartículas de goma gelana e pectina obtidas pela técnica de nebulização seguida de geleificação ionotrópica

Tabela 4: Valores de absorvância (médias, DP e CV) da análise de soluções de resveratrol em um curto intervalo de tempo

Tabela 5: Valores de absorvância (médias, DP e CV) da análise de soluções de resveratrol em dias diferentes com manipuladores diferentes

Tabela 6: Exatidão determinada entre os valores teóricos e experimentais das soluções de resveratrol em água

Tabela 7: Eficiência de encapsulação do resveratrol

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	Nanopartículas poliméricas	11
2.2	Goma Gelana.....	12
2.3	Pectina	14
3	OBJETIVOS	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	Principais materiais	18
4.2	Principais equipamentos.....	18
4.3	Planejamento fatorial completo 2 ³ com ponto central	18
4.4	Obtenção das nanopartículas de goma gelana e pectina	19
4.5	Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI).....	20
4.6	Análise de potencial zeta	21
4.7	Rendimento	21
4.8	Validação do método analítico de espectroscopia na região ultravioleta (UV) para quantificar o resveratrol	21
4.8.1	<i>Determinação do espectro de absorção do fármaco na região UV</i>	<i>22</i>
4.8.2	<i>Especificidade</i>	<i>22</i>
4.8.3	<i>Linearidade.....</i>	<i>22</i>
4.8.4	<i>Precisão</i>	<i>22</i>
4.8.5	<i>Exatidão</i>	<i>23</i>
4.8.6	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	<i>23</i>
4.9	Determinação da eficiência de encapsulação	23
4.10	Análise estatística dos resultados	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Análise de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta.....	25
5.2	Rendimento	27
5.3	Validação do método analítico de espectroscopia na região ultravioleta (UV) para quantificar o resveratrol	28

5.3.1	<i>Determinação do espectro de absorção do fármaco na região UV</i>	28
5.3.2	<i>Especificidade</i>	29
5.3.3	<i>Linearidade.....</i>	30
5.3.4	<i>Precisão</i>	31
5.3.5	<i>Exatidão</i>	32
5.3.6	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	32
5.4	Eficiência de encapsulação.....	33
6	CONCLUSÃO.....	35

RESUMO

O aumento no número de casos de câncer indica a necessidade de busca por novas alternativas no tratamento desta doença, destacando-se o câncer de cólon que figura entre os três tipos de câncer mais frequentes, tanto na população masculina quanto na feminina. Devido aos tratamentos convencionais para esse tipo de câncer apresentarem dificuldades em atingir a área afetada com concentrações efetivas de fármaco, a busca por sistemas de liberação cólon-específica tornou-se uma opção promissora para o tratamento desta doença. Nesse contexto, o uso de biopolímeros como a goma gelana e a pectina vem sendo amplamente explorado para o desenvolvimento de diferentes sistemas de liberação de fármacos, devido às características que apresentam, como mucoadesividade e degradação enzimática específica pela microbiota colônica. O resveratrol é um potente antioxidante que tem demonstrado propriedades antitumorais e tem sido alvo de importantes pesquisas. As nanopartículas poliméricas são carreadores de tamanho nanométrico capazes de direcionar fármacos para sítios específicos, promovendo a liberação controlada. No presente trabalho, foram desenvolvidas e caracterizadas nanopartículas poliméricas mucoadesivas de goma gelana:pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol, visando o tratamento do câncer colônico.

Palavras chaves: Nanopartículas, Goma gelana; Pectina; Resveratrol; Câncer colônico.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública do mundo especialmente entre os países em desenvolvimento. A estimativa realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes causadas por essa doença no mundo, no ano de 2030 (Oncoguia, 2015).

No Brasil, a estimativa realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para os anos de 2016 e 2017 prevê a ocorrência de 600 mil novos casos da doença. O perfil epidemiológico observado demonstra que o câncer de intestino é o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres e o terceiro em homens, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, representando 8,6% e 7,8% dos casos, respectivamente (Inca, 2016a).

O câncer colorretal pode acometer o intestino grosso e o reto, entretanto é um tumor que apresenta bom prognóstico quando diagnosticado precocemente (Inca, 2016b). Apesar disso e levando em consideração o alarmante crescimento de casos da doença no mundo, outras formas de tratamento são necessárias além daquelas já estabelecidas, como a radioterapia e a quimioterapia.

Pesquisas recentes indicam que é possível fazer a utilização de agentes naturais de forma isolada ou em combinação com terapias tradicionais para a prevenção e tratamento do câncer. Neste contexto o resveratrol, potente antioxidante e anti-inflamatório, tem sido amplamente estudado por seus efeitos terapêuticos e benéficos para a saúde, apresentando efeito quimiopreventivo no tratamento de diversos tipos de câncer (Singh, Ndiaye *et al.*, 2015; Wang, Chen *et al.*, 2016; Shen, Xu *et al.*, 2017).

O resveratrol é um composto polifenólico natural encontrado principalmente em vinho tinto e na casca e sementes da uva, nas duas formas isoméricas, *cis* e *trans*. Estudos têm demonstrado que o resveratrol apresenta diversos benefícios para a saúde, entre eles a ação cardioprotetora, antiplaquetária, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (Kuršvietienė, Stanevičienė *et al.*, 2016).

Como terapia anticâncer, sabe-se que o resveratrol interfere em diversos mediadores intracelulares, induzindo a apoptose em células cancerígenas e participando de todas as fases da oncogênese. Já foi comprovado que este polifenol é capaz de suprimir a proliferação de vários tipos de câncer, entre eles o câncer de cólon (Kuršvietienė, Stanevičienė *et al.*, 2016).

Apesar dos indícios de seus efeitos terapêuticos, o resveratrol apresenta propriedades farmacocinéticas que dificultam o seu uso no tratamento do câncer. Um dos problemas apresentados é a sua rápida metabolização pelo trato gastrointestinal, diminuindo a sua biodisponibilidade. Além disso, em geral, os compostos fenólicos não são facilmente incorporados em formulações devido à rápida liberação, baixa solubilidade e permeabilidade (Liang, Liu *et al.*, 2013; Singh, Ndiaye *et al.*, 2015; Faridi Esfanjani e Jafari, 2016).

A administração da concentração terapêutica ideal do fármaco é um dos principais desafios no tratamento do câncer. O almejado para as terapias anticâncer é um sistema capaz de carrear o fármaco para o sítio de ação ou absorção em uma concentração terapêutica ideal, além de permitir que o fármaco permaneça no local do tumor por um período de tempo que permita a liberação controlada do fármaco. Neste contexto, a nanotecnologia tem sido amplamente empregada como sistema de liberação controlada de fármacos e como estratégia para aumentar a sua biodisponibilidade pela via oral (Eltayeb, Stride *et al.*, 2016; Pandey, Patel *et al.*, 2016).

Para que sejam utilizadas como sistema de liberação controlada, as nanopartículas devem ser estáveis, não tóxicas, encapsular o fármaco de forma efetiva e permitir a liberação quando este chega ao sítio de ação ou absorção. Estudos têm utilizado biopolímeros, como a goma gelana e pectina, na obtenção de nanopartículas, pois estes apresentam propriedades como atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de serem capazes de interagir com estruturas biológicas (Parraga, Zorzi *et al.*, 2014; Christopher, Kulandainathan *et al.*, 2016; Eltayeb, Stride *et al.*, 2016).

Diversos métodos podem ser empregados na obtenção de nanopartículas, como o preparo de emulsão múltipla, evaporação de solvente, spray drying e geleificação ionotrópica (Assis, Zavareze *et al.*, 2012; Wang, Hu *et al.*, 2016).

A geleificação ionotrópica consiste em um método que utiliza a transição de uma solução dos polímeros para uma fase em gel, na presença de íons de cargas contrárias à carga dos polímeros utilizados, desencadeando a formação de uma rede por meio da reticulação entre os íons de cargas contrárias. (Patil, Chavanke *et al.*, 2012).

Neste trabalho, nanopartículas poliméricas de goma gelana e pectina contendo resveratrol como fármaco foram obtidas pelo método de nebulização, seguida de geleificação ionotrópica em solução de cloreto de alumínio. O sistema foi caracterizado quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, rendimento e eficiência de encapsulação. Buscou-se avaliar a influência de parâmetros como proporção e concentração polimérica e concentração da solução reticulante nas características das nanopartículas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

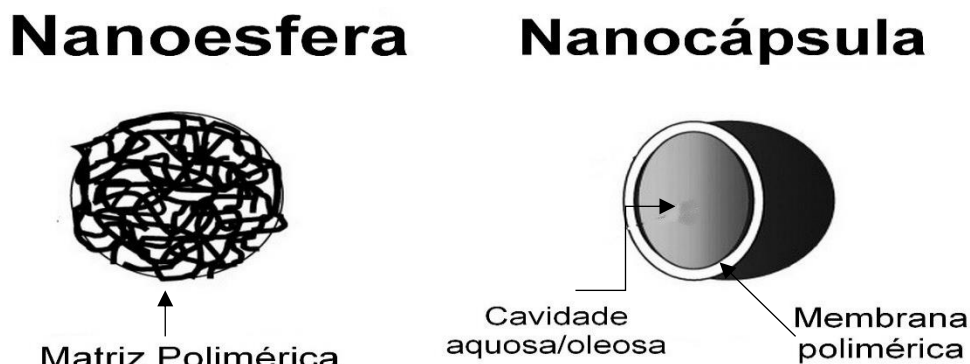
2.1 Nanopartículas poliméricas

A cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia são os quatro métodos mundialmente utilizados na terapia do câncer. Contudo, apresentam deficiências como elevada toxicidade, baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral, biodistribuição inadequada e a ação do fármaco também em células saudáveis, ou seja, falta de seletividade (Masood, 2016).

Para contornar os problemas apresentados pelas terapias convencionais, sistemas de liberação de fármacos têm sido amplamente estudados. Neste contexto, as nanopartículas representam um importante papel por melhorarem as propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas e farmacocinéticas do fármaco carregado, podendo proporcionar melhorias no tratamento (Mattos, Altmeyer *et al.*, 2016).

Há duas estruturas de nanopartículas, as nanoesferas e nanocápsulas, representadas na Figura 1. As nanoesferas são sistemas no qual o fármaco se encontra disperso na matriz, e devido ao seu reduzido tamanho e extensa área superficial, é um sistema que facilita a liberação do fármaco a um alvo específico. As nanocápsulas, por sua vez, são sistemas vesiculares que protegem o fármaco da degradação ou hidrólise, pois este se localiza dentro de uma cavidade que pode ser aquosa ou oleosa, protegida por uma camada polimérica externa (Fonte, Reis *et al.*, 2016; Shaalan, Saleh *et al.*, 2016).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da nanoesfera e nanocápsula



Fonte: Adaptada de Brigger, Dubernet *et al.* (2012)

Dependendo da composição da superfície da nanopartícula, esta pode afetar a distribuição do fármaco e interagir com células e tecidos. Além disso, é um sistema que pode melhorar as propriedades farmacêuticas e farmacológicas de um fármaco, sem que seja preciso modificar sua molécula. Podem carrear moléculas com diferentes propriedades físico-químicas, proteger o fármaco da inativação hepática, degradação enzimática ou do clearance, além de reduzir os efeitos adversos do tratamento (Sun, Wu *et al.*, 2015; Mattos, Altmeyer *et al.*, 2016).

Atualmente, as nanopartículas poliméricas compostas por polissacarídeos naturais tem sido foco de importantes estudos por serem biodegradáveis, biocompatíveis e por apresentarem fácil design e preparação (Faridi Esfanjani e Jafari, 2016). Devido às propriedades apresentadas, as nanopartículas representam um sistema promissor para a encapsulação, podendo proporcionar a liberação controlada de fármacos diretamente no sítio alvo, sendo amplamente estudadas para reduzir os efeitos adversos da terapia anticâncer, além de melhorar a distribuição e biodisponibilidade do fármaco a ser carregado, podendo aumentar a eficácia terapêutica.

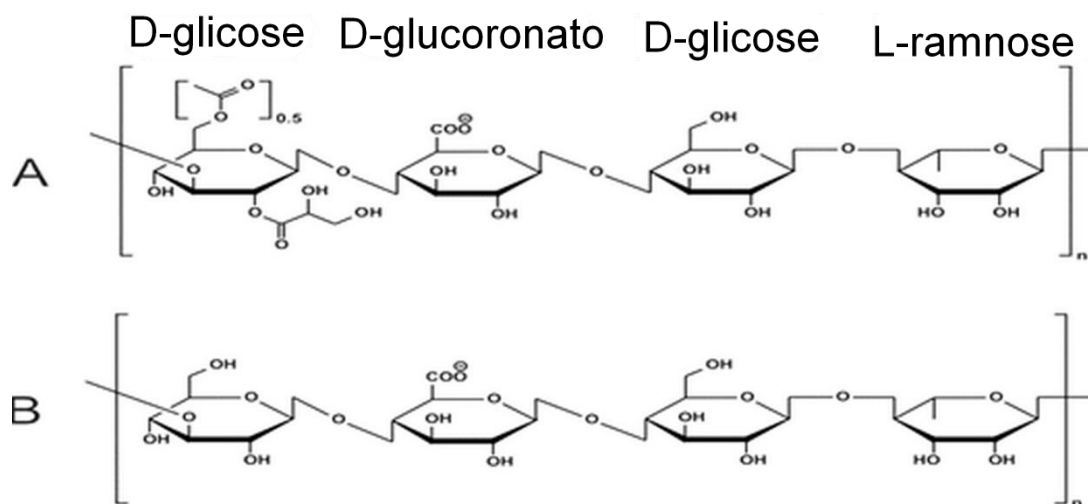
2.2 Goma gelana

A goma gelana é um exopolissacarídeo bacteriano produzido aerobicamente pela *Sphingomonas elodea* (Patil, Chavanke *et al.*, 2012) utilizada em indústrias alimentícia e farmacêutica, entre outras, devido à sua estrutura e propriedades físicas, sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Pode ainda ser utilizada como agente emulsificante, aglutinante, gelificante, espessante, entre outras aplicações (Prajapati, Jani *et al.*, 2013; Prezotti, Cury *et al.*, 2014).

Esse polissacarídeo apresenta unidades de β -D-glicose, L-ramnose e ácido D-glicurônico, com composição em sua estrutura nativa de aproximadamente 60%, 20% e 20%, respectivamente. Ao passar por um processo de hidrólise alcalina a goma gelana perde os grupamentos acetil e gliceril presentes na estrutura nativa, resultando na goma gelana desacetilada, de baixo ou alto grau de acetilação. Essa mudança altera o tipo de gel que a

goma gelana é capaz de produzir, resultando em géis mais frágeis, mas com maior estabilidade térmica (Prajapati, Jani *et al.*, 2013). Na Figura 2 estão esquematizadas as estruturas da goma gelana nativa e desacetilada.

Figura 2: Estrutura da goma gelana nativa (A) e desacetilada / baixo grau de acetilação (B)



Fonte: Adaptada de Osmałek, Froelich *et al.* (2014)

Por apresentar característica aniônica, a goma gelana é capaz de formar géis fortes em presença de cátions divalentes, como o Ca^{2+} . Estes géis interagem com os fluidos biológicos e apresentam propriedades mucoadesivas. A formação do gel de goma gelana é dependente da temperatura e ocorre quando as cadeias de espirais sofrem uma transição conformacional, formando arranjos em dupla hélice e resultando em estruturas tridimensionais com propriedades moduláveis (De Oliveira Cardoso, Prezotti; Ferreira Cury *et al.*; Prajapati, Jani *et al.*, 2013; Osmałek, Froelich *et al.*, 2014).

Devido às suas propriedades, a goma gelana tem sido estudada como meio de obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos. Estudos relatam que a utilização de géis poliméricos permite um melhor controle da taxa de liberação de fármaco, característica importante em um sistema nanoparticulado de liberação controlada. Embora a reticulação com cátions divalentes seja comum, o estudo realizado por Reddy e Tammishetti (REDDY, T.; TAMMISHETTI, S., 2002) demonstrou que ao utilizar cátions trivalentes, a

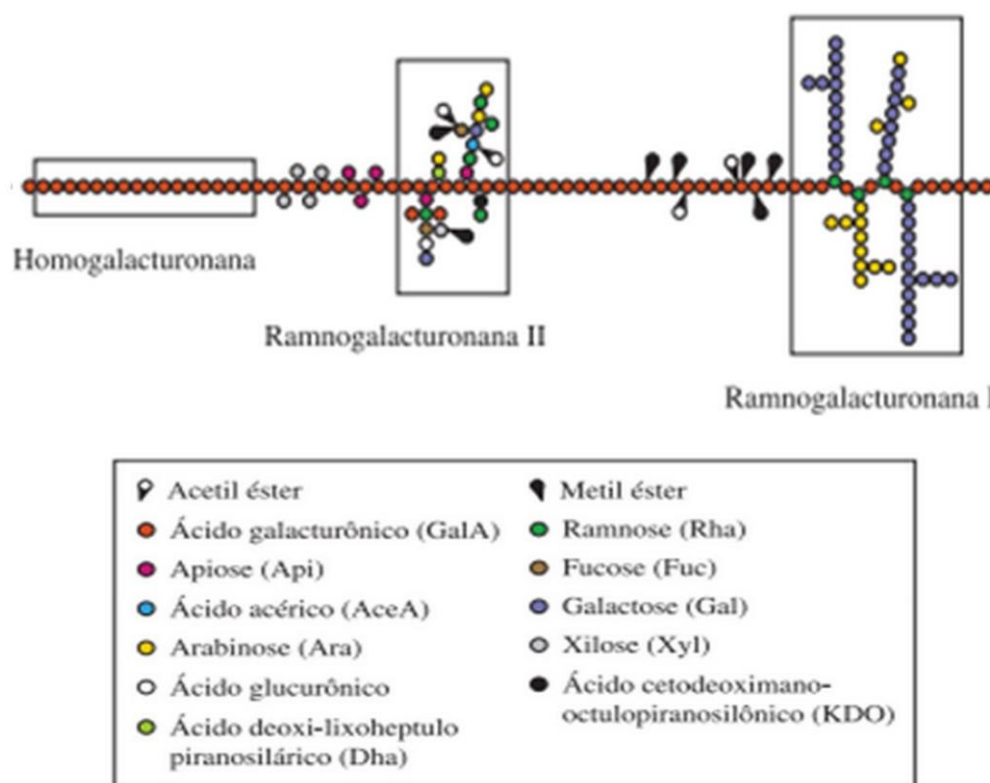
reação de reticulação ocorreu mais rapidamente, possibilitando uma maior eficiência para a incorporação de fármaco e liberação por tempo prolongado (De Oliveira Cardoso, Ferreira Cury *et al.*).

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que a goma gelana possui características importantes para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas de liberação de fármacos.

2.3 Pectina

A pectina é um heteropolissacarídeo encontrado na parede celular de plantas. Devido a sua capacidade de geleificação e por tratar-se de um polímero biocompatível, biodegradável e atóxico. Assim como a goma gelana, seu uso tem sido frequente na indústria farmacêutica e alimentícia, podendo ser utilizada como agente espessante, emulsionante e como veículo para fármacos, além de outras aplicações (Zhang, Xu *et al.*, 2015; Kyomugasho, Christiaens *et al.*, 2016).

Sua abundância e fácil extração tornam a pectina uma matéria-prima de baixo custo. É um biopolímero solúvel em água e com capacidade de bioadesão. Estruturalmente (Figura 3) a pectina é formada por três estruturas principais: homogalacturonana (HG), a qual representa a maior parte da estrutura química, ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II) (Kyomugasho, Christiaens *et al.*, 2016; Ye, Zhan *et al.*, 2016).

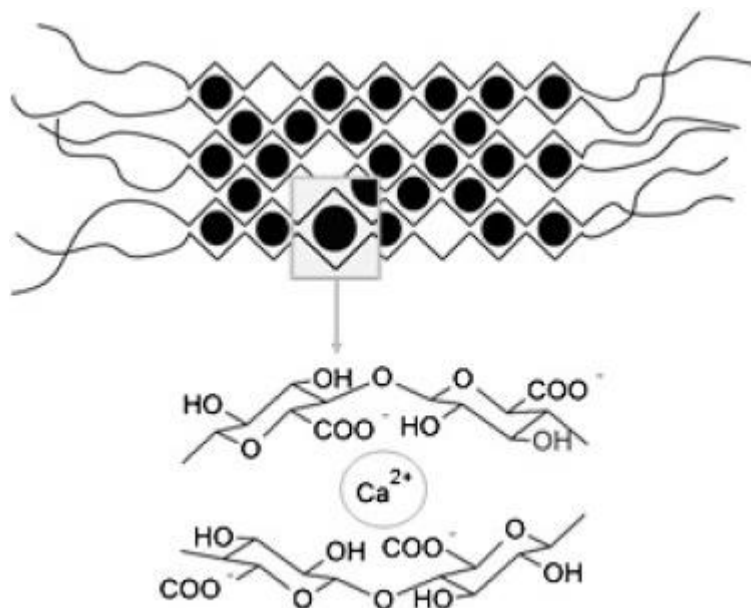
Figura 3: Estrutura química da pectina

Fonte: Adaptado de Canteri, Moreno *et al.* (2011)

HG, considerada a cadeia principal da estrutura da pectina, é composta por resíduos de ácido D-galacturônico ligados por meio de ligações glicosídicas α -1,4. Estes resíduos podem ser metilesterificados em C-6 e/ou o-acetilados em O-2 e/ou O-3 (Kyomugasho, Christiaens *et al.*, 2016). A pectina pode ser classificada em alto e baixo grau de metoxilação (HM e LM, respectivamente) e cada uma delas apresenta diferentes aplicações industriais (Zhang, Xu *et al.*, 2015).

O padrão de metoxilação da pectina pode influenciar na sua capacidade em formar géis, que se formam a partir da associação de cadeias de pectina formando uma estrutura tridimensional. Com a pectina de baixo grau de metoxilação, por exemplo, ocorre a formação de um gel pouco resistente. Para modificar a estrutura dos géis, é comum utilizar cátions divalentes como reticulantes, resultando na formação das estruturas tridimensionais. Neste caso, uma maior quantidade de cátions divalentes seria necessário para formar um gel mais forte utilizando pectina LM (Brasil, 2014). A Figura 4 representa a formação da cadeia tridimensional em presença de um cátion divalente.

Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional de pectina em presença de íons Ca^{2+}



Fonte: Lascol, Bourgeois *et al.* (2016)

A formação dessa estrutura tridimensional em presença de cátions é uma característica de interesse para a obtenção de sistemas nanoestruturados devido à capacidade de formação de uma rede que possibilitaria a encapsulação do fármaco.

Assim como a goma gelana, a pectina tem sido estudada para compor sistemas de liberação específica de fármacos devido a sua capacidade de formar géis. Além disso, estudos aprontam mecanismos anti-tumorais para a pectina, entre eles a inibição do crescimento do tumor e regulação dos oncogenes, além da sua propriedade probiótica, o que torna a pectina um alvo para estudos sobre câncer colônico (Zhang, Xu *et al.*, 2015).

A mistura de biopolímeros naturais têm sido o foco de estudo do nosso grupo de pesquisa, afim de obter carreadores de fármaco que possam ser modulados para as necessidades específicas. Assim, a goma gelana e pectina foram utilizadas para a obtenção de nanopartículas pelo método de nebulização seguida de geleificação ionotrópica utilizando um cátion trivalente (Al^{3+}) como agente reticulante.

3 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas mucoadesivas de goma gelana e pectina para a liberação cólon-específica do resveratrol através da técnica de nebulização seguida de geleificação ionotrópica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Principais materiais

- Goma gelana (Kelcogel® CG-LA, CP Kelco)
- Pectina (Genu® LM 5206-CS, CP Kelco)
- Cloreto de alumínio hexahidratado (Labsynth)
- Resveratrol (Galena®)
- Hidroxipropilmetilcelulose (Colorcon®)

4.2 Principais equipamentos

- Balança analítica (Classic Plus, Mettler Toledo)
- Agitador magnético (752 A, Fisatom)
- Bomba dosadora peristáltica (BP 200, Milan®)
- Nebulizador de leite fluidizado (Minilab XP, DIONAS Diekers & Söhne)
- Centrífuga (Spectrafuge 16M, Labnet)
- Ultracentrífuga (Himac CP 80β, Hitachi)
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- Espectrofotômetro (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies)
- Ultrafreezer -80°C (CFC Free, Sanyo)
- Liofilizador (Savant MicroModulyo, Thermo Scientific)

4.3 Planejamento fatorial completo 2³ com ponto central

Para a obtenção das nanopartículas com diferentes composições, foi realizado um planejamento fatorial do tipo completo 2³ com ponto central. As três variáveis independentes ou fatores escolhidos foram a proporção entre goma gelana e pectina, a concentração de agente reticulante cloreto de alumínio e a concentração polimérica. As variáveis dependentes estudadas foram tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Os fatores escolhidos para o planejamento fatorial completo e os valores de cada nível, em que -1, 0 e +1 são os códigos para o nível baixo, ponto central e nível alto, respectivamente, estão apresentados na Tabela 1.

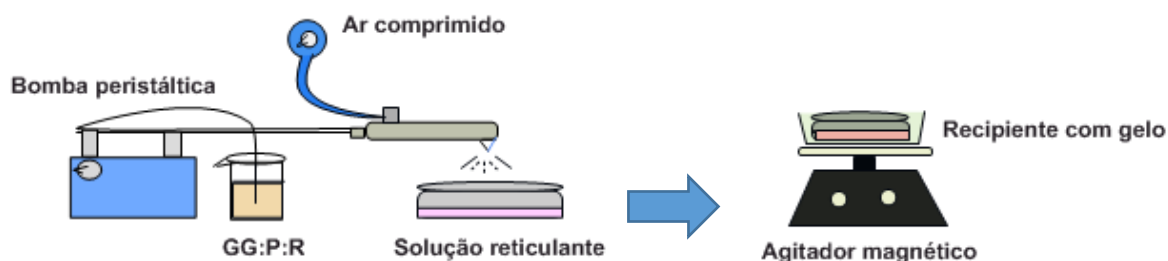
Tabela 1: Fatores avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central e valores dos níveis -1, 0 e +1.

Fatores	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
(1) Proporção polimérica (G:P)	1:1	2:1	4:1
(2) Cloreto de alumínio (%)	0,50	1,75	3,00
(3) Concentração polimérica – G:P (%)	1,00	1,50	2,00

4.4 Obtenção das nanopartículas de goma gelana e pectina

Nanopartículas foram obtidas pelo método de nebulização seguida de geleificação ionotrópica (Figura 5), utilizando cloreto de alumínio como agente reticulante e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como estabilizante, por se tratar de um polímero capaz de proporcionar estabilização estérica para as nanossuspensões (Karakucuk, Celebi *et al.*, 2016).

Figura 5: Processo de obtenção de nanopartículas pelo método de nebulização seguida de geleificação ionotrópica.



Fonte: Elaborada pela autora

Dispersões aquosas (50 mL) de misturas de goma gelana:pectina (1:1, 2:1 e 4:1), em diferentes concentrações (1,0; 1,5 e 2,0%, m/V) foram preparadas sob agitação magnética (80°C) durante 20 minutos, para a completa dispersão dos polímeros. O fármaco resveratrol (0,25%, m/V) foi adicionado às dispersões poliméricas (30°C) sob agitação magnética até completa solubilização (15 min), ao abrigo da luz devido ao fármaco ser fotossensível, ou seja, sofrer degradação em presença de luz.

As dispersões foram nebulizadas sobre 200 mL de solução reticulante (AlCl_3) a 4°C em diferentes concentrações (0,5; 1,75 e 3,0% m/V), contendo HPMC (0,2% m/V), sob agitação magnética. Utilizou-se o sistema nebulizador de um leito fluidizado ligado a uma fonte de ar comprimido, a uma pressão de 7 Psi.

A reação de reticulação foi mantida por 20 min adicionais sob agitação magnética em banho de gelo. As composições das nanopartículas obtidas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das nanopartículas e valores dos níveis das variáveis selecionadas para o planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central.

Nanopartícula	Proporção polimérica (G:P)	Concentração AlCl_3 (%)	Concentração polimérica (%)
1	1:1 (-1)	0,50 (-1)	1,0 (-1)
2	4:1 (+1)	0,50 (-1)	1,0 (-1)
3	1:1 (-1)	3,00 (+1)	1,0 (-1)
4	4:1 (+1)	3,00 (+1)	1,0 (-1)
5	1:1 (-1)	0,50 (-1)	2,0 (+1)
6	4:1 (+1)	0,50 (-1)	2,0 (+1)
7	1:1 (-1)	3,00 (+1)	2,0 (+1)
8	4:1 (+1)	3,00 (+1)	2,0 (+1)
9	2:1 (0)	1,75 (0)	1,5 (0)

As nanossuspensões obtidas foram utilizadas para avaliar o potencial zeta, tamanho de partícula e o PDI em equipamento Zetasizer Nano-ZS® (Malvern Instruments).

4.5 Análise de tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering) foi utilizada para avaliação do tamanho de partícula e índice de

polidispersidade (PDI) das nanopartículas. As análises foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments).

4.6 Análise de potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi avaliado em equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments) e foi medido através da mobilidade eletroforética.

4.7 Rendimento

O rendimento do processo foi calculado por método gravimétrico. Congelou-se as nanossuspensões (-80° C) por 24 horas e liofilizou-se cada amostra por 72 horas. O rendimento das nanopartículas foi calculado de acordo com a Equação 1, em que a massa total é a soma das massas de polímeros, fármaco e cloreto de alumínio utilizadas na obtenção de cada amostra (Al-Qadi e Remuñán-López, 2014).

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{\text{Massa das nanopartículas liofilizadas}}{\text{Massa total}} \times 100 \quad (1)$$

4.8 Validação do método analítico de espectroscopia na região ultravioleta (UV) para quantificar o resveratrol

De acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por se encaixar na “Categoria I - Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas” os parâmetros avaliados para a validação do método analítico utilizado para quantificar o resveratrol por espectroscopia na região UV foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (Anvisa, 2003).

4.8.1 Determinação do espectro de absorção do fármaco na região UV

Para determinar o comprimento de onda no qual o resveratrol apresenta sua máxima absorção, uma solução deste fármaco (10 µg/mL) foi preparada em água destilada e submetida a uma varredura entre 200 e 400 nm em espectrofotômetro.

4.8.2 Especificidade

Para determinar a especificidade do teste, preparou-se soluções de cloreto de alumínio, goma gelana e pectina, ambas a 2%, em água destilada. Cada uma das soluções foi então submetida a uma varredura entre 200 e 400 nm em espectrofotômetro.

4.8.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir de uma solução-mãe de resveratrol na concentração de 10 µg/mL em água destilada. Para a construção da curva analítica do fármaco, soluções foram preparadas por diluição, em triplicata, em concentrações que variaram de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL.

4.8.4 Precisão

A precisão foi determinada a partir de três soluções de resveratrol (0,5µg/L, 4,0µg/mL e 10µg/mL) preparadas em água destilada. Para determinar a precisão intercorrida, as mesmas concentrações das soluções de fármacos foram analisadas em um outro dia, permitindo assim a comparação entre análises realizadas em períodos diferentes. Para determinar a precisão intra-corrida e inter-corridas, calculou-se então o desvio padrão relativo (CV) utilizando-se a Equação 2 (Anvisa, 2003), em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

4.8.5 Exatidão

A exatidão foi obtida por meio de três diferentes soluções de resveratrol (0,5µg/L, 4,0µg/mL e 10µg/mL) preparadas em água destilada. A Equação 3 (Anvisa, 2003) foi utilizada para fazer o cálculo desse parâmetro, em que C é a concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

$$Exatidão (\%) = \frac{C}{CT} \times 100 \quad (3)$$

4.8.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foram utilizadas três concentrações da solução de resveratrol em concentrações decrescentes (0,5µg/mL, 1,0µg/mL e 1,5 µg/mL), preparadas em água destilada. Realizou-se a leitura das absorbâncias, em triplicata, e os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo do limite de detecção e limite de quantificação de acordo com a Equação 4 e Equação 5 (Anvisa, 2003), em que DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e Média de A é a inclinação a curva de calibração.

$$LD = \frac{3 \times DP \text{ de } B}{Média \text{ de } A} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP \text{ de } B}{Média \text{ de } A} \quad (5)$$

4.9 Determinação da eficiência de encapsulação

Para determinar o teor de fármaco incorporado ao sistema, 5 mL das nanossuspensões foram cuidadosamente transferidas para tubos de

ultracentrífuga (Himac CP 80β, Hitachi). As nanopartículas foram separadas por ultracentrifugação a 50.000 rpm a 15°C por 40 minutos. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies) na região do UV a 305 nm a fim de quantificar a concentração de fármaco livre.

A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação 6 (Gan e Wang, 2007):

$$EE (\%) = \frac{\text{Fármaco total adicionado} - \text{Fármaco livre}}{\text{Fármaco total adicionado}} \times 100 \quad (6)$$

4.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta

O tamanho de partícula é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a estabilidade das nanopartículas. Este parâmetro varia de acordo com a composição da nanopartícula e com o método utilizado para a sua obtenção, podendo ser determinado por meio de diversas técnicas, entre elas o espalhamento de luz dinâmico e difração a laser. Mesmo obtidas por métodos diferentes, geralmente as nanopartículas apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm, apesar de partículas com tamanho entre 50 e 70 nm também serem obtidas (Schaffazick., 2003; Wu, Zhang et al., 2011).

O índice de polidispersão (PDI) indica a homogeneidade de distribuição de tamanho da população de partículas. Considerando uma escala de 0 a 1, os valores mais próximos de 0 indicam homogeneidade nos tamanhos, enquanto os valores maiores do que 0,5 indicam heterogeneidade de tamanho ou populações diferentes de partículas (Gaumet, Vargas et al., 2008; Avadi, Sadeghi et al., 2010).

O tamanho das partículas variou de 140,6 nm a 459,1 nm e o PDI variou de 0,214 a 0,723, como demonstrado na Tabela 3. Apesar dos valores descritos na literatura, o tamanho de partícula está relacionado com a via de administração a qual pretende-se adequar o sistema de liberação proposto. Contanto que seja possível manter um padrão de liberação, para a administração do fármaco por via oral, por exemplo, o tamanho de partícula não seria fundamental, contanto que estejam na escala nanométrica. Isso não é válido para a administração parenteral, em que nanopartículas menores seriam necessárias, dentro dessa mesma escala.

O potencial zeta é o parâmetro que reflete o potencial de superfície de uma partícula, podendo ser influenciado por constituintes da mesma e por mudanças no meio em que esta está inserida. Dos componentes presentes nas nanopartículas, os polímeros são considerados os constituintes com maior influência sob o potencial zeta (SCHAFFAZICK et al., 2003). Neste estudo, porém, foi possível observar que a quantidade de cloreto de alumínio

adicionada à formulação estava mais relacionada com o potencial zeta do que a proporção e concentração polimérica.

Este parâmetro é capaz de indicar a estabilidade físico-química da partícula. Valores de potencial zeta acima de 30 mV, em módulo, indicam partículas estáveis devido às forças repulsivas entre as partículas, impedindo a agregação entre as mesmas (Teixeira, Alonso et al., 2005).

Além disso, a característica da superfície das partículas estudadas é importante para analisar a resposta biológica do fármaco contido nas nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Acredita-se que a introdução de um polímero catiônico pode fornecer potencial positivo às partículas, podendo facilitar a interação entre as nanopartículas e as membranas biológicas, carregadas negativamente (Calvo, Remuñán-López *et al.*, 1997), melhorando a sua biodisponibilidade e diminuindo os efeitos adversos (Parveen, Mitra et al., 2010).

O potencial zeta das amostras em estudo variou de +0,256 mV a +3,835 mV, indicando que as amostras são instáveis devido aos valores de potencial muito abaixo de 30 mV, em módulo, podendo ocorrer agregação entre as nanopartículas. Os resultados de potencial zeta são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das nanopartículas de goma gelana e pectina obtidas pela técnica de nebulização seguida de geleificação ionotrópica.

Nanopartícula	Tamanho de partículas (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
1	249,1	0,639	+ 1,520
2	203,1	0,521	+ 0,960
3	257,35	0,2905	+ 0,565
4	221,60	0,626	+ 2,170
5	231,15	0,271	+ 0,964
6	231,05	0,214	+ 0,256
7	216,3	0,723	+ 3,835
8	459,1	0,265	+ 0,538
9	140,6	0,217	+ 1,295

Para a análise do tamanho de partícula, PDI e potencial zeta, utilizou-se o planejamento fatorial. Através do planejamento fatorial é possível avaliar a influência de diferentes variáveis independentes sobre várias respostas (variáveis dependentes). Neste trabalho, buscou-se, através da aplicação de um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com ponto central, conhecer os efeitos principais das variáveis proporção polimérica, concentração de agente reticulante (AlCl_3) e concentração polimérica sobre o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas obtidas pela técnica de nebulização seguida de geleificação ionotrópica.

Por meio da análise fatorial, que permite avaliar a influência de diversos fatores simultaneamente sobre os resultados obtidos (Araujo, 2011), foi possível observar que a concentração e proporção polimérica, bem como a concentração de cloreto de alumínio, não influenciaram significativamente o tamanho de partícula e o PDI. Por outro lado, a maior concentração de AlCl_3 utilizada resultou em partículas com carga de superfície positiva maior, devido à maior quantidade de íons alumínio (Al^{3+}) disponíveis para reagirem com os ânions carboxilatos (COO^-) dos polímeros.

5.2 Rendimento

O rendimento de cada nanopartícula obtida pelo método de nebulização seguida de geleificação ionotrópica foi calculado após a liofilização de cada amostra preparada. A partir dos cálculos realizados com a massa liofilizada e a massa total de componentes adicionados ao processo, obteve-se os valores de rendimento entre 50,71% e 82,20%, apresentando um rendimento médio de 77,34%.

A análise dos resultados permitiu observar que o rendimento do processo foi maior quando a maior concentração polimérica (2%) foi utilizada na obtenção das nanopartículas, enquanto a menor concentração proposta (1%) resultou em um menor rendimento do processo. A mudança na proporção polimérica e na concentração do cloreto de alumínio não influenciou significativamente o rendimento deste processo.

Devido às perdas durante o processo de obtenção das nanopartículas, que se devem principalmente às etapas de transferência da dispersão

polimérica e das nanossuspensões de uma vidraria para outra, valores próximos ao rendimento de 100% não foram obtidos. Além disso, ocorre perda da dispersão polimérica na etapa de nebulização dos polímeros na solução reticulante, em que parte da dispersão dos polímeros fica retida na mangueira da bomba peristáltica.

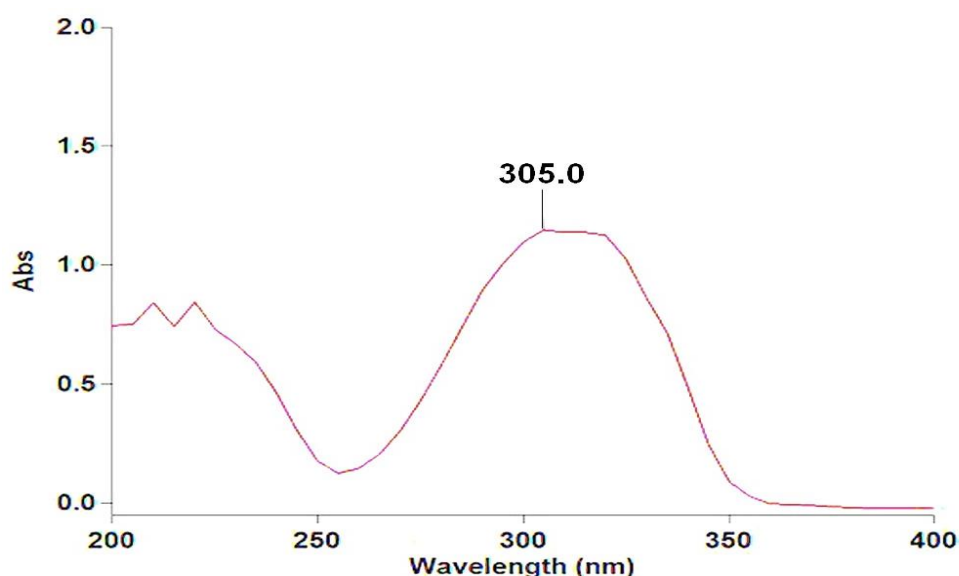
5.3 Validação do método analítico de espectroscopia na região ultravioleta (UV) para quantificar o resveratrol

A validação de um método analítico foi necessária para quantificar o fármaco encapsulado no processo de obtenção das nanopartículas. De acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o método escolhido é apropriado para determinação da eficiência de encapsulação do resveratrol por esse processo.

5.3.1 Determinação do espectro de absorção do fármaco na região UV

Por meio de uma varredura entre 200 e 400 nm utilizando o resveratrol a 10µg/ml em água destilada, determinou-se que o pico de máxima absorção do fármaco ocorre em 305 nm, como mostra o a Figura 6.

Figura 6: Espectro de absorção do resveratrol em água destilada

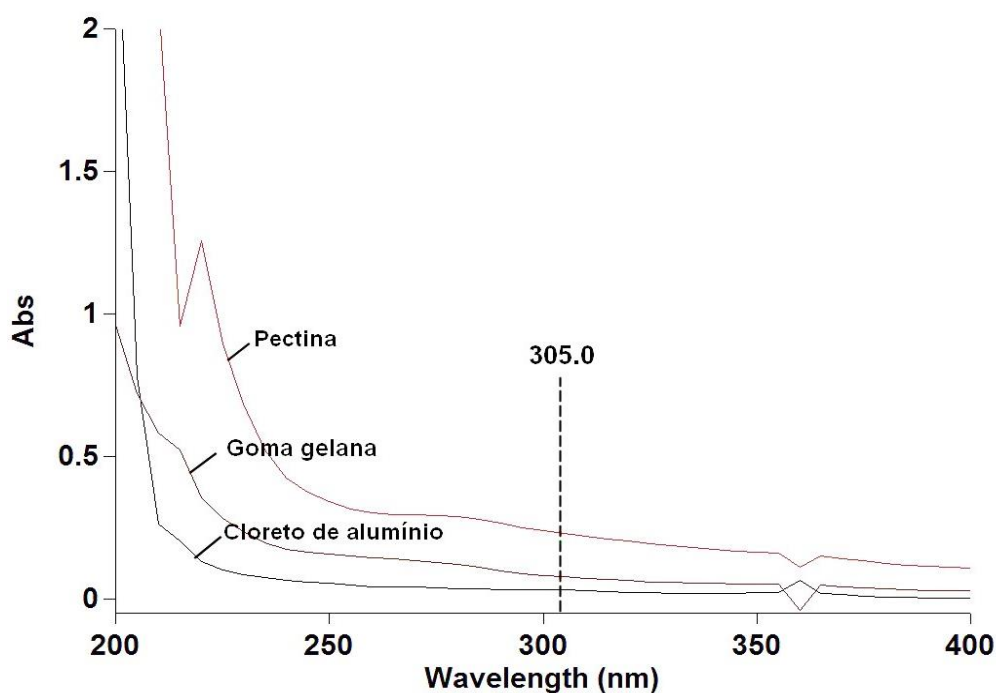


5.3.2 Especificidade

A especificidade, ou seletividade, demonstra a capacidade do método de medir o teor de fármaco mesmo em presença de outros componentes da formulação (Anvisa, 2003), como a goma gelana, pectina e cloreto de alumínio, neste caso.

Para provar que o método em questão é específico, cada componente da formulação das nanopartículas foi submetido a uma varredura entre 200 e 400 nm para observar se estes interferem na quantificação do resveratrol. Os picos de máxima absorção dos componentes estão representados na Figura 7.

Figura 7: Pico de máxima absorção de soluções de goma gelana, pectina e cloreto de alumínio em água destilada.



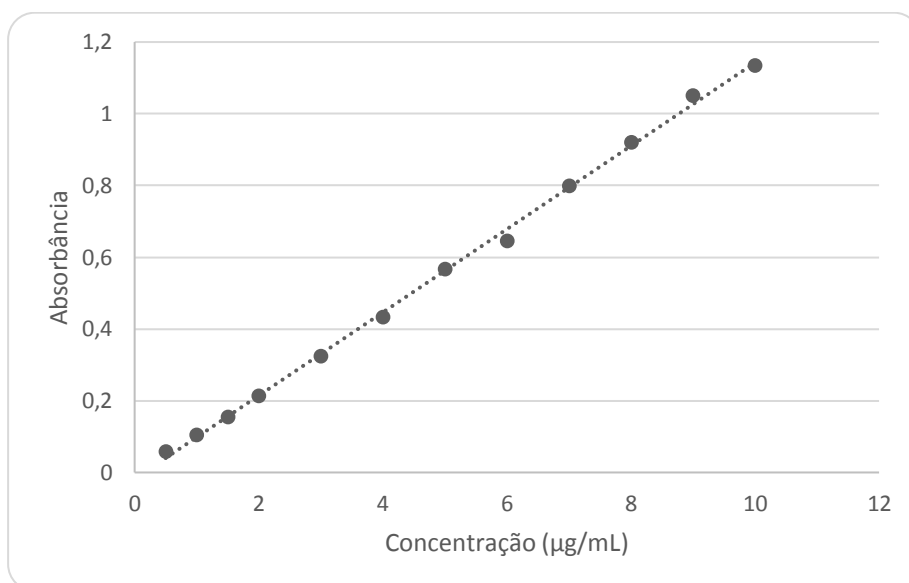
De acordo com o observado na Figura 7 é possível dizer que os polímeros e a solução reticulante não interferem na quantificação do fármaco para cada amostra analisada, pois estes não apresentam pico de absorção em 305.0 nm, tornando o método específico para a quantificação do resveratrol.

5.3.3 Linearidade

A linearidade demonstra a dependência entre dois parâmetros: os resultados obtidos na validação e a concentração de fármaco, mostrando que ambas as medidas são diretamente proporcionais dentro de um intervalo definido (Anvisa, 2003; Inmetro, 2011).

As absorbâncias de cada amostra, medida em triplicata, foram analisadas em 305 nm e calculou-se a média deste parâmetro para cada concentração testada. Com os resultados obtidos, construiu-se uma curva analítica da absorbância em função da concentração (Figura 8).

Figura 8: Curva analítica de absorbância versus concentração de resveratrol



Por meio desta curva analítica determinou-se a equação da reta $y = 0,116x - 0,018$, em que y é a absorbância e X a concentração do fármaco ($\mu\text{g/mL}$). O coeficiente de correlação (r) desta curva foi igual a 0,9985, atingindo o critério mínimo aceitável preconizado pela ANVISA (Anvisa, 2003) e demonstrando que há linearidade para do método.

5.3.4 Precisão

A precisão do método avalia a proximidade dos resultados obtidos em diversas medidas realizadas em uma mesma amostra (Anvisa, 2003).

Para este método foi realizado o estudo da precisão intra-corrida (repetibilidade), que consiste na concordância dos resultados da análise realizada dentro de um curto período de tempo, com os mesmos instrumentos e o mesmo analista. Os resultados obtidos nesta análise estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de absorbância (médias, DP e CV) da análise de soluções de resveratrol em um curto intervalo de tempo

Concentração teórica (µg/mL)	Absorbância média	Desvio padrão	CV (%)
0,5	0,1164	0,0016	1,4173
4,0	0,3718	0,0050	1,3543
10,0	1,1221	0,0061	0,5459

Além disso, foi realizado o estudo de precisão inter-corridas (intermediária), que consiste na análise de resultados obtidos em dias diferentes com analista ou instrumentos diferentes (Anvisa, 2003). Os resultados obtidos nesta análise estão representados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de absorbância (médias, DP e CV) da análise de soluções de resveratrol em dias diferentes com manipuladores diferentes

Concentração teórica (µg/mL)	Absorbância média	Desvio padrão	CV (%)
0,5	0,0593	0,0024	4,1699
4,0	0,4481	0,0078	1,7587
10,0	1,1281	0,0384	3,4068

Em ambos os testes, o coeficiente de variação (CV) obtido para as amostras estava de acordo com o preconizado pelo ANVISA, ou seja, com variação máxima de até 5% (Anvisa, 2003), indicando que o método é preciso.

5.3.5 Exatidão

A exatidão determina a proximidade entre os resultados obtidos experimentalmente, utilizando o método em questão, em relação aos valores teóricos previamente estabelecidos (Anvisa, 2003). Os resultados obtidos para esta análise estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Exatidão determinada entre os valores teóricos e experimentais das soluções de resveratrol em água

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Exatidão (%)
0,5	0,5579	111,58
4,0	3,7425	93,56
10,0	9,8874	98,87

Apesar da exatidão desejada ser de 100%, resultados dentro da faixa de 80% a 120% são aceitos pela legislação vigente (Anvisa, 2003). Logo, os resultados obtidos neste estudo determinam que o método é exato.

5.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção determina a menor quantidade de fármaco que pode ser detectada em uma amostra por meio de uma análise utilizando concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco (Anvisa, 2003).

Por meio da equação proposta, obteve-se que o método é capaz de detectar o fármaco mesmo em baixas concentrações. O limite de detecção obtido foi de 0,6582 µg de resveratrol.

O limite de quantificação determina a menor quantidade de fármaco que pode ser quantificada em uma amostra com precisão e exatidão pelo método escolhido, utilizando concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco para realizar a análise (Anvisa, 2003).

Por meio da equação proposta, obteve-se que o limite de quantificação é 2,1940 µg de resveratrol, quantidade limite do fármaco que o método é capaz de quantificar.

5.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação determina a quantidade de fármaco que foi incorporado às nanopartículas, sendo esta quantidade uma característica importante para a biodisponibilidade e eficácia terapêutica do fármaco (Des Rieux, Fievez et al., 2006). A encapsulação do fármaco pode aumentar a sua proteção contra enzimas e fluidos gastrointestinais, por exemplo, sendo assim consideradas uma possível forma de superar limitações para a administração oral de determinados fármacos (Ensign, Cone et al., 2012).

Os resultados da eficiência de encapsulação das nanopartículas obtidas estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Eficiência de encapsulação do resveratrol (média ± DP).

Nanopartícula	Eficiência de Encapsulação (%)
1	94,48 ± 0,0668
2	91,30 ± 0,2862
3	94,54 ± 0,1066
4	83,84 ± 0,4717
5	93,76 ± 0,1289
6	93,71 ± 0,0412
7	93,83 ± 0,2093
8	94,12 ± 0,1526
9	92,69 ± 0,2585

A eficiência de encapsulação variou de 83,84% a 94,54%, sendo a nanopartícula 3 a que apresentou maior EE%, e a nanopartícula 4 a que apresentou menor EE%.

Analisando as nanopartículas com maior e menor eficiência de encapsulação é possível notar a influência da proporção polimérica na encapsulação do fármaco. A variação da proporção polimérica influenciou de

maneira significativa a EE%, sendo que a proporção 1:1 (G:P) originou partículas com maior EE% (94,54%).

A EE% apresentou um valor médio de 92,47% de fármaco encapsulado, resultado satisfatório que indica a eficiência do método utilizado para encapsular o fármaco no processo de obtenção de nanopartículas.

6 CONCLUSÃO

Nanopartículas poliméricas de goma gelana e pectina contendo resveratrol foram obtidas com sucesso por meio da técnica de nebulização seguida por geleificação ionotrópica. As análises realizadas demonstraram que a concentração e proporção polimérica, bem como a concentração de agente reticulante, não influenciaram significativamente o tamanho e índice de polidispersidade, demonstrando que o bico nebulizador foi o principal responsável pelas características das nanopartículas, pois este foi mantido com o mesmo diâmetro de abertura e taxa de fluxo em todas as amostras. A concentração de cloreto de alumínio, por sua vez, originou partículas com potencial zeta positivo maior, devido a maior quantidade de íons alumínio (Al^{3+}) para reagirem com ânions carboxilatos (COO^-) dos polímeros. O resultado obtido para a eficiência média de encapsulação do fármaco foi de 92,47%, indicando que a maior parte do fármaco foi incorporada com sucesso ao sistema, com rendimento médio do processo de 77,34%, possibilitando concluir que o método empregado mostrou-se eficiente na obtenção de nanopartículas, que poderão ser futuramente empregadas como um sistema de liberação cólon-específico do resveratrol para o tratamento do câncer colônico.

REFERÊNCIAS

AL-QADI, S.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. A micro- and nano-structured drug carrier based on biocompatible, hybrid polymeric nanoparticles for potential application in dry powder inhalation therapy. *Polymer*, v. 55, n. 16, p. 4012-4021, 2014. ISSN 00323861.

ANVISA, A. N. D. V. S. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 2 de junho de 2003.

ARAUJO, J. P. D. D. A aplicação de planejamento estatístico multivariado no desenvolvimento de componentes do motor Diesel. 2011. 85 Comissão de pós graduação em Engenharia Mecânica, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas.

ASSIS, L. M. D. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012. ISSN 1981-6723.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine*, v. 6, n. 1, p. 58-63, Feb 2010. ISSN 1549-9642.

BRASIL, F. I. Pectinas - Propriedades e aplicações. *Revista-Fi*. 29: 8 p. 2014.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, Supplement, p. 24-36, 12// 2012. ISSN 0169-409X.

CALVO, P. et al. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid Polym Sci* 1997.

CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros*, p. 9, 19 Julho 2011.

CHRISTOPHER, G.; KULANDAINATHAN, M. A.; HARICHANDRAN, G. Biopolymers nanocomposite for material protection: Enhancement of corrosion protection using waterborne polyurethane nanocomposite coatings. *Progress in Organic Coatings*, v. 99, p. 91-102, 10// 2016. ISSN 0300-9440.

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*, ISSN 1751-6161.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*, v. 116, n. 1, p. 1-27, Nov 2006. ISSN 0168-3659.

ELTAYEB, M. et al. Electrosprayed nanoparticle delivery system for controlled release. *Materials Science and Engineering: C*, v. 66, p. 138-146, 9/1/ 2016. ISSN 0928-4931.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 64, n. 6, p. 557-70, May 1 2012. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X.

FARIDI ESFANJANI, A.; JAFARI, S. M. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 146, p. 532-543, 10/1/ 2016. ISSN 0927-7765.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 225, p. 75-86, 3/10/ 2016. ISSN 0168-3659.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 59, n. 1, p. 24-34, Sep 1 2007. ISSN 0927-7765.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 69, n. 1, p. 1-9, May 2008. ISSN 0939-6411.

INCA, I. N. D. C. Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2016. 2016a. Tipos de Câncer. Colorretal. 2016b.

INMETRO. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008: Coordenação Geral de Acreditação 2011.

KURŠVIETIENĖ, L. et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina*, v. 52, n. 3, p. 148-155, // 2016. ISSN 1010-660X.

KYOMUGASHO, C. et al. Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties: Cryo-SEM visualisation and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 172-182, 12// 2016. ISSN 0268-005X.

LASCOL, M. et al. Pectin gelation with chlorhexidine: Physico-chemical studies in dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 150, p. 159-165, 10/5/ 2016. ISSN 0144-8617.

LIANG, L. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol in rats. *Phytomedicine*, v. 20, n. 6, p. 558-563, 4/15/ 2013. ISSN 0944-7113.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, v. 60, p. 569-578, 3/1/ 2016. ISSN 0928-4931.

MATTOS, A. C. D. et al. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, p. 83-91, 3/10/ 2016. ISSN 0928-0987.

ONCOGUIA, I. Estimativas de Câncer no mundo. 2015. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>>.

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, 5/15/ 2014. ISSN 0378-5173.

PANDEY, S. K. et al. Controlled release of drug and better bioavailability using poly(lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 99-110, 8// 2016. ISSN 0141-8130.

PARRAGA, J. E. et al. Nanoparticles based on naturally-occurring biopolymers as versatile delivery platforms for delicate bioactive molecules: An application for ocular gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 477, n. 1–2, p. 12-20, 12/30/ 2014. ISSN 0378-5173.

PARVEEN, S. et al. Enhanced antiproliferative activity of carboplatin-loaded chitosan-alginate nanoparticles in a retinoblastoma cell line. *Acta Biomater*, v. 6, n. 8, p. 3120-31, Aug 2010. ISSN 1878-7568 (Electronic) 1742-7061.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A REVIEW ON IONOTROPIC GELATION METHOD: NOVEL APPROACH FOR CONTROLLED GASTRORETENTIVE GELISPHERES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, 20 de junho de 2012 2012. ISSN 09751491.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*, v. 93, n. 2, p. 670-678, 4/2/ 2013. ISSN 0144-8617.

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, p. 286-295, 11/26/ 2014. ISSN 0144-8617.

REDDY, T.; TAMMISHETTI, S. Gastric resistant microbeads of metal ion cross-linked carboxymethyl guar gum for oral drug delivery. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 3, p. 311-318, 2002/01/01 2002. ISSN 0265-2048.

SCHAFFAZICK., S. R. E. A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, p. 11, Fev 2003.

SHAALAN, M. et al. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 3, p. 701-710, 4// 2016. ISSN 1549-9634.

SHEN, Y.; XU, Z.; SHENG, Z. Ability of resveratrol to inhibit advanced glycation end product formation and carbohydrate-hydrolyzing enzyme activity, and to conjugate methylglyoxal. *Food Chemistry*, v. 216, p. 153-160, 2/1/ 2017. ISSN 0308-8146.

SINGH, C. K.; NDIAYE, M. A.; AHMAD, N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1852, n. 6, p. 1178-85, Jun 2015. ISSN 0006-3002.

SUN, L. et al. Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 135, p. 56-72, 11/1/ 2015. ISSN 0927-7765.

TEIXEIRA, M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 59, n. 3, p. 491-500, Apr 2005. ISSN 0939-6411.

WANG, T. et al. Preparation of ultra-fine powders from polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by innovative nano spray drying technology. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 511, n. 1, p. 219-222, 9/10/ 2016. ISSN 0378-5173.

WANG, Z.-M.; CHEN, Y.-C.; WANG, D.-P. Resveratrol, a natural antioxidant, protects monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 83, p. 763-770, 10// 2016. ISSN 0753-3322.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 63, n. 6, p. 456-69, May 30 2011. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X.

YE, X. et al. Pectin based composite nanofabrics incorporated with layered silicate and their cytotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, Part A, p. 123-130, 12// 2016. ISSN 0141-8130.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 44, n. 2, p. 258-271, 8// 2015. ISSN 0924-2244.

DADOS FINAIS

16 de dezembro de 2016

Cristiane do Nascimento Saviani

De acordo,

Prof^a. Dr^a. Maria Palmira Daflon Gremião
(Orientadora)