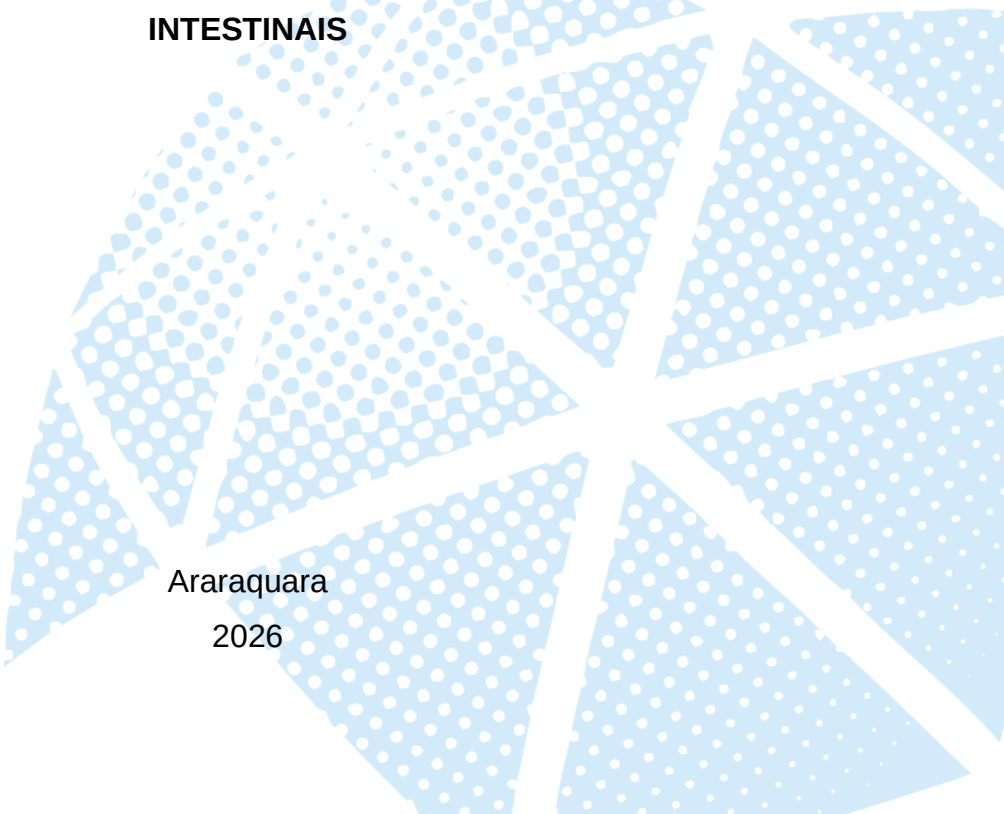


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

ANA JÚLIA ROCHA CARDOSO

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS BASEADAS EM
POLISSACARÍDEOS DESTINADAS À LIBERAÇÃO COLÔNICA DE MESALAZINA
E PROPIONATO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS
INTESTINAIS**

Araraquara
2026



ANA JÚLIA ROCHA CARDOSO

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS BASEADAS EM
POLISSACARÍDEOS DESTINADAS À LIBERAÇÃO COLÔNICA DE MESALAZINA
E PROPIONATO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS
INTESTINAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador(a): Profa. Dra. Suzana Gonçalves Carvalho

Araraquara

2026

C268n	Cardoso, Ana Júlia Rocha Nanopartículas poliméricas mucoadesivas baseadas em polissacarídeos destinadas à liberação colônica de mesalazina e propionato de sódio para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais / Ana Júlia Rocha Cardoso. -- , 2026 128 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião Coorientadora: Suzana Gonçalves Carvalho 1. Nanopartículas. 2. Mesalazina. 3. Liberação colônica. 4. Atividade anti-inflamatória. 5. Quitosana. I. Título.
-------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Nanopartículas poliméricas mucoadesivas baseadas em polissacarídeos destinadas à liberação colônica de mesalazina e propionato para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais

AUTORA: ANA JÚLIA ROCHA CARDOSO

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

COORDINADORA: SUZANA GONÇALVES CARVALHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Prof. Dr. MARCO VINICIUS CHAUD (Participação Presencial)
Departamento de Farmácia / Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Araraquara, 31 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer à Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara (UNESP) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade. Fazer pós-graduação sempre foi uma meta e sem a oportunidade de ingressar e realizar uma pós graduação em uma universidade pública de qualidade. Agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Maria Palmira, por me aceitar como sua aluna de mestrado, por me auxiliar e fazer meu pensamento crítico vir à tona. Também agradecer pela co-orientação da Dra. Suzana Carvalho, que desde o momento em que ouviu meu interesse sobre o mestrado ainda quando eu estava fazendo meu TCC, não hesitou em vir falar comigo para ser minha co-orientadora. Obrigada por ser muito mais do que isso, por ser uma amiga, conselheira e ouvinte.

Gostaria de agradecer a cada um do laboratório, IphaTec, que nunca poupou esforços em ensinar, compartilhar e dividir a rotina, seja passando nervoso com algum equipamento ou seja batendo cabeça em busca de uma solução. Agradecer a Dra. Aline dos Santos pela grande ajuda com os ensaios in vitro e ao Dr. Alberto Júnior pelo auxílio nos ensaios de DSC e TGA. Obrigada a todos do grupo por fazer todo o processo se tornar mais leve e divertido.

Ao Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (Porto, Portugal) e ao grupo Nanomedicines & Translational Drug delivery orientado pelo Prof. Dr. Bruno Sarmento, por todo o tempo, ajuda e infraestrutura disponibilizada durante meu estágio no exterior.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2023/16304-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradecer as minhas amigas, Daphne e Marília. Amigas que surgiram como amigas de faculdade e que agora com certeza são amigas para a vida. Cada tarde conversando em cafeterias superfaturadas, cada risada, cada brincadeira, cada encontro rápido no corredor antes de correr para nossos respectivos laboratórios, com certeza fizeram o processo do mestrado valer a pena.

As minhas amigas da minha cidade natal (Amanda, Lívia, Anna Letícia e Ariane), que me conhecem desde muito pequena e que apoiaram e acompanharam

todo o processo escolar, acadêmico, familiar, que viram minhas escolhas e cada uma das minhas decisões tomadas – mesmo que a distância – que me fizeram ser quem eu sou hoje.

Agradecer a Amanda, minha colega de quarto, amiga e irmã de coração de muitos anos de jornada, que acompanhou mais de perto do que qualquer outro, que ajudou a enxugar cada lágrima, persistir em cada fase e que fez essa etapa ser memorável com muitas histórias que serão contadas para o resto de nossas vidas.

Para minha amiga de infância, vizinha e irmã de coração, Ana Clara. Obrigada por estar em cada fase da vida, cada mudança, cada amadurecimento. Aquela amiga que não hesita em fazer propaganda das conquistas dos amigos aos quatro cantos me fazendo ficar completamente tímida. Saiba que me orgulho em ver quem você se tornou.

E por último, quero agradecer minha família. Aos meus pais que nunca hesitaram ou disseram não as minhas decisões. A eles que priorizaram meus estudos mais do que qualquer coisa, que sempre acreditaram que eu era capaz de conquistar e chegar a qualquer lugar. Obrigada por todo o apoio, amor e noite de jogos aos sábados à noite.

"Não é esplêndido pensar em todas as coisas que existem para serem descobertas? Isso me faz sentir alegria em estar viva; é um mundo tão interessante!"

— Anne Shirley, Anne de Green Gables.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), são condições crônicas caracterizadas por inflamação persistente do trato gastrointestinal. A mesalazina (MLZ) é amplamente utilizada no controle da inflamação, porém apresenta limitações, como efeitos adversos e baixa eficiência decorrente da liberação não direcionada. O propionato (PROP), um ácido graxo de cadeia curta, atua na manutenção da barreira intestinal e possui efeito anti-inflamatório, mas enfrenta problemas de distribuição e direcionamento no trato gastrointestinal. Sistemas nanoestruturados têm sido explorados para otimizar a liberação do fármaco ao sítio de ação. O tratamento das DII é desafiador e a seleção adequada dos componentes poliméricos das NPs pode gerar efeitos sinérgicos. Por outro lado, a co-encapsulação com um ácido graxo de cadeia curta, como o PROP pode potencializar o efeito da MLZ. Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver nanopartículas poliméricas (NPs) à base de polissacarídeos modificados para administração oral de MLZ e PROP, visando liberação colônica direcionada e aumento do potencial de ação local. Inicialmente, foram obtidos sistemas contendo ácido hialurônico (AH), quitosana (QS), com e sem a presença de amido retrogradado (AR) e formados por complexação polieletrólítica. As NPs com AR apresentaram diâmetro hidrodinâmico entre 253 e 212 nm, índice de polidispersão (Pdl) de 0,17 a 0,27 e potencial zeta (PZ) entre 14,8 e 18,3 mV, enquanto as nanopartículas (NPs) sem adição de AR apresentaram um tamanho médio de 303 a 233 nm, Pdl entre 0,27 e 0,22 e PZ de 26 a 29 mV. As interações físico-químicas entre os componentes e a presença dos princípios ativos foram confirmadas por análises térmicas (DSC e TGA) e as interações químicas avaliadas por FTIR. A eficiência de associação (EA%) se manteve em torno de 10% para MLZ e 59% para PROP nas NPs sem AR, e com a obtenção de NPs em formato esférico. Na liberação o sistema mostrou uma melhora em relação aos compostos livres em pH colônico e gástrico. Nos ensaios biológicos *in vitro*, as NPs na ausência de AR apresentaram forte interação com a mucina (MUC) em condições colônicas inflamatórias ou saudáveis, mas baixa interação com MUC em condições gástricas na análise por PZ. As NPs demonstraram ainda, biocompatibilidade em linhagens celulares de Caco-2 e HT29-MTX e em macrófagos Raw 264.7 com e sem a presença de inflamação estimulada por lipopolissacarídeos, com viabilidade celular superior a 80%, além de permeabilidade moderada em modelo intestinal 3D, indicando potencial para retenção

local no tecido inflamado. Ademais, as NPs com e sem MLZ e PROP, apresentaram potencial para diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em comparação aos compostos livres. Em conjunto, os resultados demonstram que os sistemas desenvolvidos apresentam propriedades promissoras para o tratamento das DII, destacando-se pela estabilidade, capacidade de associação e biocompatibilidade in vitro configurando uma abordagem relevante para avaliar potencial da MLZ e PROP.

Palavras-chave: mesalazina; quitosana; ácido hialurônico; atividade anti-inflamatória; nanopartículas poliméricas; liberação colônica.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic conditions characterized by persistent inflammation of the gastrointestinal tract. Mesalazine (MLZ) is widely used to control inflammation, but it has limitations, such as adverse effects and low efficiency due to untargeted release. Propionate (PROP), a short-chain fatty acid, acts in maintaining the intestinal barrier and has an anti-inflammatory effect, but faces problems with distribution and targeting in the gastrointestinal tract. Nanostructured systems have been explored to optimize drug release to the site of action. The treatment of IBD is challenging, and the appropriate selection of polymeric components of nanoparticles (NPs) can generate synergistic effects. On the other hand, co-encapsulation with a short-chain fatty acid, such as PROP, can potentiate the effect of MLZ. In this work, the objective was to develop polymeric nanoparticles (NPs) based on modified polysaccharides for oral administration of MLZ and PROP, aiming at targeted colonic release and increased local action potential. Initially, systems containing hyaluronic acid (HA), chitosan (CH), with and without retrograded starch (RS), formed by polyelectrolytic complexation, were obtained. NPs with RS presented a hydrodynamic diameter between 253 and 212 nm, a polydispersity index (Pdl) of 0.17 to 0.27, and a zeta potential (ZP) between 14.8 and 18.3 mV, while nanoparticles (NPs) without the addition of RS presented an average size of 303 to 233 nm, a Pdl between 0.27 and 0.22, and a ZP of 26 to 29 mV. The physicochemical interactions between the components and the presence of the active principles were confirmed by thermal analyses (DSC and TGA), and the chemical interactions were evaluated by FTIR. The association efficiency (EA%) remained around 10% for MLZ and 59% for PROP in NPs without AR, and with the obtaining of NPs in spherical form. Upon release, the system showed an improvement compared to free compounds at colonic and gastric pH. In in vitro biological assays, NPs in the absence of AR showed strong interaction with mucin (MUC) under inflammatory or healthy colonic conditions, but low interaction with MUC under gastric conditions in PZ analysis. The NPs also demonstrated biocompatibility in Caco-2 and HT29-MTX cell lines and in Raw 264.7 macrophages with and without the presence of lipopolysaccharide-stimulated inflammation, with cell viability greater than 80%, in addition to moderate permeability in a 3D intestinal model, indicating potential for local retention in inflamed tissue. Furthermore, NPs with and without MLZ and PROP showed potential for reducing reactive oxygen species (ROS) levels

compared to the free compounds. Taken together, the results demonstrate that the developed systems exhibit promising properties for the treatment of IBD, standing out for their stability, associativity capacity, and in vitro biocompatibility, configuring a relevant approach to evaluate the potential of MLZ and PROP.

Keywords: mesalazine; chitosan; hyaluronic acid; anti-inflammatory activity; polymeric nanoparticles; colonic release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da mesalazina (MLZ)	24
Figura 2 – Estrutura química do propionato de sódio (PROP)	25
Figura 3 – Estrutura química do ácido hialurônico (AH)	28
Figura 4 – Estrutura química da quitosana (QS)	32
Figura 5 – Representação esquemática da técnica de preparo das nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica contendo mesalazina, quitosana, propionato ácido hialurônico e amido retrogradado (imagens retiradas do Biorender®)	37
Figura 6 – Representação esquemática da técnica de preparo das nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica contendo mesalazina, quitosana, propionato e ácido hialurônico (imagens retiradas do Biorender®)	38
Figura 7 – Representação esquemática do modelo celular tridimensional multicamadas utilizado como biomimético do epitélio intestinal inflamado para os ensaios de permeabilidade das nanopartículas. O modelo foi desenvolvido para reproduzir características estruturais e funcionais da mucosa intestinal inflamada, possibilitando a avaliação do transporte, retenção e interação das formulações nanoestruturadas através da barreira epitelial	44
Figura 8 – Gráficos de distribuição do diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas poliméricas processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C, em que (A) NP_B; (B) NP_MLZ-P; (C) NP_B_AR; D: NP_MLZ-P_AR	49
Figura 9 – Espectros de FTIR dos componentes isolados e das nanopartículas poliméricas. (A) componentes isolados: quitosana (QS), ácido hialurônico (AH), amido retrogradado (AR), mesalazina (MLZ) e propionato (PROP); (B) nanopartículas NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR; e (C) nanopartículas NP_B, NP_MLZ e NP_MLZ-P	52
Figura 10 – Termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC), em que A representa os materiais de partida (MLZ, PROP, QS, AH e AR), B as formulações contendo AR (NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR) e C as formulações sem AR (NP_B, NP_MLZ, NP_MLZ-P) na faixa de 30 a 400 °C. Curvas termogravimétricas (TGA), em que D corresponde as matérias-primas (MLZ, PROP, QS, AH e AR), E as nanopartículas formuladas com AR (NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR) e F sem AR (NP_B, NP_MLZ, NP_MLZ-P) obtidas na faixa de 30 a 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio	56
Figura 11 – Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo das nanopartículas poliméricas submetidas a estabilidade física preliminar por um período de 90	

dias. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	60
Figura 12 – Potencial zeta em função do tempo das nanopartículas poliméricas submetidas a estabilidade física preliminar por um período de 90 dias. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	61
Figura 13 – Fotomicrografias das nanopartículas poliméricas (NP_B, NP_MLZ e NP_MLZ-P) obtidas por MEV-LEO (modelo 440)	65
Figura 14 – Perfil de liberação da mesalazina e do propionato a partir de nanopartículas poliméricas compostas apenas por MLZ e por MLZ e PROP em meio ácido (HCl/KCl; pH 1,2). Cada ponto representa a média ± D.P. de três experiências independentes (n=3)	66
Figura 15 – Perfil de liberação da mesalazina e do propionato a partir de nanopartículas poliméricas compostas apenas por MLZ e por MLZ e PROP em tampão fosfato (pH 6,8). Cada ponto representa a média ± D.P. de três experiências independentes (n=3)	68
Figura 16 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 1,2. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	72
Figura 17 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 5,8. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	74
Figura 18 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 6,8. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C	75
Figura 19 – Viabilidade celular (%) determinada pelo ensaio de resazurina em macrófagos após exposição por 24 h a diferentes concentrações (µg/mL) de mesalazina (MLZ), nanopartículas vazias (NP_B) e nanopartículas carregadas com mesalazina e propionato (NP_MLZ-P). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=2)	76
Figura 20 – Viabilidade celular (%) determinada pelo ensaio de resazurina em células Caco-2 (A)(B) e HT29-MTX (C)(D) após exposição por 4 h e 24 h a diferentes concentrações (µg/mL) de mesalazina livre (MLZ), nanopartículas vazias (NP_B) e nanopartículas carregadas com mesalazina (NP_MLZ). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=2).	80
Figura 21 – Gráfico da variação de TEER ao longo dos 21 dias do crescimento do modelo (A) e das diferentes amostras em diferentes time-points durante o ensaio de permeabilidade	80
Figura 22 – Perfil de permeabilidade (%) em função do tempo (15 min, 30	

min, 1h, 2h e 4h) para a mesalazina livre (MLZ) e encapsulada em nanopartículas poliméricas (NP_MLZ), avaliadas em modelo intestinal 3D nas condições não inflamada (NI) e inflamada (I)	82
Figura 23 – Efeito do tratamento com fármaco (MLZ), metabólito (PROP) e NPs sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por LPS na concentração de 76,57 µg/mL e 38,29 µg/mL (n=2)	85
Figura 24 – Cromatograma da mesalazina (tempo de retenção: 3,138) e do propionato (tempo de retenção: 6,219) nas concentrações de 50 µg mL ⁻¹ e 1000 µg mL ⁻¹ , respectivamente, obtido por UV-DAD em 216 nm	108
Figura 25 – Cromatograma dos componentes da matriz polimérica, ácido hialurônico e quitosana, obtido por UV-DAD em 216 nm	110
Figura 26 – Curva de calibração construída com oito pontos de concentração (5; 10; 17,5; 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 µg/mL), injetados em triplicata, correlacionando a concentração de MLZ com a área do pico cromatográfico detectado a 216 nm	111
Figura 27 – Curva de calibração elaborada com oito concentrações (100; 200; 350; 500; 750; 1000; 1250 e 1500 µg/mL), injetadas em triplicata, representando a relação entre a concentração de PROP e a área do pico cromatográfico em 216 nm	113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Siglas das nanopartículas desenvolvidas e respectivos componentes utilizados em sua formulação. As siglas foram definidas de acordo com a composição de cada sistema nanoparticulado	38
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas poliméricas obtidas nesse estudo. As análises foram realizadas em DLS sob ângulo de detecção de 173° à 25 °C. Os valores representam a média $\pm$ DP de três análises independentes (n=3)	47
Tabela 2 – Distribuição de tamanho a partir de análise no NTA	50
Tabela 3 – Média do percentual de associação e capacidade de carregamento da mesalazina e do propionato em nanopartículas obtidas por complexação quantificadas por CLAE. Os valores representam a média $\pm$ DP de três análises independentes (n=3)	63
Tabela 4 – Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em meio ácido (pH 1,2)	70
Tabela 5 – Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em tampão fosfato (pH 6,8)	71
Tabela 6 – Efeito das variações estequiométricas na proporção da blenda polimérica sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS)	101
Tabela 7 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de ácido hialurônico sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	102
Tabela 8 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de mesalazina sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS)	103
Tabela 9 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de propionato sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS)	104
Tabela 10 – Efeito da variação da técnica de complexação eletrolítica em pré-complexação (PC) e complexação direta (C) sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS)	105
Tabela 11 – Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, área do pico, altura do pico, assimetria, fator cauda e número de pratos teóricos) da MLZ e propionato obtidos na	

avaliação da conformidade do sistema de CLAE para a validação do método.	110
Tabela 12 – Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva da mesalazina	113
Tabela 13 – Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva do propionato	115
Tabela 14 – Resultados da precisão intermediária para MLZ e PROP, obtidos em três diferentes concentrações sob as mesmas condições operacionais	115
Tabela 15 – Resultados da análise de repetibilidade para o fármaco (MLZ) e o pós-biótico (PROP), obtidos por três repetições realizadas pelo mesmo operador e condições operacionais	116
Tabela 16 – Resultados da análise de exatidão do método analítico desenvolvido para quantificação de MLZ por CLAE	117
Tabela 17 – Resultados da análise de exatidão do método analítico desenvolvido para quantificação de PROP por CLAE	117
Tabela 18 – Avaliação da robustez do método analítico para MLZ frente a variações controladas de fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda realizadas em CLAE	118
Tabela 19 – Avaliação da robustez do método analítico para PROP frente a variações controladas de fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda realizadas em CLAE	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
AR	Amido retrogradado
Caco-2	Células do adenocarcinoma colorretal humano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DL	Drug loading (Capacidade de carregamento)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EA%	Eficiência de associação
EROS	Espécies reativas de oxigênio
HIF	Fibroblastos intestinais humanos
HPMEC	Células endoteliais microvasculares pulmonares humanas
HT29-MTX	Células do adenocarcinoma colorretal humano com secreção de muco
I	Inflamada
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLZ	Mesalazina
MUC	Mucina
NI	Não inflamada
NP	Nanopartícula
NP_B	Nanopartícula sem mesalazina e propionato
NP_B_AR	Nanopartícula de amido retrogradado e sem mesalazina e propionato
NP_MLZ	Nanopartícula com mesalazina
NP_MLZ_AR	Nanopartícula de amido retrogradado com mesalazina

NP_MLZ-P	Nanopartícula com mesalazina e propionato
NP_MLZ-P_AR	Nanopartícula de amido retrogradado com mesalazina e propionato
NTA	Análise de rastreamento de partículas
PdI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial zeta
PROP	Propionato
QS	Quitosana
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos leucêmicos de camundongo
RPM	Rotações por minuto
TEER	Resistência elétrica transepitelial
TGA	Análise termogravimétrica
TGI	Trato gastrointestinal
UC	Colite ulcerativa

SUMÁRIO

1

1.INTRODUÇÃO	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1. Doença inflamatória intestinal	25
2.2. Mesalazina	27
2.3. Propionato	29
2.4. Sistemas para liberação cólon-específicos	30
2.5. Biopolímeros	32
2.5.1. Ácido hialurônico	32
2.5.2. Amido retrogradado.....	33
2.5.3. Quitosana	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivos gerais	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Material	38
4.1.1. Principais matérias primas e reagentes.....	38
4.1.2. Cultura celular	38
4.1.3. Equipamentos	38
4.2. Métodos.....	39
4.2.1. Obtenção do amido retrogradado.....	39
4.2.2. Delineamento e obtenção de nanopartículas poliméricas contendo mesalazina e propionato.....	39
4.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas	41
4.2.3.1 Análise do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial e potencial zeta das nanopartículas por DLS.....	41
4.2.3.2 Análise do diâmetro médio, índice span e concentração das nanopartículas por NTA.....	42
4.2.3.3 Caracterização das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier.....	42
4.2.3.4 Caracterização das nanopartículas por análises térmicas	42
4.2.4. Análise da estabilidade física preliminar das nanopartículas	43
4.2.5. Avaliação da Eficiência de Associação (EA%)	43

4.2.6. Análise morfológica das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.2.7. Determinação do perfil de liberação in vitro da mesalazina e do propionato no sistema nano	44
4.2.8. Análise da cinética de liberação de mesalazina e propionato nas nanopartículas	44
4.2.9. Avaliação da performance biológica <i>in vitro</i>	44
4.2.9.1 Estudo da interação entre a mucina e o sistema através do potencial zeta.....	44
4.2.9.2 Avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas em células HT29-MTX e Caco-2	45
4.2.9.3 Avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas em macrófagos.....	45
4.2.9.4 Permeabilidade in vitro em modelo 3D.....	46
4.2.9.5 Capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares.....	48
4.2.10. Análise estatística	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Obtenção e caracterização das nanopartículas poliméricas por DLS.....	49
5.2. Avaliação da distribuição de tamanho e concentração de nanopartículas por análise de rastreamento de nanopartículas	53
5.2.1. Caracterização das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier.....	54
5.2.2. Caracterização das nanopartículas por análises térmicas.....	58
5.3. Avaliação da estabilidade física preliminar das nanopartículas poliméricas	63
5.4. Avaliação da eficiência de associação (EA%)	66
5.5. Análise da morfologia das nanopartículas.....	67
5.5. Estudo do perfil de liberação da mesalazina e do propionato.....	69
5.5.1. Determinação do perfil de liberação in vitro da mesalazina e propionato das nanopartículas.....	69

5.5.2. Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> da mesalazina e propionato....	72
5.6. Avaliação da performance biológica <i>in vitro</i>	75
5.6.1. Estudo da interação entre a mucina e o sistema através do potencial zeta.....	75
5.6.2. Estudo da biocompatibilidade <i>in vitro</i> em células HT29-MTX e Caco-2	79
5.6.3. Permeabilidade <i>in vitro</i> em modelo 3D.....	83
5.6.3.1. Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER).....	83
5.6.3.2. Avaliação da permeabilidade no modelo 3D	85
5.6.3.3. Avaliação da permeabilidade aparente (papp)	87
5.6.4. Capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares.....	88
6. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE A - Otimização da formulação	109
APÊNDICE B - Validação da metodologia analítica para quantificação simultânea de mesalazina e propionato.....	123
REFERÊNCIAS.....	127

1 INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são um conjunto de condições autoimunes que causam inflamações crônicas no trato gastrointestinal (TGI), apresentando uma alta incidência nos países ocidentais e crescimento em todo o mundo (Hracs *et al.*, 2025). Embora a causa específica das DII não seja totalmente elucidada, vários fatores desempenham um papel no seu desenvolvimento, incluindo fatores genéticos, ambientais e imunológicos (Dos santos *et al.*, 2021a; Iliev *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2021). Estudos indicam que parentes de primeiro grau de indivíduos com DII têm um risco maior de desenvolver a doença (Mauduit *et al.*, 2025; Santos *et al.*, 2018; McGovern, 2016). Além disso, fatores ambientais desempenham um papel importante, como hábitos alimentares, consumo de álcool e drogas, uso de medicamentos, estresse e outras comorbidades, contribuindo para o quadro clínico das DII. O componente imunológico também é relevante, envolvendo alterações na microbiota intestinal (disbiose) e no funcionamento das células imunes inatas, levando a um processo inflamatório e respostas imunes anormais (Fallahi *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2025; Monteleone *et al.*, 2025).

As DII mais comuns são as doenças de Crohn e a Colite Ulcerativa, que diferem principalmente na localização da inflamação gastrointestinal. A doença de Crohn pode afetar o intestino delgado e grosso, envolvendo todas as camadas da mucosa e levando a complicações como linfedema e espessamento da parede intestinal. Por outro lado, a colite ulcerativa afeta o cólon e o reto em graus variados, afetando a homeostase inflamatória do cólon e a função de barreira intestinal e absorção (Gajendran *et al.*, 2019; Vieujean *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2021).

Além disso, o desenvolvimento de DII acarretam alterações na fisiologia gastrointestinal. Um exemplo disso é a redução do pH intestinal, que normalmente se situa na faixa de 6,0-7,2, mas nas DII pode cair para a faixa de 2,3-5,5 devido à inflamação no cólon (Brinck, 2025). Essas mudanças impactam a composição da microbiota intestinal e afetam o trânsito intestinal, resultando em episódios de diarreia. Ademais, as DII estão associadas a mudanças na composição, espessura, propriedades físicas e função do muco intestinal. A produção aumentada de muco gera uma camada mais espessa nas áreas inflamadas em comparação com as células saudáveis. Há também um aumento da atividade proteolítica nos tecidos da mucosa, o que pode reduzir a eficiência das enzimas digestivas envolvidas no processo de

trânsito intestinal (Dos santos *et al.*, 2021a). Embora não exista uma cura definitiva para as DII, o tratamento controla os sinais e sintomas nos períodos de remissão da doença, evitando a progressão do quadro clínico e melhorando a qualidade de vida do paciente.

Os tratamentos disponíveis para as DII incluem uma variedade de fármacos que variam em prescrição de acordo com a doença e sua gravidade. A primeira linha de tratamento da UC envolve aminossalicilatos, como mesalazina, balsalazida e sulfassalazina e corticosteróides como dexametasona, prednisona e hidrocortisona. Em casos graves ou refratários há a indicação do uso de inibidores de calcineurina como ciclosporina e tacrolimus. Já na DC, o uso de aminossalicilatos é mais limitado, sendo o foco medicações que controlem a inflamação transmural e sistêmica como os corticosteróides e as tiopurinas, como a azatioprina e 6-mercaptopurina (Khan, 2025; Raine, 2022; Rogler, 2025; Singh, 2025).

A mesalazina (MLZ) apresenta-se como um aminossalicilato amplamente utilizado no tratamento das DII, sendo a primeira linha de tratamento na colite ulcerativa, devido à ocorrência mais branda dos efeitos adversos quando comparada com outros fármacos (Campregher; Gasche, 2011; Raine, 2022). Ela atua inibindo as enzimas COX-1 e COX-2 não permitindo que as prostaglandinas inflamatórias sejam sintetizadas em quadros clínicos leves e moderados (Chebli *et al.*, 2019; Subramanian; Logan, 2011). Entretanto, alguns estudos descritos por Wang, Zhou e Li (2022) e Battepati, Lancaster e Duggan (2024) mostram que em tratamentos longos e em quadros mais graves da doença o paciente pode vir a apresentar problemas renais. Dessa maneira, surge a necessidade de adequações de dosagem, forma farmacêutica e método de liberação (Murray *et al.*, 2020).

Como resposta a esse desafio, a literatura recente tem explorado estratégias para direcionar a terapia de forma mais eficaz, a fim de se obter um efeito mais localizado e seletivo (Ardekani *et al.*, 2024; Zheng *et al.*, 2024). Isso inclui a realização do uso de pró-fármacos, sistemas de liberação dependentes de pH e/ou tempo, ou até mesmo a ativação pela microbiota colônica, sendo esta última a estratégia muito interessante para a liberação precisa do medicamento ao cólon afetado (Hua *et al.*, 2015). Dessa forma, uma das estratégias exploradas para melhorar a liberação do fármaco é a micro e nanoencapsulação dos mesmos. As nanopartículas mostram-se promissoras devido a variabilidade de tamanho, maior superfície de contato e alto controle das taxas de liberação do fármaco, além de

apresentar menos problemas de estabilidade. O tamanho reduzido exibido por esses sistemas auxilia no aumento do tempo de resposta do fármaco, e em seu acúmulo no tecido colônico (Ardekani *et al.*, 2024; Gao *et al.*, 2024; Hua *et al.*, 2015).

Nanopartículas poliméricas (NPs) permitem a incorporação de substâncias ativas em quantidades significativas, protegendo-as durante o trânsito biológico até o local de ação desejado, diminuindo efeitos adversos sistêmicos. A aplicação de polissacarídeos no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas pode apresentar diversas vantagens como baixo custo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, interação celular, interação/modificação química, segurança e vetorização de fármacos (Dos santos *et al.*, 2021b).

Polissacarídeos com propriedades mucoadesivas para o delineamento de sistemas com liberação colônica de fármacos vêm sendo exploradas por nosso grupo de pesquisa no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (Dos santos *et al.*, 2025; Spósito *et al.*, 2025; Carvalho *et al.*, 2024; Politi *et al.*, 2023). O uso de polissacarídeos com tais capacidades mucoadesivas vêm apresentando resultados promissores na modulação das propriedades biofarmacêuticas trazendo aos sistemas mudanças no intumescimento, solubilidade, adesividade, potencial zeta, carga, porosidade, hidrofília, cristalinidade, entre outros, as quais podem modificar os padrões de interação biológica e as propriedades de liberação almejadas (Shao *et al.*, 2025; Sun *et al.*, 2012).

O amido retrogradado (AR) advém do amido nativo, um polímero semicristalino presente em diversas plantas e composto por grânulos com tamanhos que variam de 1 a 100 μm (Dos santos *et al.*, 2021b). No entanto, suas propriedades físicas e químicas podem não ser adequadas para certas aplicações, como a sua alta solubilidade em meios aquosos, que pode comprometer a proteção do fármaco. Portanto, são necessárias modificações prévias por meio de métodos físicos, químicos e/ou enzimáticos (Meneguín, 2018). O amido resistente tipo 3 (AR), é obtido por meio do processo de retrogradação, que envolve o aquecimento do amido em água (gelatinização), resultando na quebra dos grânulos e na liberação dos polímeros da estrutura, isso leva à formação de uma rede tridimensional mais organizada e compacta, com duplas hélices estabilizadas por ligações de hidrogênio. Essas mudanças estruturais conferem ao AR uma maior estabilidade térmica, menor solubilidade em água e maior resistência à ação de enzimas proteolíticas, tornando-o resistente à digestão no estômago e no duodeno, tornando-o uma estratégia eficaz

para a liberação específica no cólon (Bordenave; Janaswamy; Yao, 2014; Meneguín, 2018, Qin *et al.*, 2026).

O ácido hialurônico (AH), por sua vez, é um polissacarídeo de origem natural com características hidrofílicas, sendo composto de unidades de N-acetil-D-glicosamina e ácido D-glucurônico que alternam entre si (Salih *et al.*, 2024). Diversos sistemas de liberação de fármaco explorados nas últimas décadas utilizam do AH como a parte ativa, realizando o direcionamento até a região de interesse. Esse efeito ocorre principalmente devido a sua capacidade de interagir com o receptor CD44, uma glicoproteína transmembrana superexpressa em células inflamatórias, promovendo a internalização do sistema carregado por endocitose mediada por receptor, aumentando a concentração no local e auxiliando na seletividade do fármaco (De Paula *et al.*, 2023; Misra *et al.*, 2011). Ademais, este polímero é utilizado em sistemas de NPs por possuir elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e mucoadesão, apresentando potenciais anti-inflamatórios, viscoelásticos, de proliferação e diferenciação celular e auxílio na regeneração de tecidos, exibindo também a vantagem de formar complexos por meio da interação da NP (poliânion) com policátions, facilitando o desenvolvimento de pesquisas que combinam dois ou mais polímeros na mesma formulação (De paula *et al.*, 2023).

A quitosana (QS) é um polissacarídeo natural derivado da quitina, sendo encontrada na parede celular de fungos, exoesqueletos de crustáceos e insetos, além de estar presente nas escamas de peixes (Yanat; Schroën, 2021). A QS é classificada como um polímero catiônico constituída de monômeros de 2-acetamido-2desoxi- β -D-glicose conectadas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4) (Bhattacharya, 2020; Ferreira, 2024). A QS vêm sendo utilizada para atividades diversas que cada vez mais estão sendo exploradas em pesquisas, como ação antimicrobiana (Confederat *et al.*, 2021; Ke *et al.*, 2021) e anti-inflamatória (Jagdale *et al.*, 2024), além de apresentar mucoadesividade (Ahmad *et al.*, 2024), sendo os dois últimos importantes para a formulação das NPs por auxiliarem não apenas na composição, mas na ação das DII. Dependendo de como é preparada e quais técnicas de modificação são submetidas em sua superfície, o polímero pode ter suas propriedades alterada e consequentemente aplicações em áreas diferentes (Yanat; Schroën, 2021), ademais sua propriedade catiônica, devido a presença de grupos amino, agrega as propriedades de modulação da liberação de fármacos e mucoadesão, características requeridas ao sistema de liberação (Aranaz *et al.*, 2021).

Além da utilização de diferentes compostos para formulação das NPs, vários estudos, como em Aib *et al.*, 2022 e Zhao *et al.*, 2026, vem fazendo uso de sistemas de co-encapsulação em NPs para geração de um efeito sinérgico sobre o organismo, liberando dois fármacos distintos no local afetado para aprimorar a terapêutica (Afsharzadeh *et al.*, 2018; Shen; Tantai, 2020). Tais sistemas aplicados, em comparação aos sistemas de liberação contendo um único composto, vêm exibindo um resultado positivo mais elevado (Aib *et al.*, 2022; Chu *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2026).

A microbiota é o conjunto de microrganismos que habitam o trato intestinal humano, onde o organismo proporciona um ambiente estável e rico em nutrientes para os microrganismos que ali residem e, em troca, obtém uma série de vantagens. As conveniências oferecidas abrangem uma melhora da digestão e absorção dos alimentos, incitação ao sistema imunológico até uma diminuição do desenvolvimento da flora patogênica e manutenção da totalidade da barreira intestinal. Além disso, diversos estudos constataam que o desequilíbrio dela pode acarretar no aparecimento de alergias, distúrbios psiquiátricos, tumores ou até mesmo doenças autoimunes como as DII (Żółkiewicz *et al.*, 2020).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), originam-se da fermentação anaeróbica pelas bactérias do cólon que se utilizam das fibras alimentares (carboidratos complexos) como substratos, sendo os mais conhecidos o ácidos acético, propiônico e butírico com potencial para formação de seus ácidos graxos correspondentes (acetato, propionato e butirato) (Tedelind *et al.*, 2007; Żółkiewicz *et al.*, 2020). Os AGCC, rapidamente atingem as concentrações no lúmen do cólon e são absorvidos pelo epitélio por meio de transporte passivo ou ativo. O propionato (PROP), por exemplo, tem sua relevância como substrato da gliconeogênese no fígado, atuando no metabolismo de carboidratos com efeitos semelhantes ao da estatina, inibindo a síntese do colesterol, além disso vem sendo amplamente estudado para aplicação em doenças inflamatórias intestinais devido as suas propriedades anti-inflamatórias e sua capacidade de restauração da barreira intestinal (Chen *et al.*, 2025; Tedelind *et al.*, 2007).

Sendo assim, a co-encapsulação de MLZ e PROP em um sistema nanoparticulado surge como uma estratégia terapêutica promissora para as DII, em que a MLZ exercerá função anti-inflamatória atuando na cascata de inflamação na via das ciclooxigenase, enquanto o PROP atuaria na manutenção da homeostase

intestinal dos pacientes. Associado a isso, a utilização de polissacarídeos tais como o AH, QS e AR na formação dessas nanopartículas poliméricas, pode promover efeitos biológicos benéficos para liberação colón-específica, como resistência em condições de pH extremas e mucoadesão.

Com base nos conceitos e pressupostos delineados, o trabalho visou desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas para liberação colón específica de MLZ e PROP e avaliar seu potencial no tratamento das DII.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Doença inflamatória intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (DII) apresentam impacto global com aumento do número de casos com o passar dos anos, maior prevalência em países ocidentais e perspectivas de aumento em países recém-industrializados da Ásia e da América Latina, devido a urbanização e mudanças dos hábitos de vida (Chen *et al.*, 2026; Kaplan, 2025). O número de casos nessas regiões pode ultrapassar 0,3% da população, categorizando as DII como um problema de saúde pública (Cai *et al.*, 2021; Kaplan, 2025). Projeções mostram que tais valores podem chegar a 1% em países desenvolvidos nas próximas décadas (Adolph *et al.*, 2022).

Usualmente acometem predominantemente pessoas jovens, majoritariamente em idade produtiva, com incidência mais elevada entre a terceira e a quarta décadas de vida (Kaplan, 2025; Ramos; Papadakis, 2019). Por sua vez, cerca de 75% dos pacientes apresentam quadros clínicos crônicos com a presença de reincidivas, o que acarreta impactos sobre os sistemas de saúde e na qualidade de vida dos indivíduos (Adolph *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2021).

As DII são denominadas como um conjunto de patologias crônicas inflamatórias que acometem o TGI, representadas principalmente pela doença de Crohn (DC) e pela colite ulcerativa (UC) (Cai *et al.*, 2021; Kaplan, 2015; Ramos; Papadakis, 2019). Ambas as doenças apresentam quadros de reincidência e remissão da resposta inflamatória em momentos alternados, decorrentes de uma resposta inflamatória persistente (Adolph *et al.*, 2022; Ramos; Papadakis, 2019).

A etiologia das DIIs é complexa e multifatorial, possuindo influências de fatores genéticos, ambientais, imunológicos e microbiológicos. Estudos apontam que indivíduos com suscetibilidade genética, quando expostos a diferentes estímulos ambientais, produzem uma resposta imune acentuada contra constituintes da microbiota do intestino (Kaplan, 2015; Ramos; Papadakis, 2019; Cai *et al.*, 2021). Além disso, pesquisas têm exibido a combinação de polimorfismos em genes responsáveis pela regulação das respostas imunes (inata e adaptativa) e responsáveis pela integridade da barreira do epitélio intestinal, corroborando para o aumento da exposição do indivíduo para o surgimento da doença (Kaplan, 2015; Ramos; Papadakis, 2019).

O ambiente também apresenta um papel de destaque para o surgimento das DII. Indivíduos em dietas ricas em açúcares e gorduras com baixa ingestão de

fibras, tabagistas, sob uso de antibióticos, com a presença de mudanças no estilo de vida ou sob estresse podem sofrer alterações diretas na constituição da microbiota intestinal e consequentemente na resposta inflamatória (Kaplan, 2015; Adolph *et al.*, 2022).

Do ponto de vista imunológico ambas as enfermidades (UC e DC) apresentam semelhanças na mudança da homeostase intestinal, por exemplo, observa-se uma mudança na resposta imune com a ativação e liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18) responsáveis pela presença da inflamação constante (Adolph *et al.*, 2022; Aggarwal *et al.* 2026). Contudo, na disfunção relacionada ao sistema imunológico adaptativo, a DC mostra maior prevalência de células Th1/Th17 que intensificam a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-23, enquanto a UC apresenta dominância de células NKT e Th2 gerando o aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 (Aggarwal *et al.* 2026). Ademais, essas mudanças na barreira do intestino corroboram para o aumento da permeabilidade do epitélio permitindo que antígenos luminais e microrganismos se transloquem e reforcem o aparecimento do quadro inflamatório (Adolph *et al.*, 2022; Ramos; Padakis, 2019)

Quando analisadas pelo ponto de vista fisiopatológico, as DIIs variam quanto ao padrão de inflamação e a localização. A DC pode afetar diferentes partes do TGI, com preferência pelo intestino delgado, tendo a presença de inflamações transmuralis e complicações como fístulas e abscessos (Kaplan, 2015; Adolph *et al.*, 2022). Em contrapartida, a UC é restrita ao cólon, usualmente com início no reto com extensão proximal e com inflamações limitadas a mucosa (Ramos; Papadakis, 2019; Adolph *et al.*, 2022).

A microbiota de pacientes com DII apresentam alterações em sua composição e função, conhecida como desbiose, devido à presença crônica da inflamação e a perda da homeostase intestinal (Adolph *et al.*, 2022; Kaplan, 2015; Jauregui-Amezaga; Smet, 2024). A inter-relação entre microbiota e o sistema imunológico é essencial para que a mucosa se mantenha íntegra, sendo a mudança dessa relação um fator atenuante para a perpetuação da doença (Han *et al.*, 2025).

O diagnóstico das DII apresenta diferentes desafios devido a variabilidade sintomática e fisiopatológica. Usualmente, o diagnóstico é baseado na análise mútua do quadro, integrando dados clínicos, laboratoriais, histológicos e endoscópicos (Cai *et al.*, 2021; GEDIIB, 2019; Ramos; Papadakis, 2019). A realização da avaliação endoscópica, por exemplo, concede a visualização de alterações, como ulcerações,

inflamação da mucosa e acometimento do epitélio intestinal. Enquanto verificar a presença de biomarcadores inflamatórios e a realização de exames laboratoriais permitem que a atividade da doença seja detectada, junto a diferenciação do tipo de DII por meio de análises histológicas (GEDIIB, 2019).

A condução do tratamento da DII, engloba diferentes classes farmacológicas, cuja predileção irá variar de acordo com o tipo de inflamação, a gravidade, a extensão e a resposta clínica do paciente (Cai; Wang; Li, 2021; GEDIIB, 2019). Dentre as opções terapêuticas à disposição, os aminossalicilatos se mantêm como uma das principais escolhas no tratamento da UC, como uso em quadros leves e moderados da doença. Nessa condição, a mesalazina (MLZ) é evidenciada como um dos fármacos mais prescritos para uso, com utilização para induzir e manter a remissão das DII (Cai *et al.*, 2021; Liang, 2024; Murray *et al.*, 2020).

2.2 Mesalazina

A MLZ, apresenta propriedades físico-químicas fundamentais para sua efetividade terapêutica. A molécula (ácido 5-aminossalicílico ou 5-ASA), possui baixa massa molar, com estrutura derivada do ácido benzoico e a presença de grupos funcionais ácido carboxílico e amina, fazendo da MLZ um composto anfótero. (Drugbank, 2025; Pubchem, 2025). Tal característica se relaciona aos valores de pKa do composto, resultando em diferentes graus de ionização ao longo do TGI. Em decorrência, a MLZ exibe uma baixa lipofilicidade, elevada polaridade, consequentemente baixa competência de difusão passiva nas membranas biológicas (Drugbank, 2025).

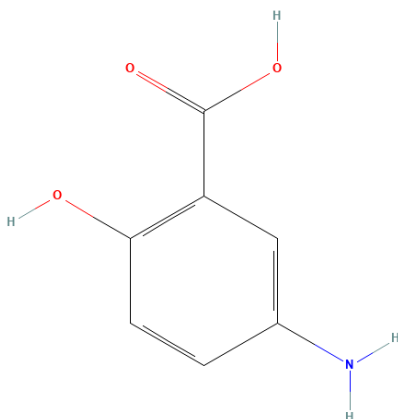
Ademais, o composto possui baixa solubilidade em água quando em condições fisiológicas corroborando para a baixa absorção sistêmica em conjunto com a baixa permeabilidade. Todas essas propriedades fazem a MLZ ser um fármaco de classe IV no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), trazendo desafios relevantes relacionados a sua biodisponibilidade (Sutaria *et al.*, 2023). Dessa maneira, suas características interferem na sua eficácia clínica e na distribuição do fármaco no TGI.

Diretrizes clínicas apresentam a MLZ como fármaco de primeira linha para o tratamento de UC, podendo ser administrada por via retal, oral ou ainda manipulada de forma combinada (GEDIIB, 2019). Sua eficácia na remissão dos quadros inflamatórios de pacientes com UC demonstra boas evidências científicas, como

revisões sistemáticas, que embasam a excelência quando comparada ao placebo e mostram a prevenção efetiva de recaídas (Liang, 2024; Murray *et al.*, 2020; Santos, 2023). Entretanto, quando colocada em comparação ao uso na DC, a MLZ possui uma efetividade mais limitada, apresentando resultados menos consolidados devido a inflamação não localizada da doença (Cai, 2021; Campregher; Gasche, 2011; Lapka, 2023).

Apesar de não possuir o mecanismo de ação completamente elucidado, reconhece-se que a MLZ age de forma local na mucosa do intestino, funcionando com ação anti-inflamatória nas células do epitélio intestinal, por meio da articulação das vias inflamatórias da ciclooxygenase (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase (LOX) impossibilitando que as prostaglandinas, normalmente elevadas em pacientes com DII, venham a ser produzidas (FDS, 2021). Além disso, a MLZ possui a capacidade de impedir a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), atrapalhando na produção das citocinas pró-inflamatórias e processos do estresse oxidativo, corroborando na manutenção da barreira da mucosa e redução da atividade inflamatória (Allgayer, 2003; Beiranvan, 2021; Cai *et al.*, 2021).

Figura 1 – Estrutura química da mesalazina (MLZ)



Fonte: Pubchem (2026)

Mesmo possuindo um perfil terapêutico consistente, a MLZ possui limitações. Apesar de ser normalmente bem tolerada, há relatos do aparecimento de reações adversas e de eventos potencialmente graves nos dados de farmacovigilância, sendo o principal deles, o surgimento de problemas renais a longo prazo (Battepati *et al.*, 2024; Ransford; Langman, 2002; Wang *et al.*, 2022).

Devido às limitações apresentadas em suas propriedades físico-químicas e terapêuticas surge a indispensabilidade de formular novas estratégias que melhorem a segurança e eficácia do fármaco. Por isso, a produção de sistemas de

liberação vem sendo desenvolvidos para contornar tais problemáticas, direcionando o fármaco para o local de ação e aumentando sua biodisponibilidade para redução de efeitos sistêmicos. Essas abordagens buscam maximizar os benefícios terapêuticos, mantendo o papel central da MLZ no tratamento das DII (Cai *et al.*, 2021; Sutaria *et al.*, 2023).

2.3 Propionato

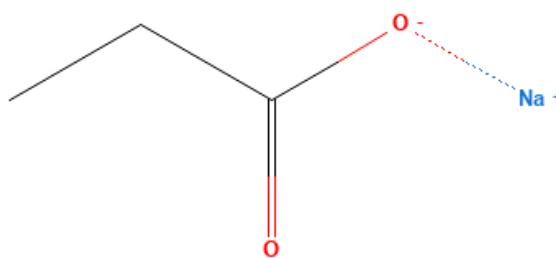
A microbiota intestinal saudável é composta por uma diversidade de microrganismos, como bactérias, bacteriófagos, vírus e fungos. Dentre eles, uma das espécies bacterianas de maior relevância são as que consomem fibras alimentares não digeríveis, dando origem a metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (Ventura *et al.*, 2024).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são ditos como um dos principais responsáveis pela mediação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro. Surgem da fermentação anaeróbia das bactérias do cólon e atuam como reguladores das funções e integridade da barreira do epitélio intestinal, regulação e modulação da resposta imune da mucosa e dos processos inflamatórios relacionados (Cardoso *et al.*, 2025; Mann *et al.* 2024).

Dentro dos principais AGCC, se destacam o acetato, o ácido propiônico e o ácido butírico, usualmente presente no lúmen do intestino em suas formas desprotonadas, propionato e butirato, em proporções aproximadas de 60:20:20, sendo o propionato um composto de interesse crescente devido ao seu papel na modulação da inflamação intestinal (Tedelind *et al.*, 2007, Ventura *et al.*, 2024).

O propionato (PROP) atua principalmente por meio da regulação das vias inflamatórias e da resposta imune. Pesquisas indicam que tal metabólito demonstra capacidade de diminuir a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune, como TNF- α , mas não interferindo em outras de forma significativa, como a IL-8. Ademais, o PROP também atua na diminuição da expressão e liberação de IL-6, em RNA mensageiro quanto proteico, demonstrando uma atuação direta sobre a regulação gênica de tais mediadores inflamatórios (Tedelind *et al.*, 2007; Ventura *et al.*, 2024).

Figura 2 – Estrutura química do propionato de sódio (PROP)



Fonte: Pubchem (2026)

A ação anti-inflamatória do PROP possui variados mecanismos de ação, sendo o principal deles a inibição da sinalização do NF- κ B, um dos principais reguladores da expressão de genes pró-inflamatórios. A exclusão dessa via acarreta a atenuação da ativação das células inflamatórias, gerando a diminuição dos genes associados a resposta imune acelerada. Para a ocorrência de tais efeitos, é necessário a observação dose-dependência do PROP, fortalecendo o componente como um modulador direto dos processos inflamatórios das DII (Tedelind *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2025).

Além disso, quando em comparação com diferentes AGCC, o PROP apresenta eficácia semelhante à do butirato quando avaliado pelo potencial de inibição de vias inflamatórias e na modulação da expressão gênica relacionada à imunidade, sendo ambos significativamente mais eficazes que o acetato nesses processos. Todos os comparativos e estudos apenas reforçam o potencial do PROP como agente relevante no controle da inflamação intestinal, especialmente em condições nas quais há desregulação da resposta imune e comprometimento da barreira intestinal (Tedelind *et al.*, 2007).

Considerando essas propriedades, o PROP se mostra como um composto promissor para aplicações terapêuticas no contexto das DII. No entanto, sua atuação e eficácia pode ser limitada por diversos fatores como a absorção, metabolização local e distribuição ao longo do TGI, principalmente devido a molécula de tamanho reduzido. Nesse contexto, desenvolver sistemas de liberação controlada aparece como uma estratégia interessante para otimizar sua biodisponibilidade e direcionar sua ação até o cólon. Além disso, a possibilidade de co-encapsulação e administração do PROP junto a outros componentes, como a MLZ, pode auxiliar para potencializar ou agregar novos efeitos para tratamento das DII (Tsilingiri; Rescigno, 2013; Żółkiewicz *et al.*, 2020).

2.4 Sistemas para liberação cólon-específicos

A via oral é largamente utilizada para administração de fármacos para o tratamento de doenças intestinais, como as DII, por serem uma opção não invasiva, segura, com possibilidade de efeitos sistêmicos e locais, e com engajamento dos pacientes ao uso devido a facilidade de administração e maleabilidade posológica (Hua *et al.*, 2015; Onoue *et al.*, 2026). Contudo, a sua eficácia pode ser limitada pelas diferentes barreiras do TGI, desde a degradação do fármaco, a baixa absorção ou a liberação antecipada em regiões indesejadas, dificultando a chegada do princípio ativo ao sítio de ação requerido (Dos Santos *et al.*, 2021a; Dos Santos *et al.*, 2021b).

Frente a essas limitações, a procura por estratégias de liberação direcionada ao cólon, com o foco em elevar com êxito a ação terapêutica e a redução dos efeitos adversos sistêmicos, tem aumentado. Entre as diferentes possibilidades de abordagens, destacam-se os sistemas que utilizam das características fisiológicas do TGI, como mudanças de pH, tempo de trânsito intestinal e a ação da microbiota colônica, possibilitando uma liberação mais seletiva e localizada (Hua *et al.*, 2015; Dos Santos *et al.*, 2021a; Yeung *et al.*, 2025). Dessa forma, é possível aproveitar o maior tempo de permanência do conteúdo no cólon, favorecendo absorção de fármacos na região. (Amidon; Brown; Dave, 2015).

Ademais, sob uma visão da anatomia humana, o intestino grosso possui em torno de 1,5 metros de extensão, sendo delimitado em ceco, apêndice, cólon ascendente, transverso, descendente, sigmoide, reto e ânus. Entre elas, o cólon ascendente ganha destaque por ser um local de absorção, devido, entre outros fatores, a presença de baixa viscosidade do meio luminal (Dos Santos *et al.*, 2021a; Koncina *et al.*, 2020; Naeem *et al.*, 2020).

Nesse contexto, diferentes estratégias vêm sendo estudadas com o intuito de melhorar e realizar a liberação de fármacos ao cólon, como a utilização de pró-fármacos, sistemas dependentes de pH ou tempo e formulações ativadas pela microbiota intestinal (Hua *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2020). Entre as opções, os sistemas micro e nanoestruturados vêm recebendo destaque graças às suas propriedades físico-químicas e farmacêuticas. Esses sistemas apresentam ampla variação de tamanho, elevada área superficial e capacidade de modular a liberação do fármaco, além de contribuírem para maior estabilidade da formulação (Sun *et al.*, 2012).

O tamanho reduzido das micro e nanopartículas pode favorecer um maior tempo de permanência no local de ação e conseqüentemente um maior acúmulo no

tecido colônico, fatores esses extremamente importantes no tratamento de DII (Amidon; Brown; Dave, 2015; Gao *et al.*, 2024; Hua *et al.*, 2015).

Denominadas como sistemas coloidais em escala nanométrica, as nanopartículas possuem elevada relação entre área superficial/volume, podem ser constituídas por materiais poliméricos naturais ou sintéticos e possuem capacidade de incorporar quantidades significativas de substâncias ativas graças a capacidade de sua matriz em fornecer proteção ao princípio ativo durante o trânsito pelo TGI e minimizando efeitos adversos sistêmicos (Dos Santos *et al.*, 2021b; Eker *et al.*, 2024; Bhardwaj *et al.* 2023). Além disso, podem ser classificadas como nanoesferas e nanocápsulas, em que as nanoesferas apresentam a estrutura de sua matrix de forma contínua (fármaco disperso, retido no interior ou adsorvido na superfície), enquanto as nanocápsulas apresentam um núcleo interno (líquido ou sólido) circundado por uma parede/membrana polimérica, servindo de proteção para o composto ativo (Wang *et al.*, 2023; Desai *et al.*, 2025)

A utilização de polissacarídeos na formação desses sistemas apresenta-se como uma estratégia promissora, uma vez que esses materiais apresentam características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e habilidade de interagir com tecidos biológicos (Beach *et al.*, 2025; Dos Santos *et al.*, 2021b). Além dessas propriedades, há também a capacidade de mucoadesão, de intumescimento, erosão, e possibilidade de modulação da hidrofília e cristalinidade, influenciando diretamente o comportamento e os perfis de liberação dos fármacos (Sun *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2025; Spósito *et al.*, 2025; Carvalho *et al.*, 2024; Politi *et al.*, 2023).

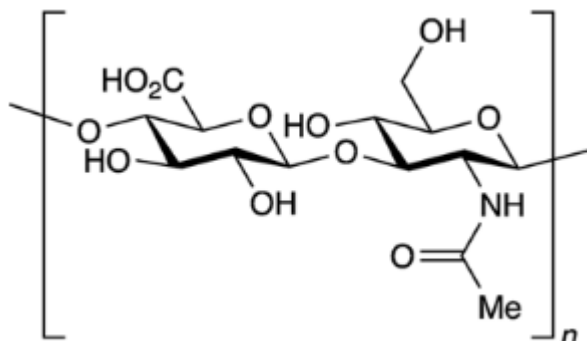
2.5 Biopolímeros

2.5.1 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH), também conhecido como hialuronano, é um polissacarídeo linear da classe dos glicosaminoglicanos, formado por unidades dissacarídicas repetidas de ácido glicurônico e N-acetilglucosamina (Salih *et al.*, 2024; Kogan *et al.*, 2007). O AH, diferente de outros compostos, não apresenta sulfatação e não se encontra covalentemente ligado a proteínas, o que dá a ele características estruturais únicas quando em meio biológico (Kogan *et al.*, 2007). É uma macromolécula com elevada massa molar, cuja conformação e propriedade polieletrólítica está relacionada às suas propriedades físico-químicas, como sua

viscoelásticidade e sua capacidade elevada de interação com moléculas de água (Kogan *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2013).

Figura 3 – Estrutura química do ácido hialurônico (AH)



Fonte: American Chemical Society (2026)

Dentre suas propriedades físico-químicas, o AH sobressai por sua alta hidrofobicidade relativa associada à forte hidratação, possuindo a capacidade de reter água e gerar soluções com elevada viscosidade. Ademais, possuem elevada solubilidade em meio aquoso, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, o que favorece sua aplicação em sistemas biológicos e farmacêuticos (Salih *et al.*, 2024; Pan *et al.*, 2013). Além disso, a massa molar influencia na sua distribuição pelos tecidos, na degradação enzimática e na interação do composto com receptores celulares (Gupta *et al.*, 2019). Quando em circulação pelo organismo, o AH é altamente distribuído, podendo ser encontrado na matriz extracelular, no fluido sinovial e em tecidos conjuntivos, atuando em funções estruturais e regulatórias, como a modulação da proliferação e diferenciação celular e no processo de reparo de tecidos (Kogan *et al.*, 2007).

Tais propriedades fazem do AH um composto multifacetado, com capacidade de uso em diferentes áreas da biomedicina, como a aplicação em terapias articulares (na suplementação do fluido sinovial em condições degenerativas) ou em áreas oftalmológicas, dermatológicas ou até mesmo aplicações na engenharia de tecidos (Kogan *et al.*, 2007). Além disso, estudos recentes têm confirmado o potencial do AH como um componente integrante de sistemas de liberação de fármacos, principalmente graças à sua capacidade de alteração química e interação específica com receptores celulares CD44, receptores que são superexpressos em células tumorais e inflamatórias (De Paula *et al.*, 2023; Mohammed *et al.*, 2022). Tal possibilidade de interação corrobora para o direcionamento dos sistemas

terapêuticos, elevando a seletividade e a eficácia do tratamento e reduzindo o aparecimento de efeitos adversos sistêmicos.

Outra característica importante do AH dentro da sua aplicação na nanotecnologia farmacêutica, é sua capacidade de atuar tanto como matriz estrutural quanto como agente para direcionamento. Os sistemas com a presença de AH podem ser idealizados para responder a estímulos específicos do microambiente biológico, como por exemplo, a presença de enzimas (hialuronidases) (Mohammed *et al.*, 2022).

Dentro da aplicação de sistemas de liberação de fármacos ainda há destaque para a propriedade mucoadesiva do AH. Graças ao seu potencial de interagir com a camada de muco presente nas superfícies do epitélio, o componente possibilita o aumento do tempo de permanência no local, aumentando sua biodisponibilidade (Sosnik; Sarmiento, 2014). Dessa forma, utilizar o AH para formulações mucoadesivas mostra-se como uma estratégia promissora para a otimização na liberação de fármacos, principalmente em aplicações orais, nasais e oftálmicas.

2.5.2 Amido retrogradado

O amido nativo é um polissacarídeo natural com estrutura semicristalina amplamente distribuído em espécies vegetais, onde age como material de reserva de energia em sua forma granulosa com tamanhos que variam de 1 a 100 μm (Cristina freire *et al.*, 2009; Sajilata; Singhal; Kulkarni, 2006). A composição dele é baseada em duas diferentes frações: a amilose, constituída por cadeias lineares de glicose que se unem por meio de ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), e a amilopectina, um polímero ramificado que se ligam por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6), responsável pela organização estrutural dos grânulos (Cristina freire *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2021). Enquanto a amilose está associada a regiões menos organizadas, a amilopectina contribui para a formação de estruturas mais cristalinas no interior do grânulo (Dos Santos *et al.*, 2021).

Devido às suas características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e custo reduzido, o amido tem sido amplamente empregado nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Dos Santos *et al.*, 2021). Entretanto, o AR possui algumas de suas propriedades físico-químicas que limitam sua utilização nos sistemas de liberação controlada, como sua elevada hidrofiliabilidade e a suscetibilidade à degradação enzimática (Bagliotti Meneguín; Stringhetti Ferreira Cury; Evangelista, 2014; Carbinatto *et al.*, 2012; Meneguín, 2018). Nesse contexto,

diferentes estratégias para sua modificação têm sido aplicadas: tratamentos físicos, químicos e enzimáticos, como a pré-gelatinização, a retrogradação e a formação de complexos, para a melhora das propriedades como estabilidade, resistência e desempenho funcional (Meneguín, 2018; Dos Santos *et al.*, 2021).

Utilizando de uma dessas técnicas, o AR, também chamado de amido resistente tipo III, é obtido. Sua produção ocorre por meio de um processo hidrotérmico, em que o composto é submetido a ciclos de aquecimento e resfriamento que gelatinizam o amido e reorganizam suas cadeias. (Dimantov *et al.*, 2004; Bordenave; Janaswamy; Yao, 2014). Durante esse processo, os grânulos do amido sofrem desestruturação e rearranjos das cadeias de amilose e amilopectina, dando origem a uma rede tridimensional mais compacta e organizada, cuja estabilização ocorre pela presença de ligações de hidrogênio (Bordenave; Janaswamy; Yao, 2014).

Dentre os amidos, o uso daqueles com elevado teor de amilose têm sido mais procurados para a produção de AR, devido a propriedade dela em favorecer a formação de estruturas mais estáveis e com menor suscetibilidade à ação enzimática (Bagliotti Meneguín; Stringhetti Ferreira Cury; Evangelista, 2014; Dimantov *et al.*, 2004). O resultado final, com a formação do AR, é a obtenção um polímero com menor solubilidade em água, maior estabilidade térmica e maior resistência à digestão enzimática nas porções superiores do TGI (Htoon *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).

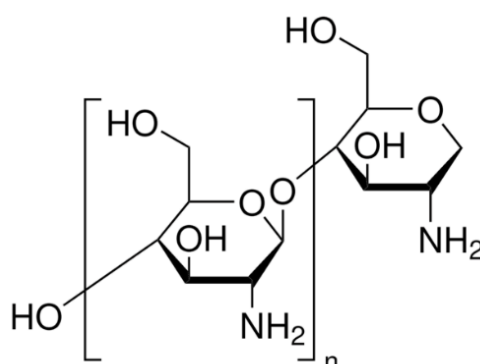
A resistência à digestão pode fazer o AR manter-se intacto na porção do estômago e do intestino delgado, para sofrer sua fermentação apenas na chegada ao cólon por meio de da microbiota presente (Bordenave; Janaswamy; Yao, 2014; Meneguín, 2018). Essa característica torna o material promissor para aplicações em sistemas de liberação colônica de fármacos, pois permitiria que o princípio ativo fosse protegido durante todo o percurso do TGI até o local requerido para ação.

Ademais, o AR não interage com o muco que recobre o TGI, favorecendo seu deslocamento sem que ocorra a retenção no trato superior, facilitando sua chegada com uma liberação direcionada localizada (Dimantov *et al.*, 2004). Dessa forma, o AR se torna um componente promissor devido as suas propriedades estruturais e funcionais para aplicação nos sistemas de liberação direcionada, principalmente quando é requerido a condição de proteção gástrica.

2.5.3 Quitosana

A quitosana (QS) é um polissacarídeo natural advindo da desacetilação da quitina, um dos diversos biopolímeros mais presentes na natureza, visto em diferentes estruturas como exoesqueletos de crustáceos e insetos, paredes celulares de fungos e escamas de peixes (Ferreira *et al.*, 2020; Yanat; Schroën, 2021). A estrutura da QS é constituída por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina ligadas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4), em que o processo de desacetilação altera alguns dos grupos acetilados em grupos amino livres, que dão a QS suas propriedades químicas conhecidas (Ferreira *et al.*, 2020; Bhattacharya, 2020).

Figura 4 – Estrutura química da quitosana (QS)



Fonte: Sigma-Aldrich

As propriedades da QS são completamente influenciadas pelos parâmetros como seu peso molecular e o grau de desacetilação. O peso molecular, por exemplo, representa um valor médio que indica à distribuição das cadeias poliméricas, enquanto o grau de desacetilação determina a quantidade de grupos amino que estão disponíveis na estrutura, podendo variar significativamente de um QS para outra (Carvalho *et al.*, 2021). Quanto maior o grau de desacetilação, maior a protonação dos grupos amino, maior a densidade de cargas positivas na cadeia do polímero e o que influencia diretamente em suas interações biológicas e físico-químicas.

Do ponto de vista da biotecnológico, a QS ganha evidência por ser um polímero catiônico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade, características que favorecem sua aplicação em sistemas de liberação de fármacos (Boni *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2022). Sua natureza catiônica permite interações eletrostáticas com componentes negativamente carregados, como mucinas presentes no muco intestinal, promovendo elevada mucoadesividade (Aranaz *et al.*, 2021; Ahmad *et al.*, 2024). Além disso, a formação de ligações de hidrogênio e a capacidade de promover

a abertura de junções intercelulares também contribuem para aumentar a interação com a mucosa e potencializar a retenção no local de ação (Suarato; Li; Meng, 2016).

Devido a presença de grupos amino protonáveis em sua cadeia, a QS possui sensibilidade ao pH, dando a ela a capacidade de ser utilizada em sistemas de liberação controlada, principalmente em ambientes fisiológicos específicos (Boni *et al.*, 2018). Em adição, a QS também apresenta outras atividades biológicas importantes, como propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, que podem contribuir de forma complementar em formulações terapêuticas voltadas para DII (Azuma *et al.*, 2015; Confederat *et al.*, 2021; Ke *et al.*, 2021).

A capacidade multifacetada da QS também está relacionada à oportunidade de modificar suas características de acordo com o método de preparo e funcionalização, dando a ela a versatilidade em ser utilizada para diferentes áreas (Yanat; Schroën, 2021). Com essa ideia, a QS tem sido muito utilizada na formulação e modificação de NPs, principalmente por meio de interações eletrostáticas, o que fornece a ela propriedades mucoadesivas, aumento da estabilidade e capacidade de associação (Alper Öztürk; Yenilmez; Özarda, 2019; Dandamudi *et al.*, 2021; Dyawanapelly *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver e avaliar sistemas nanoparticulados poliméricos com propriedades mucoadesivas para administração oral de MLZ e PROP, visando a liberação colón-específica e sua aplicação no tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

3.2 Objetivos específicos

Desenvolvimento do sistema de liberação

- Validar metodologia analítica para quantificação simultânea de mesalazina (MLZ) e propionato (PROP);
- Desenvolver nanopartículas poliméricas à base de ácido hialurônico (AH), quitosana (QS) e amido retrogradado (AR) contendo MLZ e PROP;
- Realizar comparação entre as nanopartículas com e sem adição de AR;
- Caracterizar as nanopartículas quanto aos parâmetros físico-químicos de tamanho, Pdl e potencial zeta;
- Realizar a caracterização térmica dos sistemas desenvolvidos;
- Avaliar as interações químicas entre os princípios ativos e polímeros;
- Avaliar a estabilidade física preliminar das nanopartículas ao longo do tempo;
- Determinar a eficiência de associação/encapsulação dos princípios ativos;
- Avaliar a liberação do sistema frente ao pH gástrico e colônico.

Avaliação biológica

- Avaliar a mucoadesão através da interação entre mucina e os sistemas desenvolvidos;
- Analisar a biocompatibilidade em modelos in vitro (Caco-2 e HT29-MTX);
- Analisar a biocompatibilidade celular em macrófagos Raw 264.7 com e sem indução da inflamação utilizando lipopolissacarídeos (LPS);
- Avaliar a permeabilidade intestinal das nanopartículas poliméricas em modelo 3D (Caco-2, HT29-MTX, HIF, HPMEC-ST1.6R, THP-1).
- Avaliação da capacidade de atenuação do estresse oxidativo induzido por LPS em macrófagos RAW 264.7

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Principais matérias primas e reagentes

Acetonitrila, acetato de sódio, cloreto de potássio e Filtro Amicon® Ultra 15 (Millipore 50kDa) foram adquiridos da Merck®; Ácido acético glacial e ácido clorídrico da Êxodo Científica®; Ácido fosfórico da Across Organics®; Ácido hialurônico da Pure Kemika® (Baixo peso molecular, 300 kDa); Ácido fosfórico, cloreto de potássio e fosfato de potássio monobásico da Synth®; Alta amilose Hylon VII da National Starch & Chemical; Fosfato de potássio monobásico da Fisher Chemical®; Hidróxido de sódio da Vetec®; Mesalazina, propionato de sódio, mucina de estômago de porco- Tipo II e quitosana baixo peso molecular (Mw=50.000-190.000 Da, grau de desacetilação de 75-85%) da Sigma Aldrich®.

4.1.2 Cultura celular

Acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido pela Fisher Chemical®; Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) da Biowest®; Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS), lipopolissacarídeo E.Coli (LPS) O111:B4, meio M199 e resazurina da Sigma Aldrich®; Penicilina-estreptomicina (Pen-Strep) da Thermo Fisher Scientific®; Trypan Blue Solution da Hyclone®, Tripsina da Gibco® e soro fetal bovino da PAN-Biotech®.

4.1.3 Equipamentos

Agitador Magnético Multiposição (IKA RO 10®); Analisador de partículas (Malvern®, modelo Zetasizer Nano-ZS); Analisador de rastreamento de nanopartículas Nanosight (Malvern, modelo NS300); Analisador Termogravimétrico (PerkinElmer®, modelo TGA 400); Autoclave vertical analógica (Prismatec®, modelo CS-50); Balança analítica (Marte®, modelo AUW220D); Calorímetro Diferencial de Varredura (PerkinElmer®, modelo DSC 4000); Centrífuga refrigerada (Eppendorf® centrifuge 581OR); Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Agilent Technologies®, modelo 1220 Infinity LC); Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Thermo Scientific®, Vanquish® Flex HPLC); Gotejador (SyringeID®, Baintree Scientific Inc. BS-300); Incubadora (Binder); Incubadora shaker (Candire); Leitor de microplacas (Biotek® Synergy MX Plate Reader); Leitor de microplacas (Biotek® Synergy LX Plate Reader); Microcentrífuga refrigerada (Gyrozen 173OR); Microscópio de luz polarizada (Leica, modelo CNS GimBH); Microscópio eletrônico de varredura (MEV-LEO, modelo 440);

NanoSight NS300; Ultrassom (Bandelin Sonorex Digitec); Vortex (VWR, Analog Vortex Mixer); Agitador magnético (Quimis, modelo 751, sem aquecimento).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do amido retrogradado

O amido foi retrogradado de acordo com a metodologia proposta por Meneguín e colaboradores (2014). Dispersões aquosas de alta amilose (AA) foram preparadas, na concentração de 5 % (m/v), sob agitação magnética por 30 min. Em seguida, a dispersão de AA foi submetida à autoclavação (121 °C) por 120 min para pré-gelatinização do amido. Ao final do processo de autoclavação, a AA gelatinizada foi resfriada à 30 °C sob agitação magnética. Para a retrogradação, a dispersão foi submetida a ciclos térmicos alternados de temperatura (4 °C em geladeira e 30 °C em estufa) durante 16 dias, sendo 2 dias em cada temperatura.

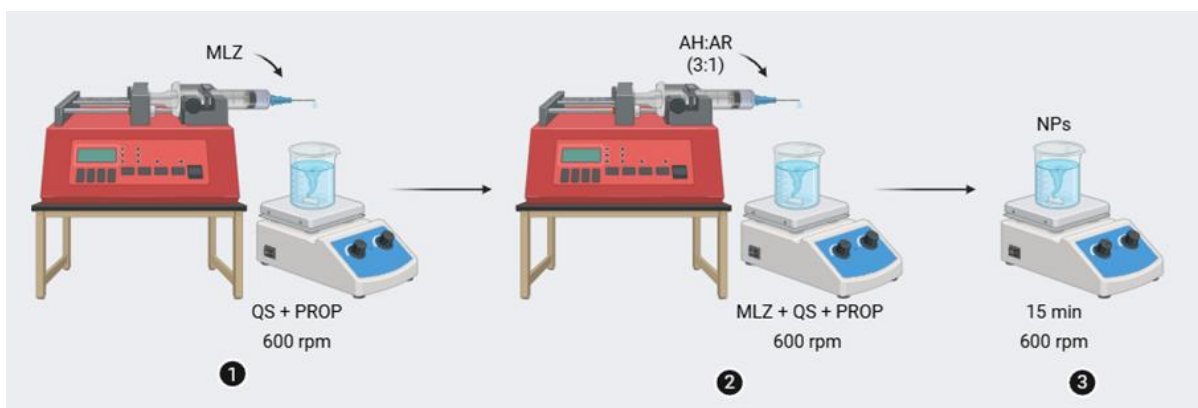
4.2.2 Delineamento e obtenção de nanopartículas poliméricas contendo mesalazina e propionato

As nanopartículas poliméricas foram obtidas por meio da técnica de complexação polieletrólítica e delineadas (delineamento melhor descrito no apêndice 2). Inicialmente foram preparadas dispersões de MLZ (1 mg/mL) em tampão fosfato pH 7,2 e QS (1 mg/mL) em água e 1% (v/v) de ácido acético, que serviram de material de partida para o desenvolvimento das nanopartículas. O AH e AR, por sua vez, foram preparados por meio de blends poliméricas, na proporção de 3:1 (V/V). As dispersões foram ajustadas em uma concentração de 0,5 mg/mL para a QS e 0,2 mg/mL para a blenda polimérica de AH:AR.

A solução de MLZ (200 µg/mL) foi gotejada, em uma seringa acoplada em uma bomba de gotejamento, diretamente em dispersão de QS (100 µg/mL) contendo PROP (100 µg/mL) (dispersão catiônica), sob agitação magnética e posteriormente a blenda polimérica de AH:AR (dispersão aniônica) (120 µg/mL) foi gotejada sobre a dispersão catiônica, sob agitação magnética (600 rpm). Após o gotejamento, as partículas foram mantidas sob agitação por 15 minutos (Figura 5) obtendo um pH final de 6,0.

Para o desenvolvimento das nanopartículas sem os princípios ativos foram desenvolvidas por meio de do gotejamento da blenda polimérica de AH:AR em dispersão de QS.

Figura 5 – Representação esquemática da técnica de preparo das nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica contendo mesalazina (MLZ), quitosana (QS), propionato (PROP) ácido hialurônico (AH) e amido retrogradado (AR).

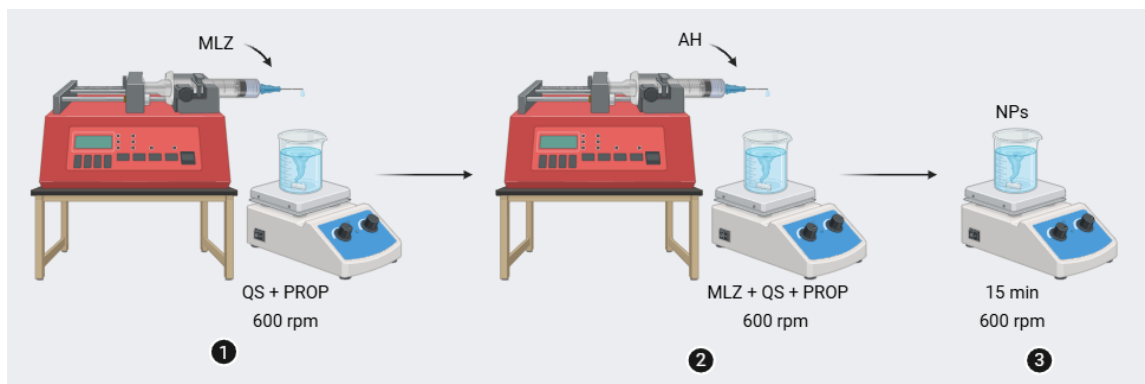


Fonte: figuras retiradas do Biorender®

Também foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas sem amido retrogradado em sua constituição, a fim de realizar uma comparação da influência do amido nas propriedades físico-químicas das NPs. Para isso, foram preparadas dispersões de MLZ (1 mg/mL) em tampão fosfato pH 6,0 e QS (1 mg/mL) em água e 1% (V/V) de ácido acético. Para o método, a solução de MLZ (200 µg/mL) foi gotejada diretamente em dispersão de QS (200 µg/mL) com PROP (dispersão catiónica), sob agitação magnética e posteriormente o AH (dispersão aniônica) (100 µg/mL) foi gotejada sobre a dispersão, sob agitação magnética (600 rpm). Após o gotejamento, as partículas foram mantidas sob agitação por 15 minutos (Figura 6) obtendo um pH final de 6,0.

As nanopartículas brancas foram desenvolvidas por meio de do gotejamento do AH em dispersão de QS.

Figura 6 – Representação esquemática da técnica de preparo das nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica contendo mesalazina (MLZ), quitosana (QS), propionato (PROP) e ácido hialurônico (AH).



Fonte: figuras retiradas do Biorender®

Ao final do desenvolvimento das NPs, as partículas finais obtidas foram denominadas de acordo com as siglas abaixo representadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Siglas das nanopartículas desenvolvidas e respectivos componentes utilizados em sua formulação. As siglas foram definidas de acordo com a composição de cada sistema nanoparticulado.

Amostra	Componentes
NP_B	Nanopartícula com ácido hialurônico e quitosana – sem fármaco
NP_B_AR	Nanopartícula com ácido hialurônico, quitosana e amido retrogradado – sem fármaco
NP_MLZ_AR	Nanopartícula com ácido hialurônico, quitosana, amido retrogradado e mesalazina
NP_MLZ	Nanopartícula com ácido hialurônico, quitosana e mesalazina
NP_MLZ-P	Nanopartícula com ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato
NP- MP_AR	Nanopartícula com ácido hialurônico, quitosana, amido retrogradado, mesalazina e propionato

4.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.2.3.1 Análise do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas por DLS

O índice de polidispersão (Pdl) e o diâmetro hidrodinâmico médio do sistema foi analisado por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico, utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS em ângulo de detecção de 173° à 25°C. Por meio do software do equipamento foi medida a difusão aleatória do sistema, o resultado foi convertido no diâmetro hidrodinâmico das partículas e em distribuição de tamanhos dadas a partir da equação de Stokes-Einstein. Já o potencial zeta do sistema foi determinado em analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS, sob ângulo de 173°, pela técnica de mobilidade eletroforética. Todas medidas foram realizadas em triplicata, sem e com incorporação do princípio ativo e sem a necessidade de diluição da amostra.

4.2.3.2 *Análise do diâmetro, índice span e concentração das nanopartículas por NTA*

O diâmetro hidrodinâmico e a concentração das nanopartículas foram determinadas por meio do rastreamento do movimento browniano, utilizando o analisador de nanopartículas Nanosight à 25 °C. Para a análise as amostras foram diluídas em água ultrapurificada na proporção 1:50 (v/v), colocadas em uma seringa de 1 mL e carregadas no sistema. As análises foram realizadas utilizando do software NTA 3.0. Todas medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.3.3 *Caracterização das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier*

A caracterização química das amostras foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformações de Fourier (FTIR), utilizando espectrômetro equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente, na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 50 varreduras por amostra.

As amostras foram previamente congeladas (- 20 °C/24 horas) e liofilizadas (por 24 horas), em Liofilizador Micromódulo Thermo Scientific e acondicionadas em dessecador até o momento da análise. Para obtenção dos espectros, pequenas quantidades das formulações foram posicionadas diretamente sobre o cristal ATR, aplicando-se pressão constante para garantir adequado contato com a superfície do cristal.

Os espectros obtidos foram tratados pelo software do equipamento, com correção de linha de base e normalização quando necessário. A interpretação dos

espectros foi realizada por comparação entre os materiais isolados e as formulações desenvolvidas, avaliando possíveis deslocamentos, desaparecimento ou surgimento de bandas características, indicativos de interações químicas entre os componentes.

4.2.3.4 Caracterização das nanopartículas por análises térmicas

O comportamento térmico das nanocápsulas foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análises termogravimétricas (TGA), em equipamentos DSC 4000 e TGA 400 (PerkinElmer®), respectivamente. Foram analisados individualmente cada um dos componentes isolados, bem como as formulações obtidas por complexação direta, complexação indireta e a formulação branca. As curvas de DSC foram obtidas utilizando calorímetro, em atmosfera de nitrogênio, com razão de fluxo de 20 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min, entre 20 e 400 °C. Os termogramas TG/DTG foram obtidos em termobalança, em atmosfera de nitrogênio, com razão de fluxo de 50 mL/min e taxa de aquecimento de 15 °C/min, entre 30 e 600 °C.

4.2.4 Análise da estabilidade física preliminar das nanopartículas

As nanopartículas poliméricas foram submetidas à avaliação da estabilidade física preliminar por um período de 90 dias. Para isso, foram acondicionadas em frascos de vidro, armazenadas em geladeira (temperatura de aproximadamente 4 °C), protegidas da luz direta. Em tempos pré-determinados (1, 7, 15, 30, 45, 60, 90 dias), as partículas foram monitoradas utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS, sob ângulo de 173°, para análise do diâmetro hidrodinâmico e Pdl, por meio da difusão aleatória do sistema, e do potencial zeta, pela técnica de mobilidade eletroforética.

4.2.5 Avaliação da eficiência de associação (EA%)

A eficiência de associação da MLZ e do PROP foi realizada pela separação do princípio ativo livre e aquele incorporado nas nanocápsulas por meio do método de filtração-ultracentrifugação. Uma alíquota da suspensão contendo as nanopartículas foram adicionadas no filtro Amicon Ultra 15 (Millipore, 50 kDa) e centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 minutos. A concentração de princípio ativo foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a partir da metodologia analítica que foi previamente desenvolvida pela candidata de acordo com o Apêndice 1. Todas as

análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de associação (EA%) foi calculada pela Equação 1:

$$EA\% = \frac{\text{Concentração de ativo quantificado}}{\text{Concentração total de ativo adicionado}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O teor de fármaco incorporado às nanopartículas (drug loading, DL) foi determinado a partir da quantificação direta da quantidade de mesalazina presente no sistema nanoparticulado. O DL foi expresso como a razão entre a massa de fármaco efetivamente associada às nanopartículas e a massa total do sistema (fármaco + polímero), conforme descrito na Equação 2:

$$DL\% = \frac{\text{Massa de fármaco associado}}{\text{Massa da nanopartícula}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.2.6 *Análise morfológica das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Reino Unido) com as partículas intactas. As amostras foram depositadas em um suporte metálico do tipo stub e submetidas para análise para avaliar as características morfológicas do sistema.

4.2.7 *Determinação do perfil de liberação in vitro de mesalazina e propionato no sistema nanonométrico*

O ensaio de liberação das nanopartículas foi avaliado em meio ácido (tampão clorídrico em pH 1,2) durante 120 minutos, tampão fosfato (pH 6,8) por 360 minutos, a fim de simular os valores de pH dos meios gástrico e colônico. Um volume de MLZ e PROP livres e da suspensão de nanopartículas (NP_MLZ e NP_MLZ-P) correspondente à concentração de 100 µg/mL de MLZ e PROP foi adicionado à 1 mL dos respectivos meios de dissolução em vials e incubados em incubadora shaker à 37 °C, sob agitação de 35 rpm. As coletas foram efetuadas em diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min para pH 1,2 e 15, 30, 60, 90, 120, 150, 240, 300 e 360 para os tampões PBS 6,8). O meio foi coletado, filtrado em membrana de PTFE 0,20 µm e centrifugado a 15000 rpm por 15 min e a MLZ e o PROP foram quantificados por CLAE, através das curvas nos meios de liberação previamente preparadas.

4.2.8 *Análise da cinética de liberação de mesalazina e propionato nas nanopartículas*

Modelos matemáticos foram aplicados para avaliar os mecanismos de liberação do fármaco. A liberação foi analisada por ajuste (software SigmaPlot 14.0) a diferentes modelos matemáticos (Korsmeyer - Peppas, Higuchi, First order, Hixson - Crowell, Baker - Lonsdale e Weibull) pelo maior coeficiente de determinação ajustado (r^2).

4.2.9 Avaliação da performance biológica *in vitro*

4.2.9.1 Estudo da interação entre as nanopartículas e mucina pela análise do potencial zeta

Foi realizado o estudo da influência da interação entre as nanopartículas e a mucina a partir do potencial zeta, em valores de pH correspondentes ao meio gástrico (pH 1,2), colônico saudável (pH 6,8) e colônico inflamado (pH 5,8). Dispersões de mucina em tampão fosfato de 6,8 e 5,8 e em tampão de ácido clorídrico (pH 1,2) nas concentrações (50, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas, respectivamente, utilizando HCl 0,1N e NaOH 0,2N. Foram adicionados 500 μL da dispersão de partículas em 1500 μL de dispersão de mucina em cada uma das concentrações. As misturas foram homogeneizadas e incubadas por 30 min à 37°C, em incubadora shaker. Em seguida, o potencial zeta das amostras foi determinado, em triplicata e, os resultados comparados com os valores das amostras sem adição de mucina.

4.2.9.2 Avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas em células HT29-MTX e Caco-2

O ensaio de resazurina foi aplicado para avaliar a viabilidade de todas as nanopartículas, controles, e MLZ livre em células Caco-2 e HT29-MTX. As células foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA) e 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina), em seguida semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Posteriormente, o meio será removido e as células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa por 4 h e 24 h nas concentrações de 1,53 $\mu\text{g/mL}$, 3,83 $\mu\text{g/mL}$, 7,66 $\mu\text{g/mL}$, 15,31 $\mu\text{g/mL}$, 38,29 $\mu\text{g/mL}$ e 76,57 $\mu\text{g/mL}$ da suspensão de nanopartículas no meio completo. O controle negativo utilizado foi DMSO (30% v/v) para controle de morte e o controle positivo foi o meio para normalizar todos os dados referentes a 100% de viabilidade. Após o tempo de incubação (24 h), uma solução de resazurina (20% v/v) foi adicionada à placa de poços e a placa foi incubada protegida da luz a 37 °C por 2 h. A fluorescência foi medida em comprimentos de onda de excitação e emissão de

530 nm e 590 nm, respectivamente, utilizando um leitor de microplacas BioTek Synergy Mx (BioTek Instruments Inc.).

4.2.9.3 Avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas em macrófagos

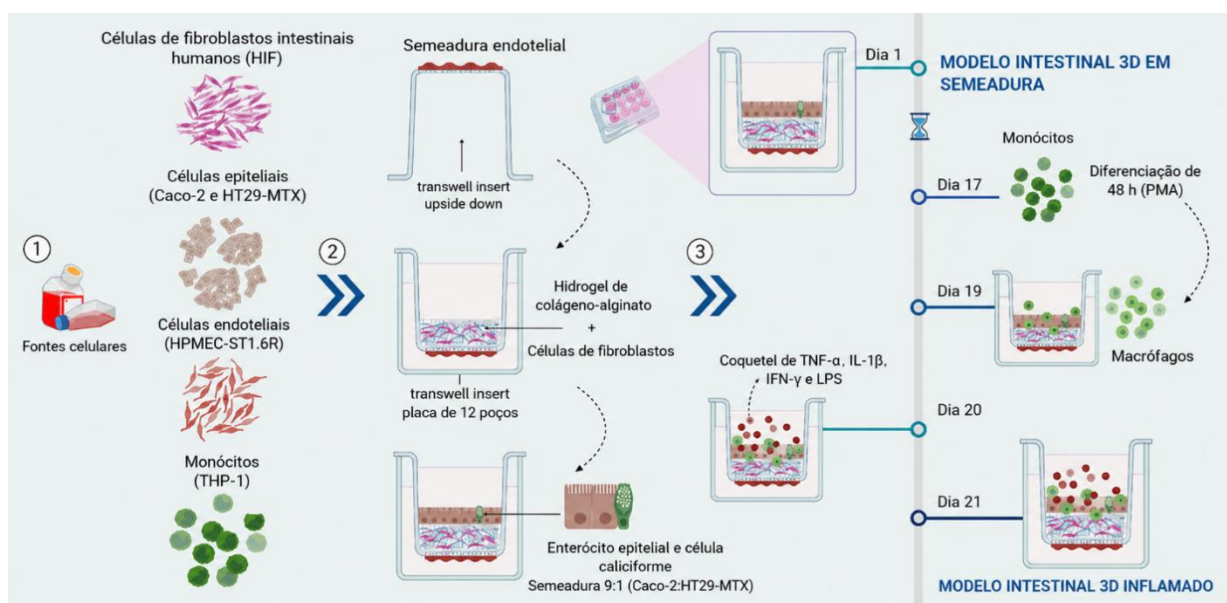
A avaliação da biocompatibilidade foi realizada com linhagem de macrófagos murinos Raw 264.7. Para isso, células foram cultivadas em meio DMEM com suplementação de 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Para a realização do ensaio de resazurina, os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 h para adesão. O delineamento se baseou em duas condições biológicas: na presença e na ausência de estímulo inflamatório induzido por LPS (100 ng/mL). As células foram tratadas com amostras nas concentrações finais de 76,57; 38,29; 15,31; 7,66; 3,83 e 1,53 µg/mL, controle negativo (DMSO, 30%) e positivo, com células em meio com e sem a presença de LPS, para o grupo não inflamado e inflamado, respectivamente. Após incubação o meio foi removido e a solução indicadora da resazurina (20%) foi adicionada. As placas foram incubadas protegidas da luz a 37°C por 2 h. A fluorescência foi medida em comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 nm e 590 nm, respectivamente, utilizando um leitor de microplacas BioTek Synergy LX (Agilent Instruments).

4.2.9.4 Permeabilidade in vitro em modelo 3D

O modelo intestinal multicamadas foi realizado de acordo com o descrito por Ferreira et al. (2025). Para preparar o modelo 3D, inserts (1,0 µm) foram virados de cabeça para baixo em placas de 6 poços, revestidos com 0,2% (m/v) de gelatina (Merck®) à temperatura ambiente por 1h para aumentar a adesão de HPMEC, então células HPMEC-ST1.6R cultivadas em meio M199 suplementado foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células/cm² por 2h. Uma solução de PBS foi adicionada a cada poço de 6 poços para manter a umidade. Depois disso, os inserts foram colocados de volta em uma placa de 12 poços em sua posição original. Hidrogéis de colágeno-alginato foram preparados usando 6 mg/mL de colágeno, 1 mg/mL de alginato e 10^5 HIF/mL. A camada de colágeno-alginato impregnada com fibroblastos foi então semeada com 10^5 células/cm² de células Caco-2 e HT29-MTX (na proporção de 9:1, respectivamente) em 0,5 mL de DMEM após um intervalo de gelificação de 30

minutos. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ após a adição de 1,5 mL de DMEM na face basolateral.

Figura 7 – Representação esquemática do modelo celular tridimensional multicamadas utilizado como biomimético do epitélio intestinal inflamado para os ensaios de permeabilidade das nanopartículas. O modelo foi desenvolvido para reproduzir características estruturais e funcionais da mucosa intestinal inflamada, possibilitando a avaliação do transporte, retenção e interação das formulações nanoestruturadas através da barreira epitelial.



Fonte: Silvestre *et al.*, 2025

Após um período de cultura de 21 dias, o meio dos poços foi substituído por HBSS + 0,1% (m/V) de poloxâmer 407 para garantir a solubilidade dos princípios ativos. em ambos os compartimentos, Alíquotas (200 µL) de cada amostra de tratamento foram coletadas do compartimento basolateral em intervalos predeterminados (15, 30, 60, 120 e 240 minutos) e o mesmo volume foi substituído por HBSS recém-aquecido no lado basolateral. Ao mesmo tempo, os valores de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) foram registrados para verificar se a integridade do modelo foi mantida ao longo do tempo. Após o último ponto de coleta, a membrana do insert, bem como o gel de colágeno-alginato, foram coletados em tubos de microcentrífuga separados. A quantidade de MLZ que permeou o modelo 3D inflamado *in vitro* foi então avaliada usando um leitor de microplacas BioTek Synergy Mx (BioTek Instruments Inc. ®) a 320 nm. Os resultados de permeabilidade serão expressos em porcentagem da permeabilidade ao fármaco e a permeabilidade aparente (Papp) será calculada usando a seguinte equação:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{A \times C_0 \times \Delta t} \quad (\text{Equação 3})$$

onde ΔQ é a quantidade de composto detectada na face basolateral (mg), A é a área de superfície do inserto (cm²), C_0 é a concentração inicial no compartimento apical (mg/ml) e Δt é o tempo do experimento (s).

Os ensaios de biocompatibilidade celular e permeabilidade foram realizados no grupo de pesquisa Nanomedicines & Translational Drug Delivery Group, coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Sarmiento, no Instituto de Pesquisa e inovação em saúde da Universidade do Porto (Porto, Portugal), durante a bolsa de estágio de pesquisa no exterior (Processo FAPESP 2025/08963-0).

4.2.9.5 Capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelulares

A capacidade das NPs em reduzir espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares foi avaliada utilizando células Raw 264.7. As células foram semeadas em uma placa de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^4$ células por poço e cultivadas sob condições padrão (37 °C, 5% de CO₂) por 24 h. Já com a confluência adequada, as células foram tratadas com MLZ livre ou NPs (38,28 e 76,57 µg/mL) por 2 h, com posterior indução de estresse oxidativo com LPS (1 µg/mL) por 24 h. Em uma etapa posterior, as células foram incubadas com diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, concentração final de 10 µM) por 30 min a 37 °C, abrigado da luz. Em seguida, foi feita uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover o excesso de sonda e os níveis intracelulares de EROs foram quantificados através da medição da intensidade de fluorescência (490/520 nm) utilizando um leitor de placas (Biotek Synergy LX®).

4.2.10 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, GraphPad Prism 6 e/ou Sigma Plot 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização das nanopartículas poliméricas por DLS

O uso de nanopartículas (NPs) para DII permite a realização de uma liberação mais eficiente nos tecidos doentes, por conseguirem se acumular nas células epiteliais inflamadas pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Nunes *et al.*, 2019). Ademais com a intenção de obter um sistema ainda mais favorável a região do cólon, com propriedades mucoadesivas e resistência às enzimas do trato gastrointestinal superior, a QS, o AH e AR foram escolhidos como polissacarídeos para o desenvolvimento do sistema. Baseado nas propriedades físico-químicas dos polímeros e em suas vantagens intrínsecas para desenvolvimento de um sistema de liberação controlada, utilizou-se a técnica de complexação polieletrólítica, em que, a formação dos complexos que dão origem a nanopartícula polimérica ocorre por meio de interações eletrostáticas entre polieletrólitos de cargas opostas (policátions e poliânions) devido as diferenças de carga. Ademais, interações intermoleculares também estão presentes e são parte responsáveis pela formação das interações entre as cadeias, podendo acontecer ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e interações dipolo (Meka *et al.*, 2017).

Utilizando da técnica citada, uma NP inicial foi desenvolvida contendo os polímeros QS, AR e AH, com os dois últimos formando a blenda de AH:AR (3:1) (NP_B_AR). Em seguida, outra partícula foi elaborada possuindo apenas os polímeros AH e QS (NP_B), com o intuito de realizar uma comparação entre os sistemas com a presença e ausência de AR. Em uma fase preliminar por meio uma análise macroscópica, a formação de agregados das duas formulações foram analisadas. Visualmente, as NPs não demonstraram presença de agregados.

Além da análise macroscópica, outros fatores como o tamanho, carga superficial (PZ) e homogeneidade do sistema nanoparticulado (Pdl) são usados para determinar propriedades físico-químicas das NP que podem afetar a performance da formulação. Por esse motivo, análises de caracterizações relacionadas a distribuição de partículas são essenciais no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Hickey *et al.*, 2015). Dessa forma, as análises correspondentes foram conduzidas em DLS e seus resultados organizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas poliméricas obtidas nesse estudo. As análises foram realizadas em DLS sob ângulo de detecção de 173° à 25 °C. Os valores representam a média $\pm$ DP de três análises independentes (n=3).

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
NP_B	237 $\pm$ 13	0,17 $\pm$ 0,03	+21 $\pm$ 2
NP_B_AR	253 $\pm$ 67	0,28 $\pm$ 0,05	+18 $\pm$ 8
NP_MLZ	221 $\pm$ 25	0,24 $\pm$ 0,04	+22 $\pm$ 1
NP_MLZ_AR	238 $\pm$ 58	0,27 $\pm$ 0,03	+17 $\pm$ 4
NP_MLZ-P	233 $\pm$ 9	0,22 $\pm$ 0,03	+29 $\pm$ 2
NP- MP_AR	212 $\pm$ 42	0,17 $\pm$ 0,04	+15 $\pm$ 3

NP_B: nanopartícula de ácido hialurônico e quitosana; NP_B_AR: nanopartícula de quitosana, ácido hialurônico e amido retrogradado; NP_MLZ_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, amido retrogradado e mesalazina; NP_MLZ: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana e mesalazina; NP- MP: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato; NP- MP_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana, mesalazina e propionato.

De acordo com as diretrizes regulatórias do Food and Drug Administration (FDA, 2014) embora nanopartículas sejam caracterizadas como partículas com diâmetro hidrodinâmico inferior a 100 nm, sistemas de liberação de fármacos com finalidade terapêutica podem ter flexibilidade de tamanho devido as propriedades atribuídas podendo obter uma variação de 100 a 1000 nm, variações essas visualizadas na Tabela 1 com os tamanhos de partículas obtidas.

De acordo com a Tabela 1, as partículas sem a presença de fármaco, NP_B e NP_B_AR, apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de 237 nm e 253 nm, respectivamente, sem diferenças estatísticas relevantes ($p < 0,05$). A pequena diferença entre as partículas sem MLZ e PROP, apesar da presença de um componente a mais, podem estar associadas as propriedades do AR. O AR possui a capacidade de interagir com polímeros via ligações de hidrogênio, sugerindo a promoção da reorganização estrutural de forma a promover a formação de matrizes menores. Ademais, suas regiões cristalinas podem estar atuando, durante a formação das NPs, diminuindo a agregação intermolecular entre a QS e o AH, que usualmente formam NPs maiores e menos organizadas ofertando ligações de hidrogênio

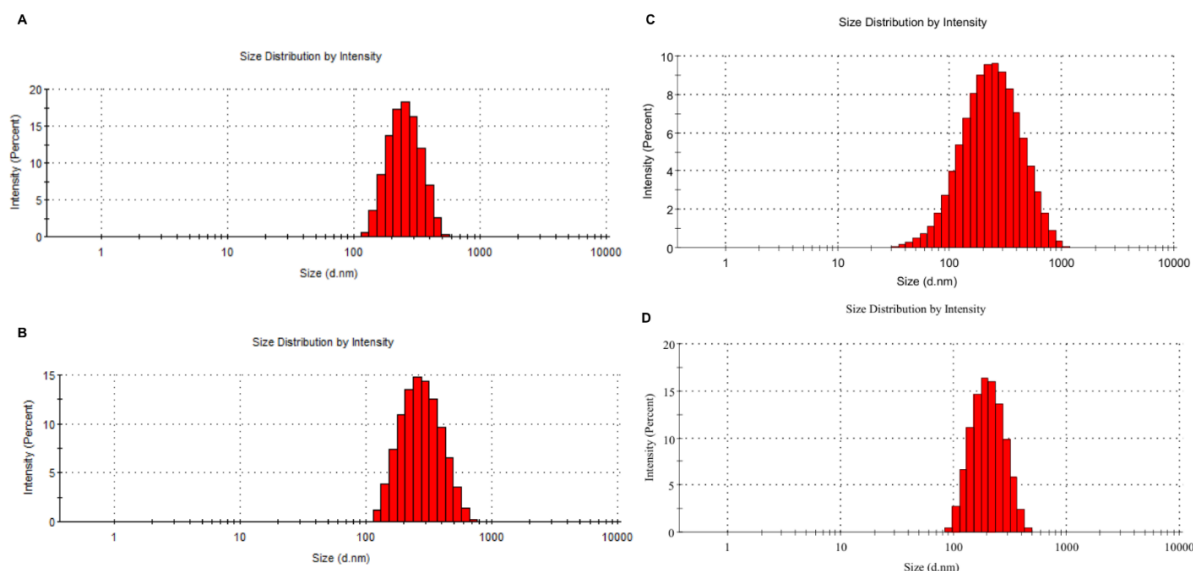
adicionais que promovem um arranjo mais compacto (Bagliotti Meneguini; Stringhetti Ferreira Cury; Evangelista, 2014; Gaikwad *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2025).

O índice de polidispersão (Pdl) é definido pela distribuição de tamanhos das NPs presentes, medindo sua homogeneidade. Um Pdl apresentado entre 0,1 e 0,30 indica uma distribuição estreita, ou seja, uma população monodispersa, enquanto valores acima de 0,5 sugerem uma distribuição ampla, denominada como polidispersa (Hoseini *et al.*, 2023). Na NP_B e NP_B_AR o índice se manteve em 0,17, e 0,28, respectivamente, indicando uma população monodispersa nas duas partículas, sendo que, tendo a partícula com amido aumentou a polidispersão do sistema, possivelmente devido ao aumento da viscosidade do meio acarretada por ele que predispõe o sistema a possível agregação entre as partículas ou devido a presença de amido livre (insolúvel) na solução (Liu *et al.*, 2021).

Em uma etapa seguinte, novas NPs foram desenvolvidas, partindo da NP_B e NP_B_AR adicionando MLZ na formulação (NP_MLZ, NP_MLZ_AR). As NPs demonstraram ausência de agregados. Ao passo que o diâmetro hidrodinâmico, exibido na Tabela 1, apresentou um valor médio de 221 nm e 237 nm, com um Pdl de 0,24 e 0,27, respectivamente, indicando homogeneidade na distribuição de suas populações e sem diferenças estatísticas relevantes ($p < 0,05$). Posteriormente, MLZ e PROP foram adicionados ao sistema, originando a formulação final NP_MLZ-P_AR e NP_MLZ-P, para comparação de duas partículas contendo ambos os princípios ativos com a presença e ausência do AR.

As amostras obtidas da formulação com todos os componentes (NP_MLZ-P_AR) e a ausência de AR (NP_MLZ-P) exibiram um diâmetro hidrodinâmico médio 212 nm em um Pdl médio de 0,17 e 233 nm em um Pdl médio de 0,22, apresentando distribuição de tamanho homogênea e unimodal (Figura 8) com os valores estatísticos sem grandes diferenças ($p < 0,05$). Sugere-se, que a adição de MLZ (carregado negativamente) e PROP (carregado negativamente) possa ter promovido maior interação eletrostática por meio de áreas adicionais com os grupos ionizáveis presente nos polímeros, gerando uma reorganização das cadeias poliméricas, gerando uma malha mais compacta, levando a redução do tamanho da partícula quando comparadas as partículas sem os princípios ativos (Robusti *et al.*, 2025).

Figura 8 – Gráficos de distribuição do diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas poliméricas processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C, em que (A) NP_B; (B) NP_MLZ-P; (C) NP_B_AR; (D) NP_MLZ-P_AR.



Fonte: Autor

O potencial zeta (PZ), também chamado de potencial eletrocinético, representa a variação de potencial entre a camada dupla elétrica de partículas e a camada dispersante (Bhattacharjee, 2016; Honary; Zahir, 2013). Quando apresentam valores entre -10 e +10 mV, as NPs são ditas como próximas a neutralidade e em valores maiores que +30 mV ou menores que -30 mV são ditas como intensamente catiônicas ou intensamente aniônicas, respectivamente, possuindo elevada repulsão eletrostática entre si e gerando menor possibilidade de agregação e maior estabilidade coloidal (Clogston; Patri, 2011; Parveen; Sahoo, 2010).

A NP_B e NP_B_AR, como pode ser observado na Tabela 1, apresentaram o potencial de +21 mV e +18 mV, indicando que a presença de amido pode estar relacionada a redução do PZ por alterar a organização e hidratação do meio (Chavan *et al.*, 2021). Além de ser um indicativo de uma futura possível queda de estabilidade devido a não obtenção de valores próximos a +30 mV. A densidade de carga positiva é resultante dos grupos aminos presentes na quitosana.

Na presença do fármaco (NP_MLZ) os valores do PZ se mantiveram em +22 mV, indicando a predominância das cargas positivas da QS. Com a adição do PROP (NP_MLZ-P) o valor se elevou para +29 mV, ainda indicando a forte predominância da carga da QS e a possibilidade de os princípios ativos não estarem associados completamente ou estarem integrados na matriz, não apresentando

influências na carga superficial da partícula (Athaval *et al.*, 2022). Entretanto, quando adicionamos mais um polímero aniônico (AR) (NP_MLZ-P_AR) os valores se reduzem para +15 mV, indicando mais uma vez a possível influência do AR em alterar a organização da estrutura (Chavan *et al.*, 2021).

5.2 Avaliação da distribuição de tamanho e concentração de nanopartículas por análise de rastreamento de nanopartículas

A técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) tem sua leitura embasada no movimento browniano, espalhamento de luz e a equação de Stokes-Einstein, em que por meio de uma câmera, o deslocamento de partículas é observado ao longo do tempo buscando a dispersão de maneira individual e calculando o tamanho de cada partícula (Bender *et al.*, 2012; Wells *et al.*, 2024). Dessa forma, o NTA se destaca ao investigar agregação e distribuição mais amplas quando comparadas ao DLS (Wells *et al.*, 2024).

Utilizando dessa técnica de caracterização, as amostras com a presença (NP_MLZ, NP_MLZ-P, NP_MLZ-P_AR) e ausência dos princípios ativos foram avaliadas (NP_B, NP_B_AR) e as distribuições de tamanho e concentrações encontradas durante a análise, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição de tamanho a partir de análise no NTA

	Diâmetro (nm)	D10	D50	D90	Concentração (partículas/mL)
NP_B	497	354	492	653	$5,18 \times 10^{10} \pm 1,10 \times 10^9$
NP_B_AR	154	126	149	187	$2,37 \times 10^{10} \pm 5,09 \times 10^8$
NP_MLZ-P	348	251	322	474	$4,11 \times 10^{10} \pm 9,05 \times 10^8$
NP_MLZ-P_AR	197	164	192	240	$1,61 \times 10^{10} \pm 9,05 \times 10^8$

NP_B: NP de ácido hialurônico e quitosana; NP_B_AR: NP de quitosana, ácido hialurônico e amido retrogradado; NP_MLZ: NP contendo ácido hialurônico, quitosana e mesalazina; NP-MP: NP contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato; NP- MP_AR: NP contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana, mesalazina e propionato.

Nas NPs sem MLZ e PROP, os valores encontrados para o diâmetro hidrodinâmico foram de 497 nm sem a presença do AR e 154 nm quando formulado com o amido, com uma concentração de $5,18 \times 10^{10} \pm 1,10 \times 10^9$ partículas/ml e

$2,37 \times 10^{10} \pm 5,09 \times 10^8$ partículas/mL, respectivamente. O mesmo padrão é observado nas NPs com ambos os princípios ativos, em que as partículas sem AR se apresentaram maior com 348 nm em comparação a NP_MLZ-P_AR com apenas 197 nm, e com concentrações maiores de $4,11 \times 10^{10} \pm 9,05 \times 10^8$ partículas/mL quando em comparação com a concentração de $1,61 \times 10^{10} \pm 9,05 \times 10^8$ partículas/mL na presença de AR.

Tais diferenças de tamanho entre as partículas corroboram com os dados avaliados no DLS, em que os valores do diâmetro na presença de amido se apresentaram menores. Validando a possibilidade de as propriedades do AR estarem diretamente associadas a compactação do tamanho apresentado.

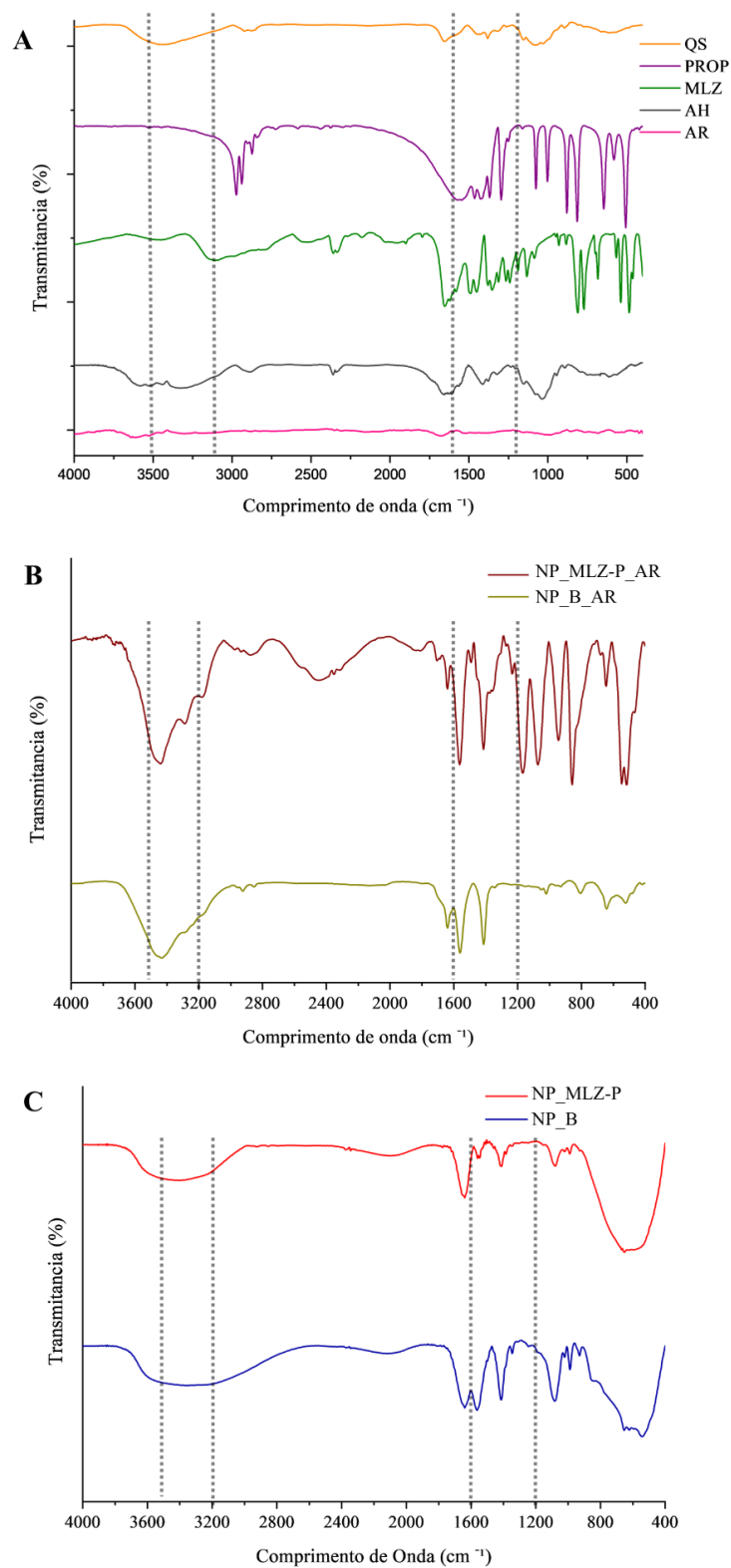
Ademais, quando comparados com os valores obtidos por meio do DLS, os valores obtidos pelo NTA foram menores nas NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR. A diferença pode estar associada ao princípio diferente entre as duas técnicas, em que o DLS mede o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e pode contabilizar agregados como uma única partícula, enquanto o NTA visualiza as partículas de forma individual e distingue diferentes populações (Kowkabany *et al.*, 2024; Rodriguez-Loya *et al.*, 2024). Contudo, quando observamos os valores de NP_B, NP_MLZ e NP_MLZ-P vemos que os números obtidos pelo NTA se apresentaram maiores, trazendo a possibilidade de as amostras analisadas estarem mais heterogêneas em comparação as outras. Essa ideia é reforçada quando é observado os valores de D10, D50 e D90 em que é mostrada uma dispersão mais ampla (Kim *et al.*, 2019). Ainda assim, os valores obtidos se enquadram dentro dos padrões da literatura entre 100 a 1000 nm, com as partículas finais (NP_MLZ-P e NP_MLZ-P_AR) obtendo os menores valores com baixa amplitude (George *et al.*, 2019).

Vale complementar que todas as concentrações obtidas, com ou sem AR e com ou sem a presença dos princípios ativos, apresentaram valores na potência de dez, indicando uma boa faixa de formação de partículas.

5.2.1 Caracterização das nanopartículas por espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier

A análise feita por FTIR tanto dos componentes separadamente quanto da NPs, permitiu avaliar as modificações estruturais ocorridas durante a formação dos sistemas nanoestruturados, além de identificar indícios importantes de interação intermolecular entre QS, AH, AR, MLZ e PROP, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Espectros de FTIR dos componentes isolados e das nanopartículas poliméricas. (A) quitosana (QS), ácido hialurônico (AH), amido retrogradado (AR), mesalazina (MLZ) e propionato (PROP); (B) nanopartículas NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR; e (C) nanopartículas NP_B, NP_MLZ e NP_MLZ-P.



PROP: propionato; QS: quitosana; AH: ácido hialurônico; AR: amido retrogradado; MLZ: mesalazina; NP_B_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico e amido retrogradado, quitosana; NP_MLZ-P_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana, mesalazina e propionato; NP_B: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana; NP_MLZ: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana e mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato.

Os espectros dos componentes isolados apresentaram bandas vibracionais compatíveis com as suas estruturas químicas. A QS (Figura 9A), por exemplo, apresentou uma banda mais larga entre 3500-3200 cm^{-1} relacionada ao estiramento dos grupos O-H e N-H, além do aparecimento de bandas de 1640 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} relacionadas às vibrações do grupo amida (amida I e amida II), presentes em quitosana parcialmente desacetilada (Kittur *et al.*, 2002; Polexe; Delair, 2013).

O AH (Figura 9A) apresentou bandas importantes entre aproximadamente 1600-1400 cm^{-1} associadas aos grupos carboxilato (COO^-), encarregados pela natureza aniônica do polímero e por sua elevada capacidade de interação eletrostática (Moghadam *et al.*, 2017). No AR bandas discretas referentes às suas vibrações O-H e às ligações glicosídicas C-O-C apareceram em 3200-3500 cm^{-1} e 1100-1150 cm^{-1} , respectivamente, comportamento frequentemente correlacionado ao aumento da organização molecular promovido pelo processo de retrogradação do amido (Singh *et al.*, 2003). Já a MLZ apresentou um espectro mais definido, com bandas associadas aos grupos funcionais hidroxila (3200-3600 cm^{-1}), amino (3300-3500 cm^{-1}) e carboxila (2500-3300 cm^{-1}), além de mostrar bandas características do anel aromático abaixo de 900 cm^{-1} , o PROP por outro lado, exibiu bandas referentes aos seus grupos carboxilatos ionizados entre aproximadamente 1500-1300 cm^{-1} (Sisodiya *et al.*, 2024; Villalobos *et al.*, 2021).

Após a formação das NPs, observaram-se alterações importantes nesses perfis espectrais. Nas formulações contendo os polímeros QS e AH ocorreu alargamento significativo da banda entre 3500-3200 cm^{-1} , indicando que houve um aumento das ligações de hidrogênio e a formação do complexo polieletrólítico entre os grupos amino protonados da QS e os grupos carboxilato do AH. Paralelamente, as bandas características do AH na região entre 1600-1400 cm^{-1} demonstraram a ocorrência de uma redução de intensidade e perda da definição do espectro, trazendo a possibilidade de uma participação direta dos grupos COO^- na interação eletrostática com a QS. Alterações similares também foram observadas na região de 1150-1000 cm^{-1} , correspondente às vibrações das ligações glicosídicas dos polissacarídeos,

indicando reorganização conformacional das cadeias poliméricas após a formação do sistema. Essas modificações são amplamente exibidas na literatura como evidências da formação de nanopartículas por complexação entre QS e AH (Polexe; Delair, 2013; Abka-khosroo *et al.*, 2017).

A NP_B_AR (Figura 9B) apresentou um espectro mais homogêneo quando comparado aos componentes na Figura 9A, sugerindo diminuição da organização das moléculas de cada um dos polímeros e a ocorrência da integração do AR à matriz formada por QS e AH. Com a incorporação da MLZ e do PROP na NP_MLZ-P_AR, observou-se aumento da complexidade do sistema, principalmente devido ao maior alargamento e intensidade da banda entre 3500-3200 cm^{-1} , indicando a possibilidade de um aumento das interações intermoleculares promovidas pelos grupos amino, hidroxila e carboxila da MLZ. Além disso, as bandas características da MLZ, especialmente aquelas próximas de 1647 cm^{-1} , 1571 cm^{-1} e abaixo de 900 cm^{-1} , apresentaram redução significativa de intensidade e perda de definição espectral. O mesmo comportamento foi observado para as bandas do PROP entre aproximadamente 1500-1300 cm^{-1} . Essas mudanças sugerem que MLZ e PROP não estão apenas fisicamente dispersos na matriz, mas efetivamente associados e molecularmente distribuídos na matriz polimérica, comportamento frequentemente relacionado à amorfização parcial dos princípios ativos em sistemas nanoestruturados (Passerini *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2024).

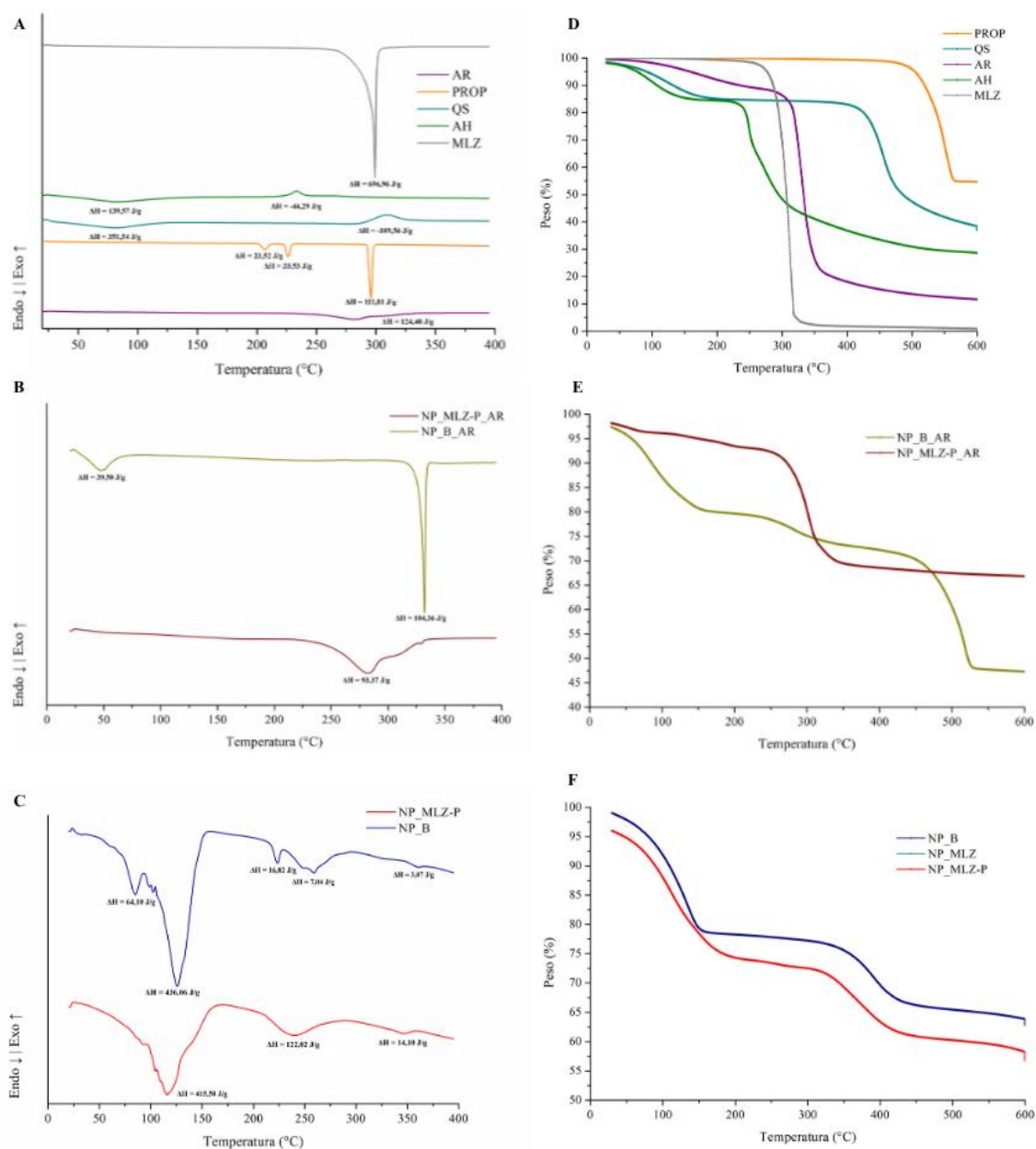
Esse comportamento tornou-se ainda mais claro nas nanopartículas NP_MLZ e NP_MLZ-P. Embora a NP_B (Figura 9C) já apresentasse forte interação entre QS e AH, evidenciada pelo alargamento das bandas O-H/N-H e pela diminuição da definição das bandas COO^- , a incorporação da MLZ promoveu aumento da interação entre os grupos funcionais do fármaco e os polímeros da matriz. Na NP_MLZ, as bandas características dos grupos funcionais da MLZ tornaram-se menos definidas, especialmente na região entre aproximadamente 1700-1400 cm^{-1} e abaixo de 900 cm^{-1} , indicando forte interação intermolecular e associação do fármaco. Já na NP_MLZ-P observou-se o espectro mais homogêneo dentre todas as formulações analisadas, com perda ainda maior da individualidade espectral da MLZ e do PROP. A região fingerprint apresentou perfil mais suavizado e menos resolvido, sugerindo a ocorrência de um aumento da amorfização do sistema e maior reorganização estrutural da matriz nanoparticulada, indicando uma melhora do perfil de MLZ como um fármaco classe IV.

De maneira geral, a análise comparativa dos espectros FTIR demonstrou que a formação das nanopartículas promoveu importantes alterações estruturais em relação aos componentes isolados. O alargamento progressivo das bandas relacionadas as ligações O-H/N-H, a redução da intensidade das bandas COO⁻ do AH e a perda de definição das bandas características da MLZ e do PROP evidenciam a formação do complexo polieletrólítico QS/AH e fortes interações intermoleculares entre os polímeros e os compostos bioativos. Essas modificações sugerem reorganização conformacional da matriz, redução da cristalinidade dos princípios ativos e associação efetiva da MLZ e do PROP nas nanopartículas, comportamento amplamente relatado para sistemas nanoestruturados destinados à liberação controlada de fármacos (Polexe; Delair, 2013; Pereira *et al.*, 2024).

5.2.2 Caracterização das nanopartículas por análises térmicas

As análises térmicas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA) foram empregadas com o intuito de investigar a estabilidade térmica, os eventos endotérmicos e exotérmicos e possíveis interações físico-químicas entre os componentes das formulações nanoparticuladas. Embora ambas as técnicas sejam baseadas na resposta do material à variação de temperatura, cada uma fornece informações distintas e complementares. A análise por DSC permite a identificação de transições térmicas como fusão, cristalização, transição vítrea e degradação, a partir das variações de fluxo de calor associadas a processos endotérmicos ou exotérmicos. Já O TGA fornece dados quantitativos sobre perda de massa em função da temperatura, permitindo avaliar processos como desidratação, decomposição térmica e formação de resíduos. A combinação dessas técnicas é amplamente recomendada para a caracterização térmica de sistemas farmacêuticos, uma vez que permite não apenas determinar a estabilidade térmica dos componentes, mas também identificar interações e alterações estruturais nas formulações (Kasap; Cappellini, 2021; McCafferty; Hackley, 2010). A partir delas foi possível uma avaliação complementar do comportamento térmico dos fármacos, polímeros e nanopartículas obtidas por diferentes estratégias de complexação polieletrólítica, conforme evidenciado nas Figuras 10, que apresentam, respectivamente, os resultados obtidos por DSC e TGA.

Figura 10. Termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial (DSC), em que A representa os materiais de partida (MLZ, PROP, QS, AH e AR), B as formulações contendo AR (NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR) e C as formulações sem AR (NP_B, NP_MLZ, NP_MLZ-P) na faixa de 30 a 400 °C. Curvas termogravimétricas (TG), em que D corresponde as matérias-primas (MLZ, PROP, QS, AH e AR), E as nanopartículas formuladas com AR (NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR) e F sem AR (NP_B, NP_MLZ, NP_MLZ-P) obtidas na faixa de 30 a 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio.



PROP: propionato; QS: quitosana; AH: ácido hialurônico; AR: amido retrogradado; MLZ: mesalazina; NP_B_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana; NP_MLZ-P_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana, mesalazina e propionato; NP_B: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana; NP_MLZ: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana e mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato.

A QS apresentou um evento endotérmico em 76,42 °C, atribuído à transição vítrea do polímero, conforme relatado por Kittur *et al.* (2002), e um evento exotérmico em 305,41 °C, relacionado à degradação térmica da cadeia polimérica (Ravi Kumar, 2000). A curva de TGA, representada corroborou esses dados, evidenciando uma perda inicial de massa abaixo de 100 °C devido à perda de água absorvida e uma perda acentuada próximo aos 400 °C, representando a carbonização do polímero.

O AH apresentou no DSC um pico endotérmico em 73,60 °C, típico da desidratação do polímero (Moghadam *et al.*, 2017), seguido por um evento exotérmico sutil em 229,75 °C, indicando decomposição térmica do polímero. Na análise de TGA dois eventos também foram observados, uma perda de massa entre 50–100 °C devido a desidratação do polímero e outro importante acima de 200 °C, confirmando o perfil térmico reportado na literatura.

O AR demonstrou, no DSC, um pico endo térmico único a 292,39 °C, compatível com a decomposição térmica do polímero. A curva TGA mostrou uma perda acentuada na mesma faixa, sendo correlacionada com a carbonização do polímero (Hoover, 2001).

O PROP apresentou pico endotérmico em 291,47 °C, associado à fusão do composto, valor compatível com a faixa de fusão descrita pelo fornecedor (285–286 °C) (Sigma-aldrich, 2024). A TGA indicou perdas de massa progressivas a partir de ~450 °C, associadas à degradação térmica.

A MLZ apresentou pico endotérmico intenso em 294,15 °C, com ΔH de 696,91 J/g, correspondente à fusão cristalina do fármaco. O elevado valor de entalpia confirma a alta cristalinidade da MLZ em sua forma pura. A análise termogravimétrica demonstrou perda de massa significativa iniciando próxima de 290 °C, associada à degradação térmica do fármaco após sua fusão. Esse comportamento é típico da MLZ cristalina e já foi amplamente descrito em sistemas farmacêuticos contendo MLZ (Mahmoud *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019).

As nanopartículas NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR apresentaram perfis térmicos distintos dos componentes isolados, indicando formação de uma nova matriz polimérica decorrente da interação entre QS, AH, AR e os compostos bioativos. Na NP_B_AR, O TGA demonstrou dois principais eventos de perda de massa: um abaixo de 100 °C, associado à evaporação de água adsorvida, e outro próximo de 320 °C, relacionado à degradação da matriz nanoparticulada. O deslocamento desse segundo

evento em relação às temperaturas de degradação da QS (305,41 °C), AH (229,75 °C) e AR (292,39 °C) sugere reorganização estrutural da matriz após formação da nanopartícula. Além disso, o desaparecimento ou deslocamento dos eventos térmicos individuais indica redução da organização cristalina original dos componentes e formação de uma estrutura mais amorfa, trazendo a possibilidade de contornar a baixa solubilidade da MLZ como um fármaco de classe IV. Na NP_MLZ-P_AR, os eventos térmicos característicos da MLZ (~294 °C) e do PROP (~291 °C) desapareceram ou tornaram-se significativamente reduzidos, sugerindo associação efetiva e dispersão molecular dos compostos ativos na matriz polimérica. A ausência do pico de fusão cristalina da MLZ indica amorfização parcial do fármaco, comportamento frequentemente associado ao aumento da solubilidade e melhora do perfil de liberação em sistemas nanoestruturados e trazendo uma otimização da MLZ como um fármaco classe IV pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutico (Passerini *et al.*, 2002). Os dados obtidos, portanto, conversam com os resultados do FTIR que também indicaram a amorfização parcial dos princípios ativos.

A nanopartícula NP_B apresentou perfil térmico significativamente diferente dos polímeros isolados, evidenciando forte interação entre QS e AH. Enquanto a QS apresentou evento endotérmico em 76,42 °C e o AH em 73,60 °C, a nanopartícula apresentou deslocamento desse evento para 86,25 °C. O aumento de aproximadamente 10 °C indica que a água estrutural se encontra mais fortemente retida na matriz nanoparticulada, exigindo maior aporte energético para evaporação. Esse comportamento pode ser explicado pela formação de uma rede polieletrólítica entre os grupos amino protonados da QS e os grupos carboxila do AH, promovendo aprisionamento mais eficiente das moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Pollexe; Delair, 2013).

Além disso, surgiu um novo evento endotérmico em 126,95 °C, inexistente nos polímeros isolados. O aparecimento desse pico sugere reorganização conformacional da matriz nanoparticulada, podendo estar associado ao relaxamento das cadeias poliméricas tensionadas durante a formação da nanopartícula ou à ruptura de novas ligações intermoleculares estabelecidas entre QS e AH. Eventos semelhantes já foram descritos em complexos polieletrólíticos QS/AH, nos quais a formação da nanopartícula promove alterações significativas na mobilidade molecular das cadeias poliméricas (Pollexe; Delair, 2013).

Os eventos exotérmicos característicos da degradação da QS (305,41 °C) e do AH (229,75 °C) desapareceram na NP_B, sendo substituídos por eventos endotérmicos em 224,80 °C e 260,45 °C. Essa alteração demonstra modificação do mecanismo de degradação térmica após formação do complexo polieletrólítico. A substituição do perfil exotérmico por endotérmico sugere predominância de processos de despolimerização e clivagem térmica das cadeias em detrimento dos processos de carbonização observados nos polímeros isolados. O deslocamento da degradação da QS de 305,41 °C para 260,45 °C indica redução da estabilidade térmica individual da cadeia polimérica devido à substituição das interações QS-QS por novas interações QS-AH (Abka-khosroo *et al.*, 2017).

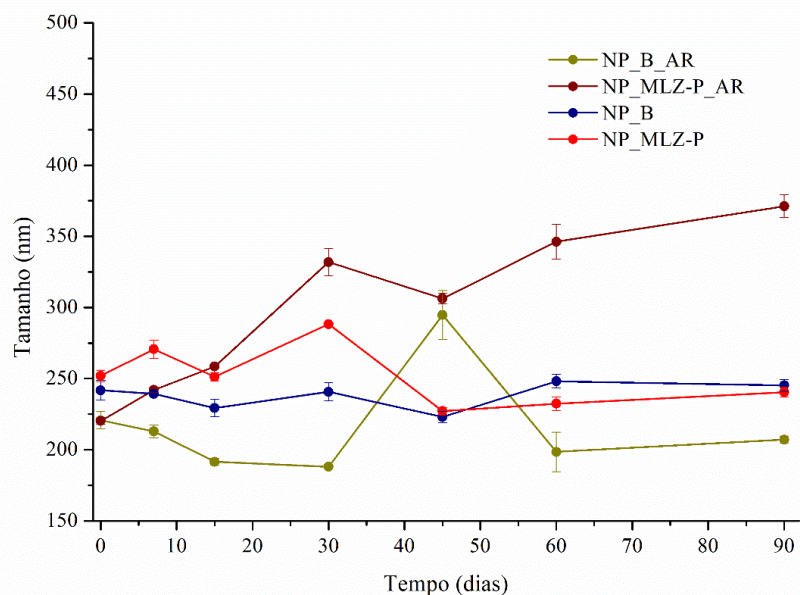
A nanopartícula NP_MLZ-P apresentou perfil térmico mais complexo após incorporação simultânea da MLZ e do PROP. Os eventos endotérmicos característicos da MLZ (294,15 °C) e do PROP (291,47 °C) desapareceram na formulação nanoparticulada, indicando associação efetiva, a redução significativa da cristalinidade dos compostos ativos e a possibilidade de contornar as propriedades da MLZ como um fármaco classe IV. A ausência simultânea dos picos de fusão sugere dispersão molecular dos compostos na matriz QS/AH, indicando forte interação intermolecular entre os princípios ativos e os polímeros, em que esses dados se relacionam diretamente com os dados obtidos de FTIR que demonstraram o potencial dos componentes em amorfizar e integrar o sistema. Além disso, os eventos térmicos apresentaram deslocamentos em relação às nanopartículas anteriores, sugerindo que o a MLZ e o PROP promoveram reorganização adicional da rede polimérica e alteração da densidade de empacotamento molecular da matriz. No TGA, observou-se perfil de degradação distinto das demais formulações, com alterações nas etapas de perda de massa e deslocamentos térmicos associados à degradação da matriz nanoparticulada. Essas mudanças indicam que a presença simultânea da MLZ e do PROP promoveu reorganização estrutural adicional do sistema (Ferreira *et al.*, 2018).

5.3 Avaliação da estabilidade física preliminar das nanopartículas poliméricas

Nanopartículas podem apresentar como limitação, a formação de agregados ao longo do tempo, juntamente com uma redução ou aumento do PZ, principalmente se as partículas apresentam valores menores ao $|\zeta|$, onde forças de atração podem ser prevalentes (Rodrigues *et al.*, 2015). Por esse motivo, com o intuito de entender o comportamento das NPs e sua estabilidade físico-química ao longo do

tempo, com a presença (NP_MLZ-P e NP_MLZ-P_AR) e ausência de princípios ativos (NP_B_AR e NP_B), o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram analisados ao longo de 90 dias. Os dados obtidos nas amostras estão compilados na Figura 11.

Figura 11 – Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo das nanopartículas poliméricas submetidas a estabilidade física preliminar por um período de 90 dias. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C.



NP_B_AR: nanopartícula de quitosana, ácido hialurônico, amido retrogradado; NP_MLZ-P_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana, mesalazina e propionato. NP_B: nanopartícula de ácido hialurônico e quitosana; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato.

Pelos resultados obtidos é possível observar que entre as partículas constituídas sem princípios ativos, a NP sem a presença de AR (NP_B) foi aquela que obteve menor variação no diâmetro hidrodinâmico ao longo de 90 dias, em torno de 20 nm. Em contrapartida a NP_B_AR, demonstrou uma redução de 40 nm com o passar dos dias seguida de um aumento e um retorno ao tamanho anterior, mostrando as pequenas mudanças estruturais possivelmente feitas pelo AR, como a perda de água (Karim *et al.* 2000).

As partículas com a presença do polímero (NP_MLZ-P e NP_MLZ-P_AR), por sua vez, apresentaram variações mais distintas entre si. Tendo a partícula NP_MLZ-P oscilado em torno das análises entre 20 a 30 nm, enquanto a NP_MLZ-P_AR apenas apresentou aumento exponencial, chegando a ficar 100 nm a mais em comparação a medida inicial. O aumento pode ter acontecido devido a aproximação entre as partículas induzida pelo AR, em que, associadas com o princípio da técnica

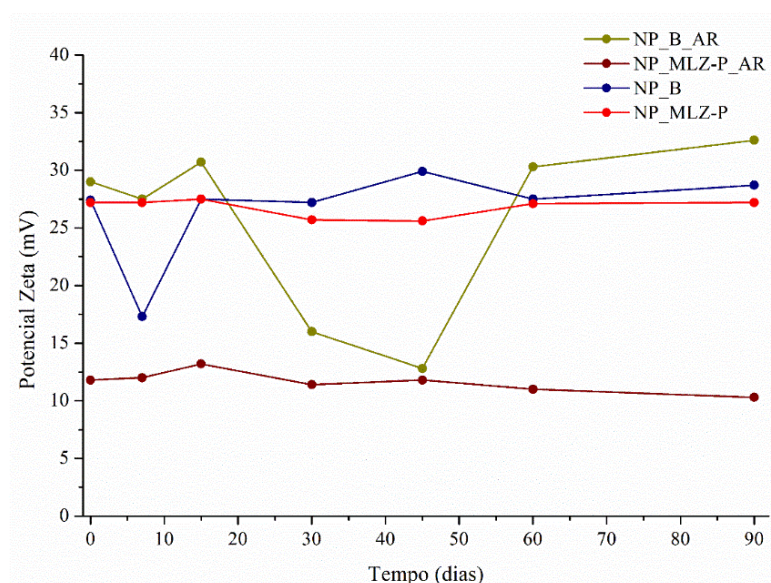
de análise do DLS, pode ter detectado a formação dos agregados como partículas individuais (Chavan *et al.*, 2021; Rodriguez-Loya *et al.*, 2024; Farkas *et al.*, 2021).

Além disso, conforme as análises foram sendo realizadas ao longo do tempo, começou-se a observar visualmente a formação de precipitados no meio das amostras contendo AR (NP_B_AR e NP_MLZ-P_AR), desenvolvendo melhor as ideias sobre a influência do AR discutidas nas análises de DLS e NTA, sobre o poder de interação do amido.

A precipitação nas formulações, portanto, pode estar associada ao aumento da cristalinidade do amido e a redução da hidratação da matriz polimérica causada por ele ao longo do tempo. Essa ação ocorreria devido a reassociação molecular que o amido passa no processo de retrogradação, em que as cadeias estruturadas passam a serem mais compactas e menos acessíveis à água (hidrofóbicas), promovendo agregação e redução da estabilidade coloidal que gerando os agregados visualizados (Chavan *et al.*, 2021; Karim *et al.*, 2000).

Como uma análise complementar para entender as interações químicas que estavam ocorrendo entre os componentes do sistema, além dos resultados do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, o PZ das partículas também foram monitorados ao longo do tempo. Os resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Potencial zeta em função do tempo das nanopartículas poliméricas submetidas a estabilidade física preliminar por um período de 90 dias. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C



NP_B_AR: nanopartícula de quitosana, ácido hialurônico e amido retrogradado; NP_MLZ-P_AR: nanopartícula contendo ácido hialurônico, amido retrogradado, quitosana mesalazina

e propionato. NP_B: nanopartícula de ácido hialurônico e quitosana; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato.

De acordo com a Figura 12, o PZ das partículas com ausência de AR mantiveram melhor seu potencial ao longo dos dias, tendo a NP_B iniciado e terminado na faixa dos +27 mV, enquanto a NP_MLZ-P, iniciou com +25 mV e terminou no nonagésimo dia com +26 mV. As medições, portanto, se preservaram próximos ao módulo de 30 mV demonstrando a estabilidade do sistema, que não formou visualmente nenhum precipitado, e que se mantiveram alinhados com o que foi observado na caracterização inicial no DLS.

Entretanto, os resultados das NPs com o amido em sua composição apresentaram um comportamento diferente. A NP_MLZ-P_AR, por exemplo, apesar de conseguir manter seus valores de PZ ao longo do tempo na faixa de +11 mV e +12 mV não sustentou a estabilidade do sistema e começou a apresentar precipitados em torno do décimo quinto dia. Por outro lado, a NP_B_AR, embora tenha se iniciado com um PZ próximo ao módulo de 30 (+ 29 mV), apresentou um decréscimo acentuado no trigésimo dia (+16 mV), período em que os agregados começaram a serem visualizados na amostra.

A redução ou permanência do PZ em um baixo valor, junto ao aumento de tamanho e aparecimento de precipitado, portanto, sustenta a ideia da redução gradual da estabilidade coloidal do sistema com a presença de AR e a ideia de que apesar da ausência de carga, a participação dele no sistema pode ter acarretado alterações na organização da estrutura da matriz de forma dinâmica e contínua, camuflado as cargas superficiais do grupos carregados da CS, aumentado a cristalinidade e expulsado a água de forma gradual da matriz (Karim *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2024).

Baseado em todas as análises feitas de estabilidade, em que há a evidência da redução do PZ, aumento de tamanho hidrodinâmico e presença de precipitado, as NPs com amido foram descontinuadas e a NP_B e NP_MLZ-P foi a escolhida para dar prosseguimento dos estudos subsequentes.

5.4 Avaliação da eficiência de associação (EA%)

A eficiência de associação (EA%) é um parâmetro importante na caracterização de sistemas de liberação controlada, sendo responsável por determinar a fração do fármaco efetivamente incorporada à matriz do sistema em relação à quantidade total inicialmente empregada na formulação. Essa medida

fornece informações cruciais sobre a capacidade do sistema carreador, neste caso, NPs obtidas por complexação polieletrólítica, de proteger e transportar o princípio ativo até o local de ação (Silva *et al.*, 2020; ICH Q6A, 2000).

A eficiência de associação foi quantificada por meio da separação do fármaco livre do encapsulado por ultracentrifugação e subsequente análise por CLAE. As porcentagens de MLZ e PROP obtidas após o procedimento foram compiladas na Tabela 3.

Tabela 3 – Média do percentual de associação e capacidade de carregamento da mesalazina e do propionato em nanopartículas obtidas por complexação quantificadas por CLAE. Os valores representam a média $\pm$ DP de três análises independentes (n=3).

Componente	EA%	Drug Loading (%)
MLZ	10%	2,8%
PROP	59%	16%

A eficiência de associação (EA%) da MLZ apresentada na Tabela 3, apresenta-se baixa quando comparada com a literatura. Pereira *et al.* (2024), desenvolveu complexos polieletrólíticos de QS, alginato e hidroxipropilmetilcelulose ftalato e conseguiu uma EA% de 43,2-61,7% para MLZ e 28,3-30,6% em sua forma molecularmente dispersa. Já em Fátima *et al.* (2025), a EA% obtida foi em torno de 62,3% de NPs de QS e carboximetilcelulose de sódio.

Tal valor baixo quando comparado com a literatura, de apenas 10% de EA%, pode estar relacionado ao equilíbrio entre suas formas iônicas em pH 6,0, condição na qual aproximadamente 50% do fármaco encontra-se na forma zwitteriônica e 50% na forma aniônica (Robusti *et al.*, 2025). Embora a forma aniônica favoreça interações eletrostáticas com a quitosana, de caráter catiônico, a elevada proporção da espécie zwitteriônica pode ter reduzido a intensidade dessas interações, comprometendo a retenção do fármaco na matriz nanoparticulada.

Considerando que o sistema é formado pela co-encapsulação de dois componentes com propriedades físico-químicas distintas, pode ocorrer uma disputa por sítios de interações entre componentes. Estudos anteriores, como o de Celano e colaboradores (2022) demonstraram que sistemas com co-encapsulação podem resultar em eficiências de associações mais baixas devido à competição entre os

fármacos e às limitações de interação com a matriz da NP, corroborando para a queda da associação da MLZ e do PROP no sistema.

A EA% do PROP quando comparado, por exemplo com o obtido por Carvalho *et al.* (2025) em que PROP teve 39% de EA% em um sistema nano-in-micro de PLGA, mostra que o componente se apresentou dentro do esperado na literatura e com uma faixa de EA% até mais elevada. Essa melhor EA% do PROP (59%), pode estar relacionada às características físico-químicas desse composto, especialmente ao seu elevado grau de ionização em pH próximo à neutralidade. O ácido propiônico apresenta pKa em torno de 4,87, de modo que, em pH 6,0, o PROP encontra-se predominantemente em sua forma aniônica. Nessa condição, o fármaco pode interagir eletrostaticamente com a QS, de caráter catiônico, favorecendo sua incorporação à matriz nanoparticulada.

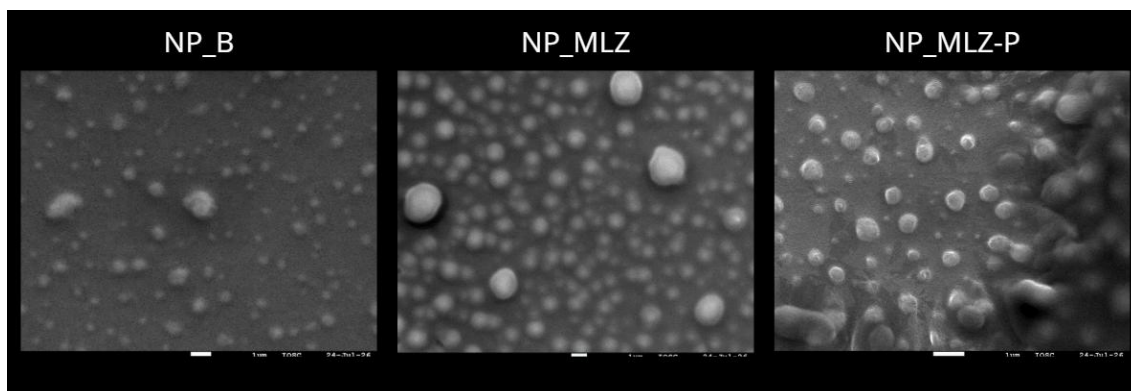
Entretanto, devido à sua alta solubilidade em meio aquoso e baixo peso molecular, parte do PROP pode permanecer dispersa na fase contínua durante o processo de formação das NPs, limitando sua retenção no sistema. Assim, a associação intermediária observada possivelmente resulta do equilíbrio entre interações eletrostáticas favoráveis com a QS, a elevada afinidade do PROP pelo meio aquoso.

A demonstração da associação na matriz, traz a ideia favorável dos componentes estarem mais presente em meio a matriz polimérica por não alterarem significativamente os valores de PZ no DLS e por corroborarem com os dados em NP_MLZ-P, em que a MLZ e PROP influenciaram na mudança dos eventos térmicos do DSC e perda de massa no TGA em relação aos componentes livres e consequentemente na amorfização do sistema. Ademais, também demonstra os resultados de FTIR que mostram a interação do AGCC e da MLZ com os polímeros.

5.5 Análise da morfologia das nanopartículas

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização morfológica utilizada para obter imagens da superfície de materiais e sistemas em elevada resolução, permitindo que forma, organização, textura e homogeneidade morfológica e aglomerações possam ser avaliadas (Aziz *et al.*, 2025). As NPs constituídas apenas com polímeros (NP_B), com MLZ (NP_MLZ) e com MLZ e PROP (NP_MLZ-P) foram avaliadas e agrupadas na Figura 13.

Figura 13 – Fotomicrografias das nanopartículas poliméricas (NP_B, NP_MLZ e NP_MLZ-P) obtidas por MEV-LEO (modelo 440).



NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico; NP_MLZ: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico com mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico com mesalazina e propionato.

As micrografias obtidas por MEV, evidenciou a formação de estruturas nanoparticuladas para as três formulações obtidas, possibilitando a caracterização da morfologia e organização superficial das NPs. A formulação NP_B apresentou predominantemente estruturas arredondadas e relativamente dispersas dentro do campo visualmente analisado, enquanto a NP_MLZ apresentou organização das estruturas visualmente diferente, com partículas mais claramente delimitadas e maior heterogeneidade entre as NPs observadas. Na formulação NP_MLZ-P as estruturas exibidas obtiveram estruturas predominantemente arredondadas, menor homogeneidade, além da presença de regiões de agrupamento.

A morfologia predominantemente esférica apresentada em todas as formulações condiz com sistemas nanoparticulados obtidos por complexação polieletrólítica, envolvendo QS e AH, em que estudos recentes realizados por Caro-León e colaboradores (2025), também obtiveram estruturas predominantemente semiesféricas. A formação está diretamente relacionada com a interação entre os polieletrólitos QS e AH, em que os grupos amino protonáveis da QS e os grupos carboxílicos do AH, se apresentam de forma ionizada e possibilitando interações eletrostáticas e a formação de complexos polieletrólíticos. Durante o processo, a interação entre as cadeias de cargas opostas promove reorganização conformacional dos polímeros e estruturas, que podem variar dependendo das condições de formação (Caro-León *et al.*, 2025).

A mudanças obtidas com a adição de MLZ (NP_MLZ e NP_MLZ-P), pode estar relacionada com a participação do fármaco no processo de organização da

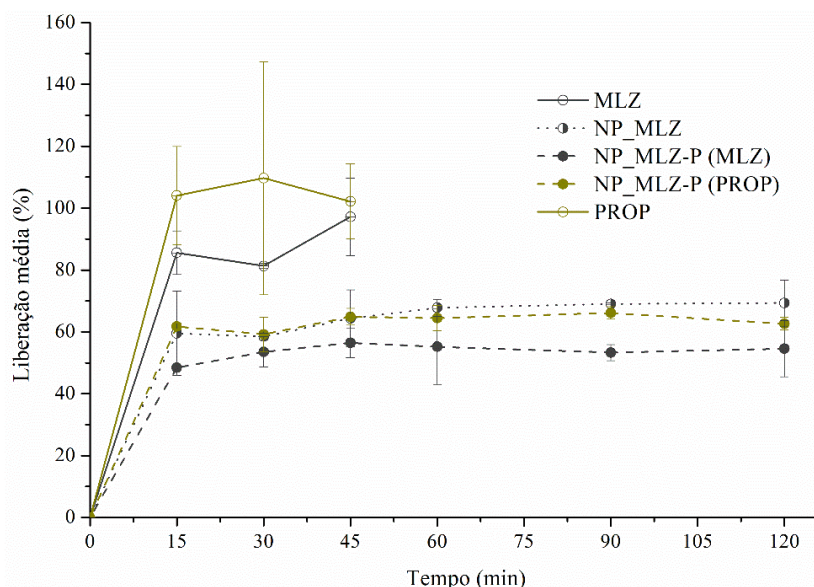
matriz polimérica. Robusti *et al.* (2025) observaram por meio de experimentação e modelagem molecular, que as espécies do fármaco apresentam diferentes padrões de associação de acordo com pH do meio. Em pH próximo a seis, há a formação de agregados mais compactos que podem ainda serem afetados pela presença de quitosana (Robusti *et al.*, 2025).

5.6 Estudo do perfil de liberação da mesalazina e do propionato

5.6.1 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da mesalazina e propionato das nanopartículas

Quando um medicamento é administrado, seu desempenho terapêutico se relaciona diretamente ao seu perfil de liberação considerando as condições do sistema de liberação. Para entender o perfil de liberação de NPs frente às variações apresentadas ao longo do TGI, as nanopartículas foram testadas em pH 1,2 (gástrico) e pH 6,8 (côlonico) e comparado com os perfis de liberação do fármaco e do metabólito em suas formas livres (Figura 14 e 15).

Figura 14 – Perfil de liberação da mesalazina e do propionato a partir de nanopartículas poliméricas compostas apenas por MLZ e por MLZ e PROP em meio ácido (HCl/KCl; pH 1,2). Cada ponto representa a média $\pm$ D.P. de três experiências independentes (n=3).



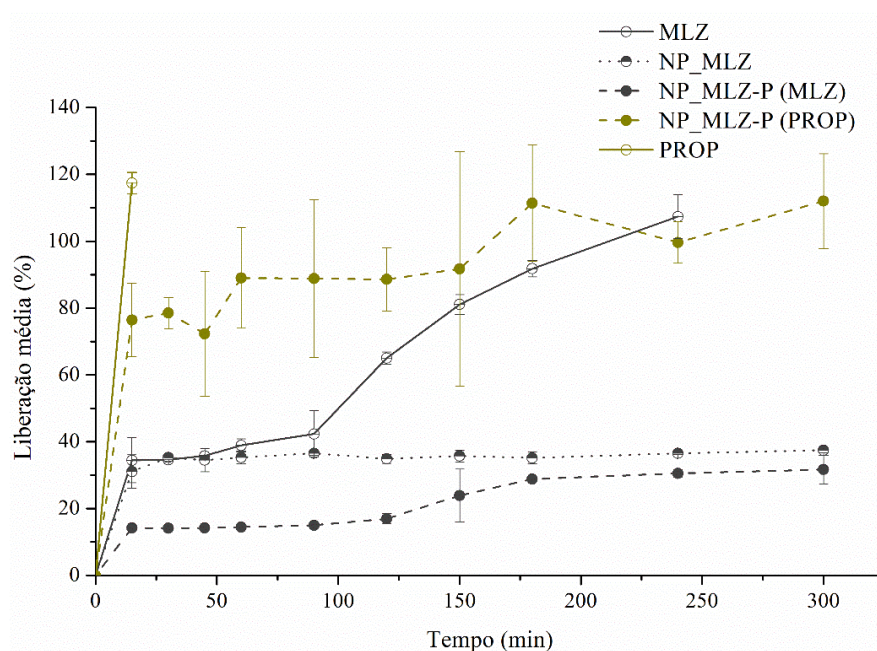
MLZ: mesalazina; PROP: propionato; NP_MLZ: NP_MLZ-P (MLZ): nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina NP_MLZ-P (MLZ): análise da liberação da mesalazina na nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato; NP_MLZ-P (PROP): análise da liberação do propionato na nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato

O delineamento do perfil de liberação em meio ácido (pH 1,2) demonstrou diferenças entre os compostos livres e associados ao sistema nanoparticulado. A MLZ livre apresentou uma liberação alta já no primeiro tempo avaliado (85,58%), enquanto o PROP atingiu valores de 100% nos primeiros 15 min de análise, indicando dissolução praticamente imediata para o meio. O comportamento apresentado está dentro do esperado devido as propriedades físico-químicas dos compostos. A MLZ possui elevada solubilidade em meios aquosos ácidos, enquanto o PROP, por ser um AGCC de baixa massa molecular e alta hidrossolubilidade, difunde rapidamente para o meio, sem a presença de uma barreira física que limite sua disponibilidade.

Em comparação, quando associados as nanopartículas de QS e AH, houve uma redução significativa da fração liberada nos primeiros 15 min do ensaio. A NP_MLZ apresentou liberação inicial de aproximadamente 60%, enquanto a formulação contendo simultaneamente MLZ e PROP liberou cerca de 48% e 62%, respectivamente no mesmo intervalo. Esses resultados demonstram o potencial da capacidade da matriz polimérica em atuar como uma barreira difusional, retardando a saída dos compostos em relação às formas livres.

Contudo, apesar dessa redução, observa-se que todas as formulações apresentaram uma fração inicial relativamente elevada de liberação, algo frequentemente descrito em sistemas nanoparticulados, em que parte do fármaco permanece adsorvida, não encapsulado ou localizada nas regiões mais superficiais da nanopartícula e por isso é liberada primeiro quando em contato com o meio. Após essa fase inicial, os perfis das NPs obtiveram certa constância, evidenciando que grande parte do fármaco e do metabólito permaneceram retidas na matriz polimérica durante o período de exposição ao meio ácido.

Figura 15 – Perfil de liberação da mesalazina e do propionato a partir de nanopartículas poliméricas compostas apenas por MLZ e por MLZ e PROP em tampão fosfato (pH 6,8). Cada ponto representa a média $\pm$ D.P. de três experiências independentes (n=3).



MLZ: mesalazina; PROP: propionato; NP_MLZ: NP_MLZ-P (MLZ): nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina NP_MLZ-P (MLZ): análise da liberação da mesalazina na nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato; NP_MLZ-P (PROP): análise da liberação do propionato na nanopartícula contendo ácido hialurônico, quitosana, mesalazina e propionato.

Já em meio básico, mimetizando o pH colônico de 6,8, o perfil de liberação apresentou comportamento distinto do observado em meio ácido, enfatizando a influência do pH sobre a dinâmica de liberação dos encapsulados. A MLZ livre nos primeiros 15min obteve uma liberação de 34% com aumento progressivo com o passar do tempo obtendo 100% após 240 min. Os resultados apresentados se relacionam ao pH do meio, em que a molécula se encontra com parte da molécula em sua forma aniônica devido a desprotonação do grupo carboxílico, mas parte em sua forma zwitteriônica favorecendo o aumento e permanência em solução. O PROP livre, por sua vez, apresentou uma liberação imediata nos primeiros 15min atingindo 100%. Tal valor já era esperado, tendo em vista a elevada hidrossolubilidade e baixa massa molecular, facilitando sua difusão.

A NP contendo MLZ (NP_MLZ) não apresentou elevada liberação inicial (31,06%), e mantendo-se praticamente constante ao longo do tempo. Apresentando resultados semelhantes na NP_MLZ-P (MLZ), com liberação de 14,17% e mantendo-se mais baixa durante todo o experimento. Os valores obtidos demonstram a

capacidade da matriz de restringir a difusão da MLZ. Além disso, ao comparar NP_MLZ e NP_MLZ (MLZ) há a possibilidade de que a presença de PROP modifica a organização interna da matriz e altera o perfil de liberação do sistema.

Em contraste, a liberação de PROP na formulação (NP_MLZ-P (PROP)) demonstrou resultados diferentes. Apesar de iniciar em 76% de liberação, um valor menor quando comparado ao metabólito livre, o PROP ainda teve uma disponibilidade elevada ao longo do ensaio, provavelmente devido as suas características intrínsecas do componente (molécula pequena e hidrofílica). Portanto, apesar de conseguir reduzir sua liberação inicial, a difusão do componente ainda predomina.

5.6.2 Análise dos mecanismos de liberação in vitro da mesalazina e propionato

Diferentes mecanismos podem atuar de forma simultânea ou isolada para a liberação de fármacos em sistemas de NPs, podendo ser comandados por difusão, intumescimento/dissolução, entre outros. Para prever o mecanismo de ação regente no sistema de liberação, modelos matemáticos são aplicados, gerando informações importantes para desenvolvimento de insights dos mecanismos e um design melhorado. (Peppas; Narasimhan, 2014).

Para entender qual o mecanismo atuante, os modelos matemáticos de Korsmeyer - Peppas, Higuchi, First order, Hixson - Crowell, Baker - Lonsdale e Weibull foram aplicados aos resultados de liberação e os coeficientes e dados obtidos nas diferentes NPs e meios foram representados na Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4 – Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em tampão fosfato (pH 1,2).

Modelos matemáticos		Amostras		
		NP_MLZ	NP_MLZ-P (MLZ)	NP_MLZ-P (PRO)
Primeira Ordem	K	0,0222	0,0133	0,0207
	r^2	0,4682	0,0465	0,2346
Hixson-Crowell	K	0,0058	0,0036	0,0053
	r^2	0,2691	0,0000	0,0000
Baker-Lonsdale	K	0,0019	0,0011	0,0017
	r^2	0,7601	0,6013	0,6197
Higuchi	K	8,1149	6,6380	7,8069
	r^2	0,5807	0,4434	0,4135
Weibull	K	8,3073	-	4,0386
	r^2	0,9508	-	0,9757
	B	0,7431	-	0,8970
Korsmeyer-Peppas	K	45,3469	45,1185	56,6938
	r^2	0,9940	0,9893	0,9922
	N	0,0912	0,0441	0,0278

Tabela 5 – Coeficientes de modelos matemáticos aplicados aos perfis de liberação a partir das nanopartículas (Higuchi, Korsmeyer Peppas, First order, Hixson-Crowell e Weibull) em tampão fosfato (pH 6,8).

Modelos matemáticos		Amostras		
		NP_MLZ	NP_MLZ-P (MLZ)	NP_MLZ-P (PRO)
Primeira Ordem	<i>K</i>	0,0021	0,0013	0,0697
	<i>r</i> ²	0,0000	0,5909	0,8210
Hixson-Crowell	<i>K</i>	0,0001	0,0004	0,0046
	<i>r</i> ²	0,0000	0,5624	0,3775
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0001	0,0000	0,0017
	<i>r</i> ²	0,1383	0,8660	0,6474
Higuchi	<i>K</i>	2,5595	1,7142	7,1389
	<i>r</i> ²	0,0077	0,8630	0,3682
Weibull	<i>K</i>	0,0967	574,69	50,8985
	<i>r</i> ²	0,9659	0,7724	0,7337
	<i>B</i>	0,7268	0,7546	0,5387
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	28,7730	2,8774	47,1520
	<i>r</i> ²	0,9936	0,8670	0,9475
	<i>N</i>	0,0405	0,4020	0,1387

Analisando e realizando os cálculos para os modelos matemáticos e observando os valores obtidos de *r*², os que mais se aproximaram aos valores de 0,99 em ambos os valores de pH e nanopartículas, foi o modelo de Korsmeyer-Peppas.

O modelo de Korsmeyer e Peppas (1984) se baseia na Lei das Potências, fazendo a relação exponencial da liberação do fármaco ao longo do tempo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (\text{Equação 4})$$

Em que, *M_t* simboliza a quantidade de fármaco ou metabólito liberada no tempo *t*, *M_∞* é a quantidade total de fármaco liberada em um tempo infinito, *k* é uma constante cinética e *n* é o expoente de liberação.

A partir da obtenção do valor de *n*, é possível classificar o mecanismo de liberação que o fármaco está realizando na matriz polimérica. Seguindo o modelo de Korsmeyer-Peppas, os valores de *n* < 0,43 indicam que a liberação do sistema está

ocorrendo pela difusão Fickiana, controlada por difusão das moléculas do fármaco. Enquanto os valores no obtidos no intervalo entre 0,43 e 0,85 demonstram mecanismos que envolvem o transporte anômalo ou não-Fickiano, em que ambos os processos, intumescimento e difusão, contribuem para que a liberação aconteça. Para valores de $n=0,85$, a classificação é de transporte Caso II, em que ocorre o relaxamento e intumescimento da matriz polimérica e o fármaco é liberado. Já para valores com $n > 0,85$ o mecanismo é denominado como super Caso II, em que as taxas de liberação são aceleradas e ocorrem devido ao elevado estado de mobilidade da matriz ou do processo erosivo (Korsmeyer; Peppas, 1984; Peppas; Narasimhan, 2014).

Os valores de expoente de difusão (n) permaneceram em $n<0,43$ para todas as formulações avaliadas em pH 1,2 e pH 6,8. Caracterizando o transporte Fickiano e indicando que a etapa limitante da liberação no sistema é majoritariamente a difusão das moléculas através da matriz polimérica sem influência significativa de processos erosivos ou de relaxamentos de cadeia, sendo as NPs portanto, uma barreira física de controle para a migração do fármaco e metabólito.

Os valores obtidos corroboram com as propriedades físico-químicas dos compostos e o perfil de liberação apresentado, em que a MLZ apresentou um perfil de liberação elevado em pH 1,2, devido a elevada solubilidade do fármaco em meios aquosos ácidos, por possuir um primeiro pK_a de 2,09. Enquanto o PROP, teve a difusão favorecida devido ao tamanho pequeno de sua molécula e hidrossolubilidade elevada, demonstrando uma liberação em sua forma livre ainda maior em pH 6,8 devido ao pK_a de 4,87. Quando na presença de nanopartículas essas propriedades puderam ser melhor controladas, obtendo um processo de difusão mais lento e controlado em comparação a sua forma livre.

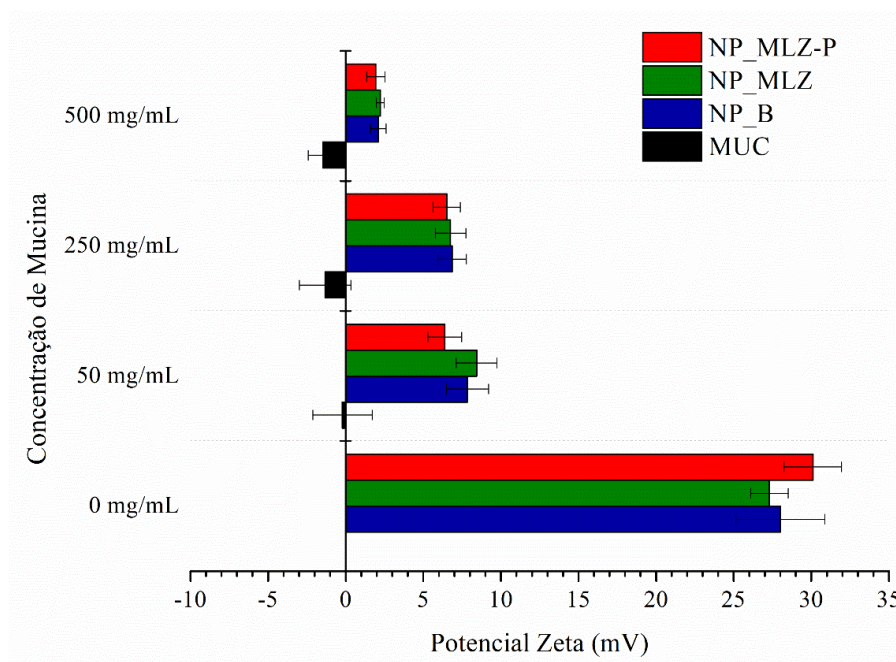
5.7 Avaliação da performance biológica *in vitro*

5.7.1 Estudo da interação entre a mucina e o sistema através do potencial zeta

A análise do potencial zeta do sistema em presença de mucina (MUC) permite simular, através de três diferentes valores de pH, a interação das NPs ao longo do trato gastrointestinal, trazendo uma perspectiva de como é a interação entre as NPs e o muco nas diferentes condições do TGI (Bogataj *et al.*, 2003; Dilkush *et al.*, 2026) Os valores de pH selecionados foram de 1,2, 5,8 e 6,8, mimetizando os valores gástrico, colônico inflamado e colônico saudável, respectivamente.

No sistema ideal espera-se que as NPs não interajam com a MUC no pH 1,2, mantendo-se integras para que a liberação e interação seja direcionada completamente ao cólon, principalmente no pH de 5,8, que mimetiza as condições de pH do ambiente inflamado. Na Figura 16 é possível observar o PZ das nanopartículas em diferentes concentrações de MUC (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) em pH 1,2.

Figura 16 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 1,2. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C.



MUC: mucina; NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico; NP_MLZ: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico e mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico, mesalazina e propionato.

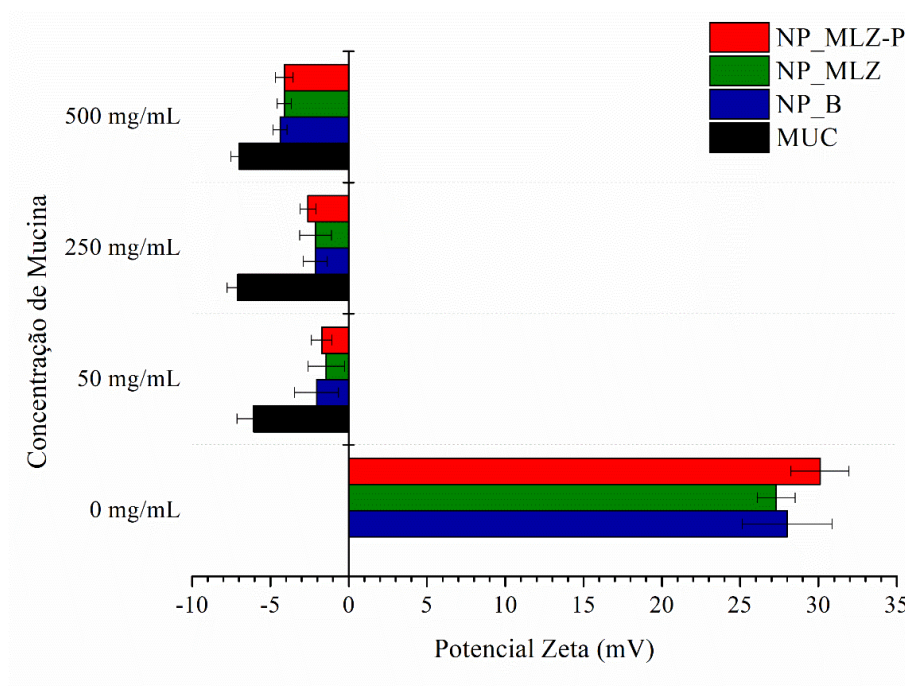
Apesar de apresentarem densidade de carga negativa (Figura 16), as amostras contendo apenas MUC apresentaram baixa densidade de carga. Isso ocorre pois nessas condições o pH do meio (1,2) encontra-se abaixo do pKa da MUC (2,6) não permitindo a ionização completa de seus grupamentos siálicos e, portanto, baixa densidade de carga (Lewis *et al.*, 2022; Grover, Smith, 2013).

As NPs na ausência de MUC apresentaram valores de PZ similares aos demonstrados anteriormente em DLS e NTA, próximo ao |30|. Entretanto, ao observar os outros resultados obtidos é possível ver as mudanças do PZ quando as NPs estão na presença de MUC. Em que, conforme a concentração da glicoproteína aumenta, a

diferença da amostra contendo apenas a glicoproteína com a contendo as formulações se torna menor, chegando a valores mais próximos ao zero com as NPs na presença e ausência dos ativos, indicando que há interação com a MUC e que sua concentração influencia diretamente nessa interação.

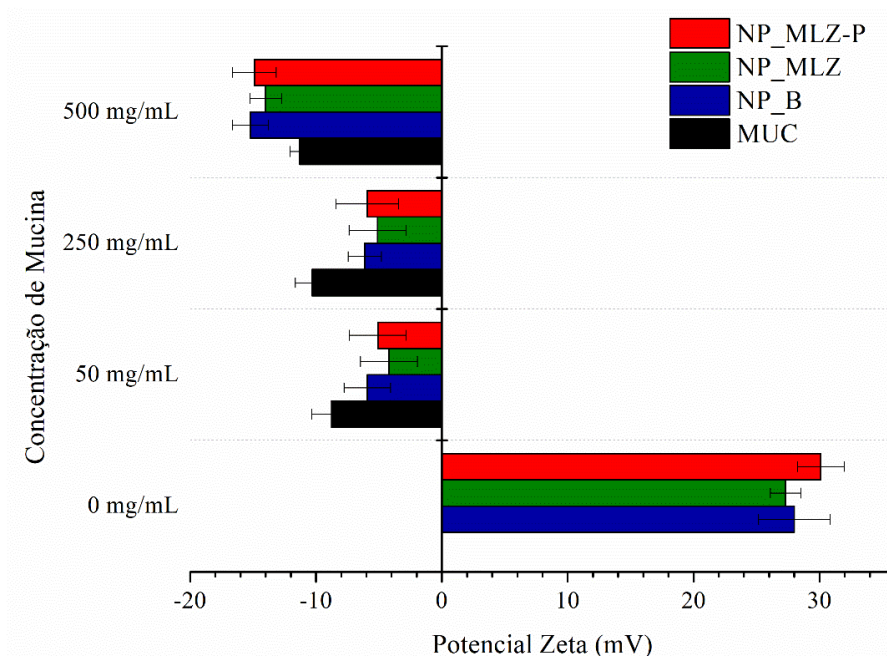
Nas Figuras 17 e 18 está representado amostras submetidas a diferentes concentrações de MUC, porém agora na presença de soluções tampões fosfato em pH 5,8 (ambiente colônico inflamado) e 6,8 (ambiente colônico saudável).

Figura 17 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 5,8. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C.



MUC: mucina; NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico; NP_MLZ: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico e mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico, mesalazina e propionato.

Figura 18 – Valores de potencial zeta com a adição de soluções de mucina em diferentes concentrações (50 mg/mL, 250 mg/mL e 500 mg/mL) nas NPs com a presença e ausência dos princípios ativos em pH 6,8. As análises foram processadas por DLS sob ângulo de detecção de 173° a 25 °C.



MUC: mucina; NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico; NP_MLZ: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico e mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula contendo quitosana, ácido hialurônico, mesalazina e propionato.

Como esperado da MUC, quando foi submetida a um pH superior ao seu pKa de 2,6 (pH 5,8 e 6,8) apresentou densidade de carga maior quando comparadas com as condições gástricas devido a ionização dos grupos siálicos. Na presença das NPs, diferente dos resultados observados anteriormente, elas apresentaram valores de PZ negativos desde a presença da glicoproteína em baixas concentrações, apresentando inversão de carga. As interações eletrostáticas que ocorrem entre a MUC e as NPs, nesses valores de pH, são favorecidas devido a diferença acentuada de cargas entre ambos, que favorece interações eletrostáticas, porém, outras interações também podem ocorrer favorecendo a mucoadesão, como ligações de hidrogênio, ocorrendo uma maior adsorção da MUC e, portanto, gerando valores de potencial zeta negativos (Robusti *et al.*, 2025).

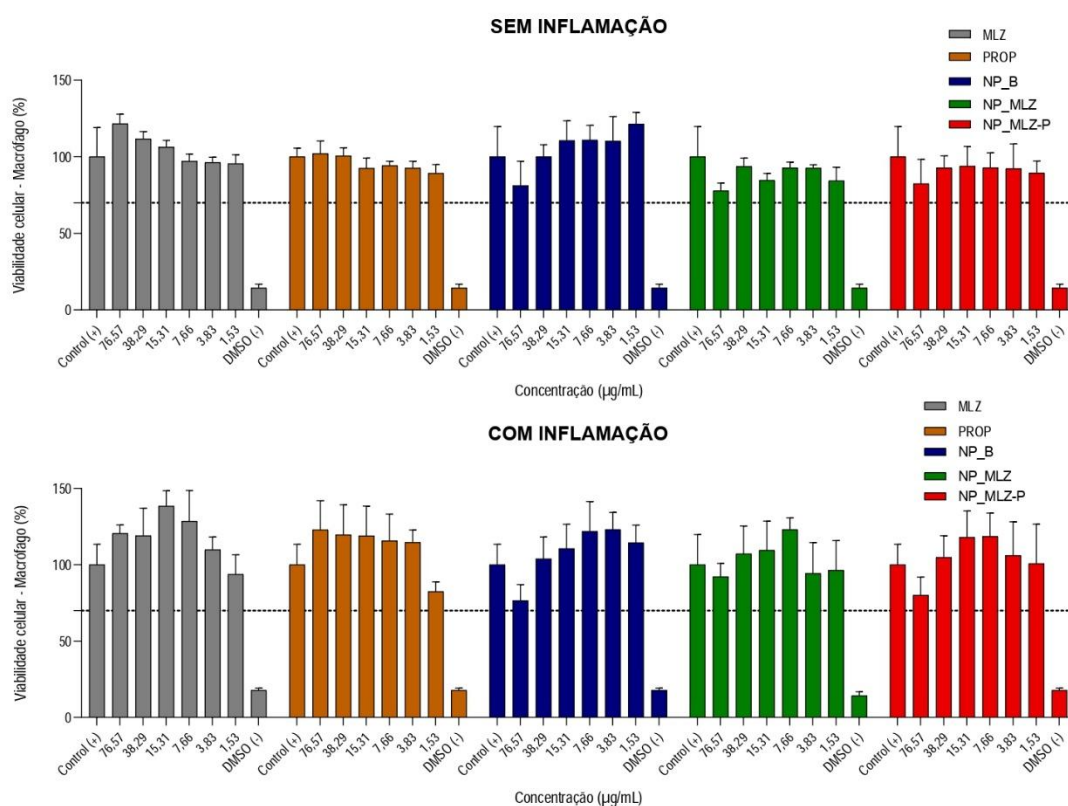
Os resultados demonstraram que as NPs apresentam forte capacidade de interação com a mucina e que essas interações foram favorecidas em condições mais básicas (tanto para pH mimetizando condições saudáveis quanto inflamadas). Como o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de NPs mucoadesivas para liberação

colón-específica de MZL e PROP, a baixa capacidade de interação das nanopartículas com o muco em condições gástricas são benéficas para o estudo, pois a retenção de partículas no estômago poderia provocar a liberação prematura dos ativos, comprometendo o objetivo do trabalho. Enquanto a interação em condições intestinais favorece a retenção local e o aumento do tempo de ação.

5.7.2 Estudo de biocompatibilidade *in vitro* em macrófagos

O estudo de biocompatibilidade com macrófagos é feito para determinar a toxicidade basal intrínseca de cada amostra. Já quando sob estímulo de lipopolissacarídeos (LPS) simula o microambiente patológico das DII, com aumento do estresse oxidativo e declínio na homeostase celular, verificando a citotoxicidade dos ativos e formulações em um ambiente inflamado (Gao *et al.*, 2025).

Figura 19 – Viabilidade celular (%) determinada pelo ensaio de resazurina em macrófagos após exposição por 24 h a diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de mesalazina (MLZ), nanopartículas vazias (NP_B) e nanopartículas carregadas com mesalazina e propionato (NP_MLZ-P). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=2$).



NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico, NP_MLZ-P: nanopartícula com mesalazina e propionato, MLZ: mesalazina livre, PROP: propionato livre

Os resultados na figura 19 demonstraram que todas as formulações e princípios ativos avaliados se mostraram altamente biocompatíveis e seguros, mantendo a viabilidade acima do limiar de 80%, em todas as concentrações. Os critérios estabelecidos pela norma internacional ISO 10993-5, determina a avaliação biológica de dispositivos médicos e insumo e classifica como não citotóxicos valores acima de 70%. Estabelecendo, portanto, que o sistema e os compostos não são citotóxicos.

A redução da viabilidade nas NPs (NP_B e NP_MLZ-P) na concentração mais elevadas (76,57 µg/mL) quando comparada aos princípios ativos livres (MLZ e PROP), pode estar refletindo a resposta fisiológica dos macrófagos frente à intensa captação endocítica de sistemas nanoestruturados e não necessariamente um aumento de toxicidade. Já que os macrófagos são células fagocíticas especializadas e quando expostas a densidades elevadas de nanopartículas catiônicas podem realizar uma internalização celular rápida, podendo gerar estresse metabólico temporário devido ao tráfego endossomal (Li *et al.*, 2023).

5.7.3 Estudo da biocompatibilidade *in vitro* em células HT29-MTX e Caco-2

Os ensaios de viabilidade celular constituem uma etapa fundamental na avaliação pré-clínica de novos sistemas terapêuticos para DII, pois permitem determinar a citotoxicidade basal, segurança e faixa de concentração segura de compostos antes de estudos funcionais mais complexos (Riss *et al.*, 2016). Em particular, no contexto da DII, esses ensaios são essenciais para garantir que sistemas de liberação, como nanopartículas, não comprometam a integridade do epitélio intestinal, que já se encontra fragilizado em condições inflamatórias crônicas.

No contexto de modelos intestinais, linhagens como Caco-2 e HT29-MTX são amplamente utilizadas por mimetizarem características funcionais do epitélio intestinal humano, sendo a primeira associada a enterócitos absorptivos e a segunda a células secretoras de muco. A utilização dessas linhagens em conjunto ou isoladamente permite avaliar de forma mais realista a interação de NPs com o epitélio intestinal e possíveis efeitos citotóxicos (Le huyer *et al.*, 2020).

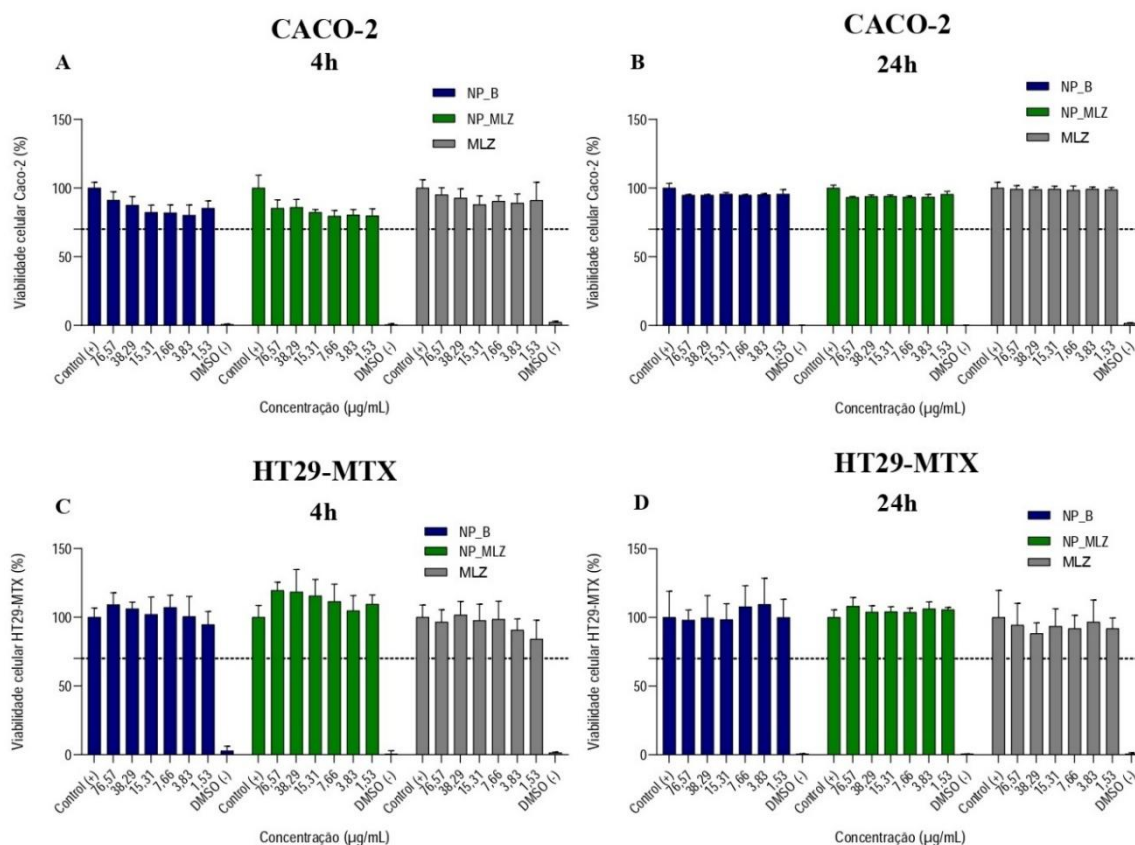
Vale ressaltar que os ensaios de viabilidade celular das linhagens Caco-2 e HT29-MTX foram realizados utilizando apenas as NPs contendo MLZ, sem a incorporação de PROP (NP_MLZ), a fim de evitar possíveis interferências biológicas promovidas pelos AGCCs sobre as linhagens celulares utilizadas no modelo intestinal.

Estudos demonstram que o PROP é capaz de modular diretamente a proliferação e diferenciação celular em certas linhagens de células intestinais, incluindo HT29 e CACO-2, induzindo aumento da atividade de fosfatase alcalina e promovendo um fenótipo mais diferenciado (Gamet *et al.*, 1992).

Além disso, o PROP apresentou efeito antiproliferativo significativo em células HT29, alterando processos relacionados ao crescimento celular e diferenciação epitelial (Gamet *et al.*, 1992). Resultados semelhantes também são descritos para células Caco-2, nas quais os AGCCs podem influenciar proliferação e diferenciação celular. Dessa forma, a utilização de formulações contendo PROP poderia interferir no comportamento basal do modelo celular, comprometendo a interpretação dos resultados de viabilidade e permeabilidade (Fu *et al.*, 2004). Portanto, optou-se pela utilização apenas da formulação NP_MLZ, para esses modelos celulares, visando minimizar vieses experimentais e garantir maior confiabilidade na avaliação biológica das nanopartículas.

Os resultados de viabilidade celular obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 20 e evidenciam diferenças importantes entre as linhagens celulares avaliadas, bem como entre os tratamentos testados (MLZ, NP_B e NP_MLZ), em função da concentração e do tempo de exposição (4 h e 24 h).

Figura 20 – Viabilidade celular (%) determinada pelo ensaio de resazurina em células Caco-2 (A)(B) e HT29-MTX (C)(D) após exposição por 4 h e 24 h a diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de mesalazina livre (MLZ), nanopartículas vazias (NP_B) e nanopartículas carregadas com mesalazina (NP_MLZ). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=2$).



A: Viabilidade 4h de nanopartícula com ausência de fármaco (NP_B), nanopartícula com MLZ (NP_MLZ) e fármaco livre (MLZ) em CACO-2; **B:** Viabilidade 24h de nanopartícula com ausência de fármaco (NP_B), nanopartícula com MLZ (NP_MLZ) e fármaco livre (MLZ) em Caco-2; **C:** Viabilidade 4h de nanopartícula com ausência de fármaco (NP_B), nanopartícula com MLZ (NP_MLZ) e fármaco livre (MLZ) em HT29-MTX; **D:** Viabilidade 24h de nanopartícula com ausência de fármaco (NP_B), nanopartícula com MLZ (NP_MLZ) e fármaco livre (MLZ) em HT29-MTX.

De maneira geral, observa-se que a linhagem Caco-2 apresentou maior redução de viabilidade em comparação à HT29-MTX, indicando maior sensibilidade aos tratamentos. Por outro lado, as células HT29-MTX mantiveram níveis de viabilidade mais elevados ao longo das concentrações testadas, sugerindo maior resistência celular. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de uma camada de muco e por mecanismos de proteção celular mais desenvolvidos nessa linhagem, que reduzem a exposição intracelular aos compostos, enquanto as células

Caco-2, por apresentarem fenótipo absorptivo, tendem a internalizar com maior eficiência as substâncias testadas (Sambuy *et al.*, 2005).

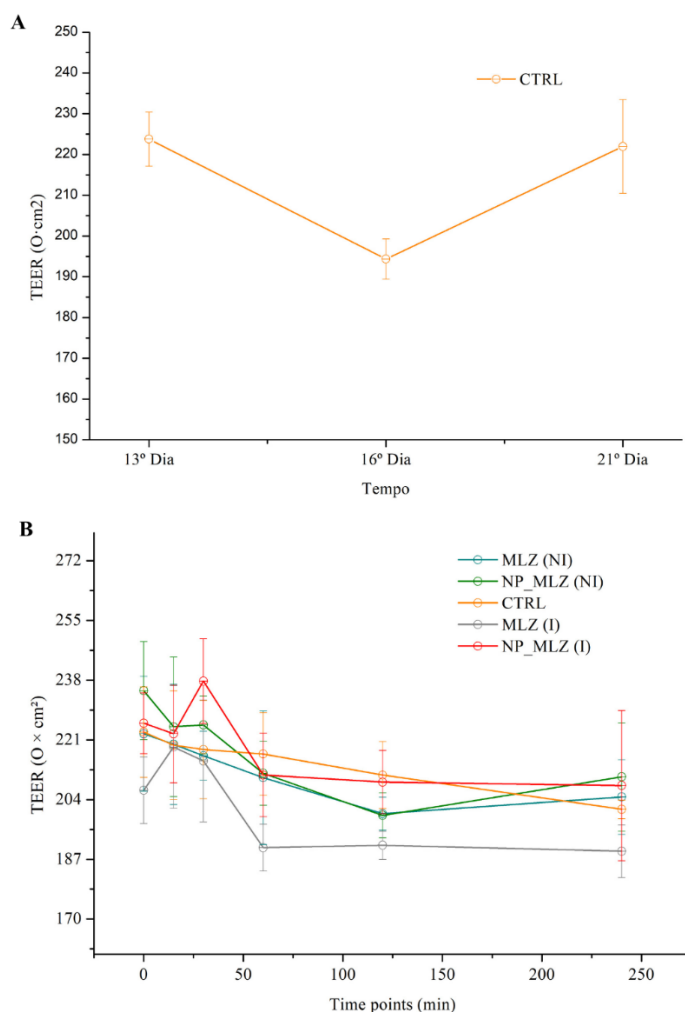
Em relação ao fármaco livre (MLZ) apresentou redução moderada da viabilidade, especialmente na linhagem Caco-2 após 24 horas de exposição nas maiores concentrações. Esse resultado é consistente com dados da literatura que indicam que a MLZ, embora amplamente utilizado e considerado seguro para o tratamento da DII, pode induzir estresse oxidativo e interferir em vias inflamatórias celulares quando empregado em concentrações elevadas, resultando em redução da proliferação celular (Klotz *et al.*, 2010). Ainda assim, a manutenção de viabilidade relativamente elevada nas concentrações mais baixas reforça o perfil de segurança do fármaco.

5.7.4 Permeabilidade *in vitro* 3D

5.7.4.1 Avaliação da resistência elétrica transepitelial (TEER)

A avaliação da permeabilidade epitelial em modelos intestinais tridimensionais é uma etapa essencial no desenvolvimento de sistemas de liberação oral para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais (DII), pois permite investigar simultaneamente a integridade da barreira epitelial e o transporte de fármacos ao longo do tempo. A monitorização do TEER (transepithelial electrical resistance) é amplamente empregada como um indicador sensível da coesão das junções de oclusão, sendo particularmente relevante em modelos que simulam condições inflamatórias, nas quais ocorre redução da resistência elétrica e aumento da permeabilidade paracelular (Lea, 2015; Baldwin; Nehra, 2021). Assim, a combinação de medidas de TEER com ensaios de permeabilidade permite inferir se um sistema promove ou preserva a integridade da mucosa intestinal ao mesmo tempo em que viabiliza o transporte do fármaco.

Figura 21 – Gráfico da variação de TEER ao longo dos 21 dias do crescimento do modelo (A) e das diferentes amostras em diferentes time-points durante o ensaio de permeabilidade.



A: Ctrl: controle; **B:** MLZ (NI): fármaco livre em condição não inflamada, NP_MLZ (NI): nanopartícula com mesalazina em condição não inflamada, CTRL: controle, MLZ (I): fármaco livre em condições inflamatórias, NP_MLZ (I): nanopartícula com mesalazina em condições inflamatórias.

Os resultados obtidos para o TEER ao longo de 4 h de experimento, apresentados na Figura 21, demonstram o comportamento das formulações contendo mesalazina livre (MLZ), NPs carregadas com mesalazina (NP_MLZ) e controle, em condições não inflamadas (NI) e inflamadas (I). De maneira geral, observa-se que os valores iniciais de TEER são mais elevados na condição não inflamada, enquanto o modelo inflamado apresenta resistência reduzida desde o início do experimento, refletindo a disfunção de barreira típica da DII. Esse comportamento está de acordo com a literatura, que descreve que citocinas pró-inflamatórias e alterações na mucosa promovem desorganização das junções de oclusão e aumento da permeabilidade epitelial (Lee *et al.*, 2018).

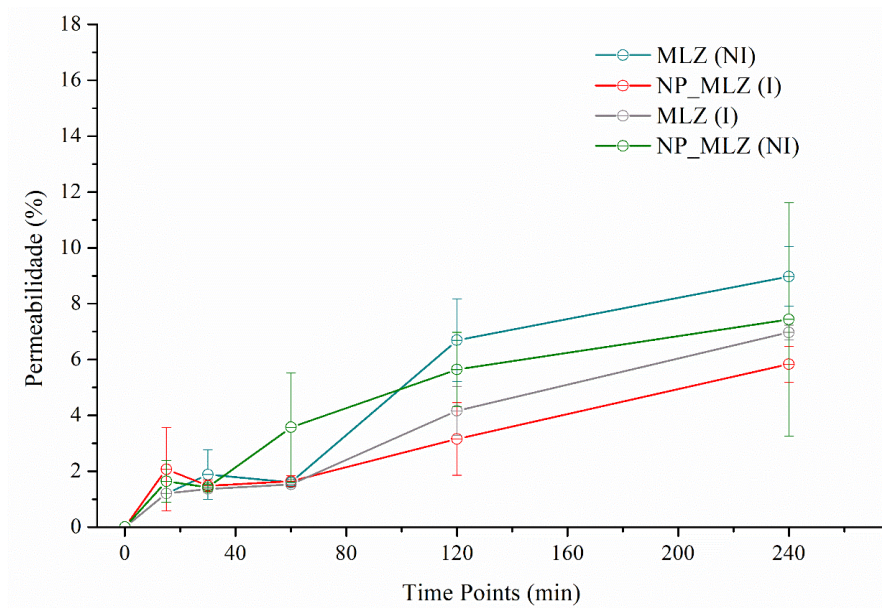
Ao longo do tempo, nota-se uma tendência de redução moderada do TEER em todos os grupos, o que é esperado em ensaios de permeabilidade devido à manipulação experimental e à exposição contínua das células às formulações. Entretanto, essa redução foi mais pronunciada no grupo inflamado, indicando maior suscetibilidade da barreira epitelial sob condição inflamatória. Comparativamente, o tratamento com NP_MLZ não promoveu queda abrupta do TEER, mantendo valores próximos aos observados para o fármaco livre e para o controle, sugerindo que as nanopartículas não comprometem a integridade da monocamada intestinal. Esse achado é relevante, uma vez que sistemas nanoparticulados mucoadesivos devem promover aumento de contato com a mucosa sem induzir danos estruturais ao epitélio (Englert *et al.*, 2020).

5.7.4.2 Avaliação da permeabilidade no modelo 3D

A avaliação da permeabilidade em modelos intestinais tridimensionais constitui uma etapa fundamental para investigar a capacidade de sistemas carreadores em atravessar a barreira epitelial e, ao mesmo tempo, preservar a integridade da monocamada. Esse tipo de ensaio é importante para estimar o comportamento de fármacos e nanoformulações no trato gastrointestinal, especialmente no contexto de DII, nas quais alterações estruturais e funcionais da barreira epitelial podem modificar a absorção e a biodisponibilidade de compostos terapêuticos (Antunes *et al.*, 2013; Lamprecht, 2015).

Para a realização do teste de permeabilidade em modelo 3D, foram utilizadas as NP_MLZ devido a presença das linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX para a composição do modelo.

Figura 22 – Perfil de permeabilidade (%) em função do tempo (15 min, 30 min, 1h, 2h e 4h) para a mesalazina livre (MLZ) e encapsulada em nanopartículas poliméricas (NP_MLZ), avaliadas em modelo intestinal 3D nas condições não inflamada (NI) e inflamada (I).



MLZ (NI): fármaco livre em condição não inflamada, NP_MLZ (NI): nanopartícula com mesalazina em condição não inflamada, MLZ (I): fármaco livre em condições inflamatórias, NP_MLZ (I): nanopartícula com mesalazina em condições inflamatórias.

Os resultados de permeabilidade obtidos ao longo de 240 minutos apresentados na Figura 22. demonstram um aumento progressivo da passagem do fármaco para o compartimento basal em todas as condições avaliadas, com diferenças claras entre o fármaco livre (MLZ) e a formulação nanoparticulada (NP_MLZ), bem como entre os modelos inflamado (I) e não inflamado (NI). Em termos gerais, observa-se que a condição MLZ (NI) apresentou os maiores valores de permeabilidade ao final do ensaio (~8,9%), seguida de NP_MLZ (NI) (~7,4%), MLZ (I) (~6,9%) e, por fim, NP_MLZ (I) (~5,8%). Esse comportamento sugere que o processo inflamatório reduz a eficiência de transporte, enquanto a nanoencapsulação modula a cinética de liberação e difusão do fármaco.

A menor permeabilidade observada no modelo inflamado está de acordo com a literatura, que descreve que, embora a inflamação intestinal possa aumentar a permeabilidade paracelular em estágios iniciais, a presença de muco espessado, infiltrado inflamatório e alterações estruturais da mucosa pode dificultar a difusão efetiva de partículas e moléculas, especialmente em modelos tridimensionais mais complexos (Salopek *et al.*, 2019; Paradiso *et al.*, 2021). Dessa forma, a redução

observada na condição inflamada pode refletir uma barreira mais heterogênea e menos permissiva à difusão controlada das formulações.

Quando se compara o fármaco livre com a nanoformulação, observa-se que a NP_MLZ apresenta uma permeabilidade globalmente menor, tanto em condições NI quanto I. Esse resultado é esperado e pode ser considerado desejável no contexto de DII, uma vez que sistemas nanoparticulados são projetados para promover retenção local e liberação controlada no sítio inflamatório, reduzindo a absorção sistêmica e aumentando a concentração do fármaco na mucosa intestinal (Lamprecht, 2015; Zhang *et al.*, 2022). Assim, a menor taxa de permeação observada para NP_MLZ sugere que a formulação pode favorecer um efeito terapêutico local mais prolongado.

Adicionalmente, a cinética temporal mostra que as maiores diferenças entre os grupos surgem após 120 e 240 minutos, indicando que os mecanismos de transporte são dependentes do tempo e possivelmente influenciados por processos de difusão, interação com o muco e internalização celular. A elevação gradual da permeabilidade ao longo do tempo para todas as formulações indica ausência de saturação do sistema no período avaliado e reforça a estabilidade da barreira epitelial durante o experimento.

Em conjunto, os dados demonstram que a NP_MLZ apresenta um perfil de permeabilidade mais controlado em comparação ao fármaco livre, especialmente em condições inflamatórias, o que é consistente com os resultados obtidos no ensaio de mucoadesão em mucina e com as estratégias modernas para a liberação de fármacos voltadas ao tratamento de DII. Esses resultados indicam potencial da formulação para aumentar a ação local, minimizar efeitos sistêmicos e melhorar o direcionamento do fármaco ao tecido inflamado.

5.7.4.3 Avaliação da permeabilidade aparente (Papp)

A avaliação da permeabilidade aparente (Papp) constitui uma etapa fundamental na caracterização de sistemas de liberação oral, especialmente no contexto de formulações destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias intestinais (DII). Esse parâmetro permite estimar a capacidade de um composto ou sistema nanoestruturado de atravessar a barreira epitelial intestinal, fornecendo informações relevantes sobre seu potencial de absorção e de ação local no sítio inflamatório (Hubatsch; Ragnarsson; Artursson, 2007; Ansari *et al.*, 2022).

Nos presentes resultados, os valores de Papp obtidos situaram-se majoritariamente na ordem de 10^{-6} cm/s, faixa compatível com compostos de baixa a moderada permeabilidade em modelos epiteliais, como amplamente descrito para fármacos hidrofílicos e sistemas nanoparticulados (Hubatsch; Ragnarsson; Artursson, 2007). Observou-se que o fármaco livre (MLZ) apresentou valores de Papp na ordem de $\sim 10^{-6}$ cm/s, enquanto a formulação nanoparticulada (NP_MLZ) atingiu valores mais elevados, chegando a aproximadamente $1,65 \times 10^{-5}$ cm/s na condição não inflamada (NI). Esse aumento sugere que a nanoestruturação favoreceu o transporte através da barreira epitelial, possivelmente por mecanismos adicionais de interação célula-partícula, como endocitose e transporte transcelular, já descritos para nanopartículas poliméricas mucoadesivas (Ansari *et al.*, 2022; Vetter *et al.*, 2021).

A comparação entre as condições não inflamada (NI) e inflamada (I) demonstrou uma tendência de redução dos valores de Papp no modelo inflamado, tanto para o fármaco livre quanto para a nanoformulação. No caso da NP_MLZ, os valores médios na condição inflamada situaram-se em torno de $7,4 \times 10^{-6}$ cm/s, inferiores aos observados no estado não inflamado. Esse comportamento pode ser explicado pelas alterações estruturais e bioquímicas associadas à inflamação intestinal, como aumento da secreção de muco, presença de mediadores inflamatórios e modulação das junções intercelulares, que impactam diretamente a difusão e o transporte de moléculas e partículas através da barreira epitelial (Parikh *et al.*, 2019; Vetter *et al.*, 2021).

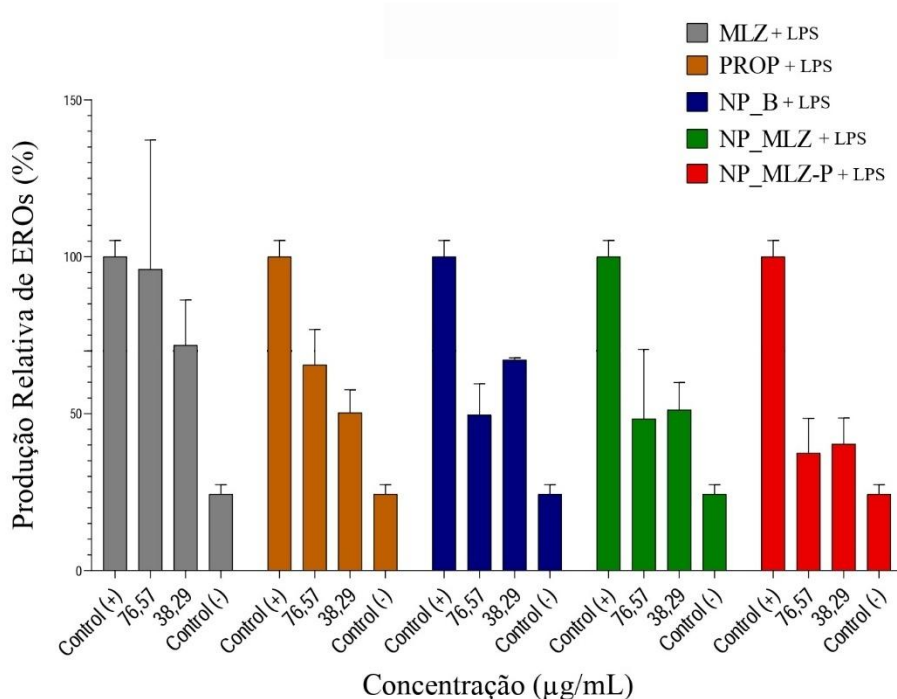
Adicionalmente, a menor permeabilidade observada para o MLZ livre em comparação à NP_MLZ reforça a importância da nanoencapsulação como estratégia para otimizar a liberação do fármaco. Sistemas nanoparticulados baseados em polímeros mucoadesivos, como quitosana e ácido hialurônico, são capazes de aumentar o tempo de residência no epitélio intestinal e favorecer a interação com a mucosa inflamada, promovendo maior concentração local do fármaco e potencializando sua ação terapêutica (Ansari *et al.*, 2022; Parikh *et al.*, 2019).

Portanto, os resultados obtidos indicam que a formulação NP_MLZ apresenta perfil de permeabilidade compatível com sistemas destinados à liberação local no cólon, com capacidade de interação com o epitélio intestinal e modulação do transporte em condições inflamatórias.

5.7.5 Capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares

Durante a ocorrência da ativação de macrófagos na resposta inflamatória há a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando estimulados por LPS, os macrófagos RAW 264.7 ativam o receptor TLR4, desencadeando vias de sinalização que geram a produção de EROs. Apesar de serem essenciais quando se trata da resposta antimicrobiana, quando estão em níveis elevados, os EROs estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias perpetuando os quadros inflamatórios persistentes em pacientes com DII. (Tian *et al.*, 2026). Devido a isso, sua quantificação se tornou um importante marcador para atividades anti-inflamatórias para análise de novos sistemas terapêuticos.

Figura 23 – Efeito do tratamento com fármaco (MLZ), metabólito (PROP) e NPs sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por LPS na concentração de 76,57 µg/mL e 38,29 µg/mL (n=2).



MLZ: mesalazina livre; PROP: propionato livre; NP_B: nanopartícula de quitosana e ácido hialurônico; NP_MLZ: nanopartícula com mesalazina; NP_MLZ-P: nanopartícula com mesalazina e propionato em condições inflamatórias.

De acordo com os dados obtidos na Figura 23, todas as formulações nanoparticuladas reduziram a produção de EROs quando comparados com o controle positivo (somente tratadas com LPS). As nanopartículas sem fármaco e metabólito (NP_B) obtiveram redução moderada e dependente da concentração (67% e 49% nas concentrações de 38,28 µg/mL e 76,57 µg/mL, respectivamente). Tal obtenção sugere

que a própria matriz formada por QS e AH pode não ser completamente inerte e estar exercendo efeito sobre os macrófagos. O comportamento pode estar relacionado a capacidade de interação das NPs com os receptores CD44 (advindo do AH) expresso em macrófagos Raw 264.7, gerando modificações na resposta celular, ou as propriedades intrínsecas da QS em possuir ação anti-inflamatória (Gimondi *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Rios De La Rosa *et al.*, 2017).

Quando incorporada à matriz, as NPs com MLZ (NP_MLZ) resultou em uma diminuição mais acentuada quando comparada a branca (51,2% e 48,3% nas concentrações de 38,28 µg/mL e 76,57 µg/mL, respectivamente), enfatizando a atividade biológica. A MLZ possui capacidade de inibir NF-κB e reduzir expressão de COX-2 e iNOS diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo uma diminuição do perfil inflamatório (Beiranvan *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2026). Já a MLZ livre, e também o PROP livre, por outro lado, teve seus valores mais próximos ao controle positivo. O resultado mostrado pode ter sido obtido devido a elevada disponibilidade intracelular imediata do fármaco que reduziu sua eficiência farmacológica, o que provavelmente foi evitado com a associação no sistema nanoparticulado, pela possível liberação gradual e assim, evitando picos na concentração (Beiranvan *et al.*, 2021).

A NP_MLZ-P, apresentou o maior efeito entre todos os grupos avaliados, chegando a valores próximos ao controle negativo em ambas as concentrações (40,3% e 37,4% nas concentrações de 38,28 µg/mL e 76,57 µg/mL, respectivamente). O PROP, um AGCC gerado pela microbiota intestinal, possui ação imunomoduladora e reduz ativação de NF-κB, produção de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo em macrófagos (He *et al.*, 2023). A superioridade do sistema NP_MLZ-P, sugere que a associação de MLZ e PROP promove uma melhor resposta oxidativa do que cada composto isoladamente e portanto, os dados obtidos são compatíveis com um efeito aditivo ou potencialmente sinérgico, decorrente da atuação complementar advinda por diferentes mecanismos da resposta inflamatória (Yan *et al.*, 2025).

Portanto, a convergência dos mecanismos, junto a um sistema de liberação nanoparticulado explica o desempenho superior e requerido da formulação NP_MLZ-P e demonstra o potencial dos polímeros em possuírem ação redutora dentro da nanopartícula desenvolvida.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de NPs através da técnica da complexação polieletrólítica foram obtidas com sucesso. As NPs com MLZ e PROP (NP_MLZ-P) obtiveram tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta adequados, apresentaram estabilidade física preliminar durante os noventa dias de análise sem o aparecimento de precipitados. Apresentou rearranjos moleculares que demonstraram a adequação das propriedades dos polímeros durante o rearranjo na formação da partícula mostrando amorfização do sistema nanoparticulado. A morfologia se mostrou esférica e condizente com o esperado. O perfil de liberação das NPs apresentou melhora em relação ao fármaco e o metabólito livre através de difusão fickiana. Ademais, o ensaio de eficiência de associação demonstrou a presença de MLZ e PROP no sistema.

Além disso, as NPs apresentaram perfis capacidade de interação com a mucina, principalmente em condições mimetizando o pH colônico, demonstraram biocompatibilidade nas linhagens intestinais Caco-2, HT29-MTX e macrófagos Raw 264.7 com e sem a presença de inflamação, mantendo níveis de viabilidade celular dentro de limites considerados seguros nas condições avaliadas. Nos estudos de permeabilidade em modelo intestinal tridimensional, o sistema NP_MLZ apresentou transporte moderado e comportamento distinto do fármaco livre, com indícios de maior retenção local e interação com a barreira epitelial, especialmente em condições inflamatórias. Além de ter apresentado reduções nos níveis de EROs nos modelos celulares com inflamação induzida por LPS tanto com e sem a presença de MLZ e PROP, também demonstrando o potencial da própria partícula vazia (NP_B) em realizar a diminuição.

Em conjunto, os resultados indicam que a nanoformulação proposta alcançou os objetivos propostos, desenvolvendo e avaliando o sistema nanoparticulado com propriedades adesivas para administração oral e liberação cólon-específica, constituindo uma estratégia promissora para a liberação colônica de MLZ e PROP de forma conjunta, com potencial aplicação no tratamento da DII.

REFERÊNCIAS

- AFSHARZADEH, M.; HASEMI, M.; MOKHTARZADEH, A.; ABNOUS, K.; RAMEZANI, M. Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 46, n. 6, p. 1095-1110, 18 ago. 2018.
- AGGARWAL, S.; HALOI, P.; AGARWAL, K.; SAROJ, P.; SHARMA, N.; KALITA, P. Advances in inflammatory bowel disease (IBD): Immune mechanisms, preclinical models and emerging therapeutic strategies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 122, 108420, 2026.
- AHMAD, K.; ZHANG, Y.; CHEN, P.; YANG, X.; HOU, H. Chitosan interaction with stomach mucin layer to enhances gastric retention and mucoadhesive properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 333, 121926, 1 jun. 2024.
- AIB, S.; IQBAL, K.; KHAN, N.; KHALID, S.; ADNAN, M.; UMAIR, S. M.; DAR, M. J. pH-sensitive liposomes for colonic co-delivery of mesalazine and curcumin for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 72, 103335, 2022.
- ALLGAYER, H. Review article: mechanisms of action of mesalazine in preventing colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Oxford, v. 18, suppl. 2, p. 10–14, set. 2003.
- ALPER ÖZTÜRK, A.; YENILMEZ, E.; ÖZARDA, M. G. Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and surface modification with chitosan. *Polymers*, v. 11, n. 10, 2019.
- AMIDON, S.; BROWN, J. E.; DAVE, V. S. Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches. *AAPS PharmSciTech*, v. 16, n. 4, p. 731–741, 2015.
- ARANAZ, I.; ALCÁNTARA, A. R.; CIVERA, M. C.; ARIAS, C.; ELORZA, B.; HERAS CABALLERO, A.; ACOSTA, N. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, v. 13, n. 19, p. 3256, 1 out. 2021.
- ARKEDANI, Z.M.; LORENZO-LEAL, A.L.; BACH, H. Nanomedicine-mediated drug delivery for potential treatment of inflammatory bowel disease: a narrative review. *Nanomedicine* (London, England), v. 19, p. 163-179, 2024.
- ATHAVAL, R.; SAPRE, N.; RALE, V. TONGAONKAR, S.; MANNA, G.; KULKARNI A.; SHIROLKAR, M. M. Tuning the surface charge properties of chitosan nanoparticles. *Materials Letters*, v. 308, 131114, 2022.
- AZIZ, A.; SHAIKH, H.; ABBAS, A.; ZEHRRA, K. E.; JAVED, B. Microscopic techniques for nanomaterials characterization: A concise review. *Microscopy Research and Technique*, v. 88, n. 5, 2025.
- AZUMA, K.; OSAKI, T.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 6, n. 1, p. 33–49, 2015.

BAGLIOTTI MENEGUIN, A.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140–149, 2014.

BHARDWAJ, H.; JANGDE, R. Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. **Next Nanotechnology**, v. 2, 2023.

BATTEPATI, D. M. D.; WELD, L. D. O.; DUGGAN, R. D. O. Second trial of induction of mesalamine in ulcerative colitis causing acute interstitial nephritis: a case report. **Official Journal of the American College of Gastroenterology**, v. 119, p. 2550-2551, 2024

BEIRANVAN, M. A review of the biological and pharmacological activities of mesalazine or 5 aminosalicylic acid (5 ASA): an anti ulcer and anti oxidant drug. **Inflammopharmacology**, Springer, v. 29, n. 5, p. 1279-1290, 2021

BHATTACHARYA, S. Fabrication and characterization of chitosan-based polymeric nanoparticles of imatinib for colorectal cancer targeting application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 104–115, 2020.

BOGATAJ, M.; VOVK, T.; KEREC, M.; DIMNIK, A.; GRABNAR, I.; MRHAR, A. The Correlation between Zeta Potential and Mucoadhesion Strength on Pig Vesical Mucosa. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 743-746, 2003.

BONI, F. I.; ALMEIDA, A.; LECHANTEUR, A.; SARMENTO, B.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolyte complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73–82, 2018.

BORDENAVE, N.; JANASWAMY, S.; YAO, Y. Influence of glucan structure on the swelling and leaching properties of starch microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 234–243, 2014.

BRINCK, J.E.; SINHA, A.K.; LAURSEN, M.F. et al. Intestinal pH: a major driver of human gut microbiota composition and metabolism. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 22, p. 639–656, 2025.

CAI, Z.; WANG, S.; LI, J. Treatment of inflammatory bowel diseases: a comprehensive review. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 765474, 2021.

CAMPREGHER, C.; GASCHE, C. Aminosalicylates. Best Practice & Research: **Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 4–5, p. 535–546, 2011.

CARDOSO, A. J. R.; CARVALHO, S. G.; MANTOVANELLI, V. R.; DE FREITAS MARINHO, L.; SILVESTRE, A. L. P.; FORSTER-CARNEIRO, T.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Postbiotics: Modulation of the Gut Microbiota and Potential for Association with Nanotechnology. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 18, n. 2, p. 2954-2972, 2026.

CARDOSO, V. M. de O.; BRITO, N. A. P. De; FERREIRA, N. N.; BONI, F. I.; FERREIRA, L. M. B.; CARVALHO, S. G.; GREMIÃO, M. P. D. Design of mucoadhesive gellan gum and chitosan nanoparticles intended for colon-specific delivery of peptide drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 628, 2021. a.

CARDOSO, V. M. de O.; KIRALY, V. T. R.; BONI, F. I.; FERREIRA, N. N.; FERREIRA, L. M. B.; PEREIRA, F. M. V.; BORGES, J. C.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic cross-linking processes: A potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, 2021. b.

CARBINATTO, F. M. et al. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.

CARO-LEÓN, F. J.; SILVA-CAMPA, E.; NAVARRO-LÓPEZ, R. A.; FERNÁNDEZ-QUIROZ, D.; FIGUEROA-LEÓN, V. A.; TRUJILLO-RAMIREZ, M. A.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. M.; AGUILAR, M. R.; ÁLVAREZ-BAJO, O. Production and characterization of nanoparticulate polyelectrolyte complexes of Chitosan-Catechol, ulvan, and hyaluronic acid. **ACS Omega**, v. 10, n. 4, p. 3474–3485, 2025.

CARVALHO, S. G.; HADDAD, F. F.; DOS SANTOS, A. M.; SCARIM, C. B.; FERREIRA, L. M. B.; MENEGUIN, A. B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Chitosan surface modification modulates mucoadhesive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 263, n. 130272, 2024.

CARVALHO, S. G.; DOS SANTOS, A. M.; SILVESTRE, A. L. P.; MENEGUIN, A. B.; FERREIRA, L. M. B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. New insights into physicochemical aspects involved in polyelectrolyte complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 271, n. 118436, 2021.

CHEN, Y.; SONG, H.; WANG, X.; HUANG, R.; LI, S.; GUAN, X. Propionate-functionalized chitosan hydrogel nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 291, 2025.

CHEN, J.; LIU, Z.; YU, T. ZHANG, Y.; LIU, J.; LU, M. Global burden of inflammatory bowel disease in group 20 countries, 1990 to 2021: a systematic analysis with projections to 2050. **Medicine (Baltimore)**, 2026.

CHU, P. Y.; TSAI, S.-C.; KO, H.-Y.; WU, C.-C.; LIN, Y.-H. Co-delivery of natural compounds with dual-targeted nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 27, p. 23880–23892, 2019.

CONFEDERAT, L. G.; TUCHILUS, C. G.; DRAGAN, M.; SHA'AT, M.; DRAGOSTIN, O. M. Preparation and antimicrobial activity of chitosan. **Molecules**, v. 26, n. 12, 2021.

CRISTINA FREIRE, A.; FERTIG, C. C.; PODCZECK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific drug delivery. Part I: The influence of heat

treatment on the physico-chemical properties of high amylose maize starches.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik, v. 72, n. 3, p. 574–586, 2009.

DESAI, N.; RANA, D.; PATEL, M.; BAJWA, N.; PRASAD, R.; VIRA, L. Nanoparticle therapeutic in clinical perspective: Classification, marketed products, and regulatory landscape. **Wiley Online Library**, v. 21, n. 29, 2502315, 02 de jun. 2025.

DERWA, Y.; GRACIE, D. J.; HAMLIN, P. J.; FORD, A. C. Efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 2017.

DILKUSH, K.; KARTHIKEYAN, A.; BALU, A.; SUBRAMANIAN, G. Comprehensive review on characterization of mucoadhesive drug delivery system. **Open Access Research Journal of Biology and Pharmacy**, v. 16, n. 1, p. 41-52, 2026.

DIMANTOV, A.; GREENBERG, M.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. High amylose starch as enteric coating. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93–100, 2004.

DOS SANTOS, A. M.; LISZBINSKI, R. B.; CARVALHO, S. G.; JUNIOR, A. G. T.; CHORILLI, M.; DE JESUS, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 287, 138342, 2025.

DOS SANTOS, A. M.; MENEGUIN, A. B.; AKHTER, D. T.; FLETCHER, N.; HOUSTON, Z. H.; BELL, C.; THURECHT, K. J.; GREMIÃO, M. P. D. Colon-specific microparticles based on retrograded starch. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 158, p. 371–378, 2021b.

DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; FERREIRA, L. M. B.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Understanding the role of electrostatic interactions on the association of 5-fluorouracil to chitosan-TPP nanoparticles. **Colloids and Surfaces A**, v. 640, 2022.

DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems. **Journal of Controlled Release**, v. 334, p. 353–366, 2021a.

DRUGBANK. **Mesalazine (5-aminosalicylic acid)**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET00402>. Acesso em: 20 abr. 2026.

DYAWANAPELLY, S. Improved mucoadhesion of chitosan nanoparticles. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 4, p. 365–379, 2016.

EKER, F.; DUMAN, H.; AKDASCI, E.; BOLAT, E.; SARITAS, S.; KARAV, S.; WITKOWSKA, A. M. A comprehensive review of nanoparticles: From classification to application and toxicity. **Molecules**, vol. 29, n. 15, 3482, 2024.

FALLAHI, F.; BORRAN, S.; ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; POURHANIFEH, M. H.; KHAKSARY MAHABADY, M.; SAHEBKAR, A.; MIRZAEI, H. Curcumin and inflammatory bowel diseases: From in vitro studies to clinical trials. **Molecular Immunology**, v. 130, p. 20-30, 2021.

FARKAS, N.; KRAMAR, J. A. Dynamic light scattering distributions by any means. **Journal Nanoparticles Res.**, v. 23, 120, 2021.

FATIMA, I.; KHAN, A.; RAHDAR, A.; FATHI-KARKAN, S.; KHARABA, Z.; BAINO, F. Optimized mesalamine-loaded polyelectrolyte complex nanoparticles for targeted colon delivery in inflammatory bowel disease treatment: A central composite design approach. **Next Materials**, v. 8, 100530, 2025.

FERREIRA, L. M. B.; DOS SANTOS, A. M.; BONI, F. I.; DOS SANTOS, K. C.; ROBUSTI, L. M. G.; DE SOUZA, M. P. C.; FERREIRA, N. N.; CARVALHO, S. G.; CARDOSO, V. M. O.; CHORILLI, M.; CURY, B. S. F.; DE GODOI, D. R. M.; GREMIÃO, M. P. D. Design of chitosan-based particle systems: A review of the physicochemical foundations for tailored properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, 2020.

FERREIRA, B.; MARTINS, C.; NUNES, R. Establishment of a 3D multi-layered in vitro model of inflammatory bowel disease. **Journal of controlled release**, v. 377, p. 675-688, 2025.

FERREIRA, L. M. B.; ZUCOLOTTI, V. Chitosan-based nanomedicines: A review of the main challenges for translating the science of polyelectrolyte complexation into innovative pharmaceutical products. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 7, 100441, 2024.

GAIKWAD, D.; SUTAR, R.; PATIL, D. Polysaccharide mediated nanodrug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, 129547, 2024.

GAJENDRAN, M.; LOGANATHAN, P.; JIMENEZ, G.; CATINELLA, A. P.; NG, N.; UMAPATHY, C.; ZIADE, N.; HASHASH, J. G. Ulcerative colitis: a comprehensive review. **Disease-a-Month**, 2019.

GAO, J.; LI, J.; LUO, Z.; WANG, H.; MA, Z. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Inflammatory Bowel Disease Treatment. **Drug design, development and therapy**, v. 18, p. 2921–2949, 2024.

GAO, M.; ZHANG, W.; MA, Y. LIU, T.; WANG, S.; CHEN, S.; WANG, Z.; SHEN, H. Bioactive Polysaccharides Prevent Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Inflammation via Immunomodulation, Antioxidant Activity, and Microbiota Regulation, **Foods**, v. 15, 2025.

GEDIB – Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil. **Atualização em doenças inflamatórias intestinais**: Conectando ciência à prática diária. Fortaleza, Ceará, 2019.

GIMONDI, S.; REIS, R. L.; FERREIRA, H.; NEVES, N. M. Microfluidic-driven mixing of high molecular weight polymeric complexes for precise nanoparticle downsizing. *Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology and Medicine***, v. 43, art. 102560, 2022.

GROVER, L. M.; SMITH, A. M. Hydrocolloids and Medicinal Chemistry Applications. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications. **Modern Biopolymer Science***, p. 365–384, 2013.

GUPTA, R. C.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A.; SINHA, A. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. ***Frontiers in Veterinary Science***, v. 6, p. 192, 2019.

HACRS, L.; WINDSOR, J. W.; GOROSPE, J.; CUMMINGS, M.; COWARD, S.; BUIE, M. J.; QUAN, J.; GODDARD, Q.; CAPLAN, L.; MARKOVINOVIĆ, A.; WILLIAMSON, T.; ABBEY, Y.; ABDULLAH, M.; ABREU, M. T.; AHUJA, V.; RAJA, A.; ALTUWAIJRI, M.; BALDERRAMO, D.; BANERJEE, R. Global evolution of inflammatory bowel disease across epidemiologic stages. ***Nature***, v. 642, p. 1-9, 2025.

HAN, T.; ZHANG, Y.; ZHENG, G.; GUO, Y. From pathogenic mechanisms to therapeutic perspectives: a review of gut microbiota and intestinal mucosal immunity in inflammatory bowel disease. ***Frontiers in immunology***, v. 16, 2025.

HE, R.; LIU, B.; GENG, B.; LI, N.; GENG, Q. The role of HDAC3 and its inhibitors in regulation of oxidative stress and chronic diseases. ***Cell Death Discovery***, London, v. 9, art. 131, 2023.

HTOON, A.; SHRESTHA, A. K.; FLANAGAN, B. M.; LOPEZ-RUBIO, A.; BIRD, A. R.; GILBERT, E. P.; GIDLEY, M. J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. ***Carbohydrate Polymers***, v. 75, p. 236–245, 2009.

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: Nanotechnology, Biology and Medicine***, v. 11, n. 5, p. 1117-1132, 2015.

JAGDALE, S.; AGARWAL, B.; DIXIT, A.; GAWARE, S. Chitosan as excellent bio-macromolecule with myriad of anti-activities in biomedical applications – A review. ***International Journal of Biological Macromolecules***, v. 257, 128697, 2024.

JAUREGUI-AMEZAGA, A.; SMET, A. The microbiome in inflammatory bowel disease. ***Journal Clin. Med.***, v. 13, n. 16, p. 4622, 2024.

KHAN, A.U.; ALI, M.; WAHAB, M.A. Comparative efficacy of pharmacologic interventions in ulcerative colitis: a network meta analysis. ***Inflammopharmacol***, v. 33, p. 2679–2687, 2025.

KAPLAN, G. G. The global burden of IBD. ***Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology***, v. 12, n. 12, p. 720–727, 2015.

KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food chemistry**, v. 71, p. 9-36, 2000.

KE, C. L.; DENG, F-S.; CHUANG, C-Y.; CHING-HSUAN, L. Antimicrobial actions and applications of chitosan. **Polymers**, 2021.

KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, 2007.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. III. Drug release from glassy poly (HEMA-co-NVP) copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 1, n. 2, p. 89–98, 1984.

KOWKABANY, G.; BAO, Y. Nanoparticle tracking analysis: an effective tool to characterize extracellular vesicles. **Molecules**, v. 29, 4672, 2024.

KONCINA, E.; HAAN, S.; RAUH, S.; LETELLIER, E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. **Cancers**, v. 12, 2020.

LAPKA, M. Dosage forms of oral mesalazine and their clinical use. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 77, n. 4, 2023.

LEWIS, A.L.; CHEN, X.; SCHANAAR, R.L. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology. 4th edition**, 2022.

LI, N.; WANG, M.; LYU, Z.; SHAN, K.; CHEN, Z.; CHEN, B.; CHEN, Y.; HU, X.; DOU, B.; ZHANG, J.; WANG, L.; ZHAO, T.; LI, H. Medicinal plant-based drug delivery system for inflammatory bowel disease: advances and perspectives. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1158945, 2023.

LI, Y.; WANG, Y.; WEI, X.; YANG, L.; LIU, S.; WANG, Y.; XU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, C.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; JIN, F.; YIN, X. Improvement in phenotype homeostasis of macrophages by chitosan nanoparticles and subsequent impacts on liver injury and tumor treatment. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 277, art. 118891, 2022.

LI, C. Unraveling the complexities of starch retrogradation insights from kinetics, molecular interactions, and influences of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 3159-3182, 2024.

LIANG, Y.; LI, Y.; LEE, C.; YU, Z.; CHEN, C.; LIANG, C. Ulcerative colitis: molecular insights and intervention therapy. **Molecular Biomedicine, Londres**, v. 5, n. 42, 2024.

LIANG, C.; XU, H.; YOU, H.; ZHANG, O.; HAN, Y.; LI, Q.; HU, Y.; XIANG, X. Physicochemical properties and molecular mechanisms of different resistant starch subtypes in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.

LIU, X.; CHAO, C.; YU, J.; COPELAND, L.; WANG, S. Mechanistic studies of starch retrogradation and its effects on starch gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 106914, 2021.

LIU, Y.; XU, J.; GUO, Y. Natural polysaccharide-based nano-drug delivery systems: Innovative strategies and research advances in cancer therapy – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 321, 146081, 2025.

LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 27, n. 4, 2022.

MA, F. K.; LI, J.; KONG, M.; LIU, Y.; AN, Y.; CHEN, X.G. Preparation and hydrolytic erosion of differently structured PLGA nanoparticles with chitosan modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 174–179, 2013.

MANN, E. R.; LAM, Y. K. L.; UHLIG, H. H. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 24, p. 577-595, 2024.

MAUDUIT, A.; MAS, E.; SOLÀ-TAPIAS, N. Main genetic factors associated with inflammatory bowel diseases and their consequences on intestinal permeability: involvement in gut inflammation. **J Gastroenterol**, v. 60, 1323–1338, 2025.

MCGOVERN, D.; KUGATHASAN, S.; CHO, J. H. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v. 7, p. 1163–1176, 2016.

MENEGUIN, A. B.; BEYSSAC, E.; GARRAIT, G.; HSEIN, H.; CURY, B. S. F. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics**, v. 123, p. 84-94, 2016.

MISRA, S.; HELDIN, P.; HASCALL, V. C.; KARAMANOS N. K.; SKANDALIS, S. S.; MARKWALD, R. R.; GHATAK, S. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. **FEBS Journal**, 2011.

MOHAMMED, M.; DEVNARAIN, N.; ELHASSAN, E.; GOVENDER, T. Exploring the applications of hyaluronic acid-based nanoparticles for diagnosis and treatment of bacterial infections. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 1–15, 2022.

MONTELEONE G.; CALISI C.; SALVATORI S.; MARAFINI I. Fundamental and emerging insights into innate and adaptive immunity in inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology Inflammation*, v. 16, 2025.

MURRAY, A.; NGUYEN, T. M.; PARKER, C. E.; FEAGAN, B. G.; MACDONALD, J. K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2020.

NAEEM, M.; AWAN, U. A.; SUBHAN F.; CAO J.; HLAING, S. P.; LEE J.; IM, E.; JUNG Y.; YOO, J-W. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, p. 153–169, 2020.

ONOUÉ, S.; YAMADA, K.; SATO, H. Advanced oral drug delivery systems: current challenges and emerging technologies. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 16, p. 2029-2042, 2026.

PAN, N. C. VIGNOLI, J. A.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 198–207, 2013.

PATEL, M.; NAGARKAR, R.; MOHAMMED, I. A. Colon target delivery system: recent approaches. *International Journal of Bioassays*, v. 10, p. 5763-5777, 2020.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PEREIRA, A. A. R.; APARECIDA, J. V. M.; RAMALHO, M. E.; FERREIRA, L. M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Tailoring mesalazine nanosuspension using chitosan polyelectrolyte complexes with alginate and alginate/hydroxypropyl-methylcellulose phthalate. **Pharmaceutics**, v. 16, 1489, 2024.

POLITI, F. A. S.; CARVALHO, S. G.; RODERO, C. F.; DOS SANTOS, K. P.; MENEGUIN, A. B.; SORRECHIA, R.; CHIAVACCI, L. A.; CHORILLI, M. Piperine-loaded nanoparticles incorporated into hyaluronic acid/sodium alginate-based membranes for the treatment of inflammatory skin diseases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 736–748, 2023.

PUBCHEM. **5-Aminosalicylic acid**. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Aminosalicylic-Acid>. Acesso em: 20 abr. 2026.

QIN, M.; JIANG, F.; HONG, Y.; LI, L.; CUI, Y.; JIN, C.; GU, Z.; CHENG, L.; LI, Z.; LI, C.; BAN, X. Starch as a designable platform for oral drug delivery: From structural modulation to application in inflammatory bowel disease. **Carbohydrate polymers**, v. 380, 125019, 2026.

RAINE, T.; BONOVAS S.; BURISCH J.; KUCHARZIK T. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment, *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 16, n. 1, p. 2-17, Jan. 2022.

RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of inflammatory bowel diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 155–165, 2019.

RANSFORD, R. A.; LANGMAN, M. J. S. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. **Gut**, v. 51, n. 4, p. 536–539, 2002.

RIOS DE LA ROSA, J. M.; TIRELLA, A.; GENNARI, A.; STRATFORD, I. J.; TIRELLI, N. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages, **Adv. Healthcare Mater**, v. 6, 1601012, 2017.

RODRIGUEZ-LOYA, J.; LERMA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Dynamic light scattering and its application to control nanoparticle aggregation in colloidal systems: a review. **Micromachines**, v. 15, p. 24, 2024.

ROGLER, G. Effiziente Therapie des leichten Morbus Crohn und der leichten Colitis ulcerosa. **Innere Medizin**, v. 66, p. 15–21, 2025.

ROBUSTI, L.M.G; BONI, F.I.; FERREIRA, L.M.B.; FERREIRA, N. N.; TEIXEIRA, D.A.; GREMIÃO, M.P.D. Computational modeling to guide the design of mesalazine nanoparticles tailored for the incorporation of chitosan. **Polymers**, v. 17, 3053, 18 nov. 2025.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant starch: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science**, v. 5, p. 1–17, 2006.

SALIH, A.R.C.; FAROOQI, H.M.U.; NAGENDRAN, S. Hyaluronic acid: comprehensive review of a multifunctional biopolymer. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, 63, 2024.

SANTOS, M.P.C; GOMES, C.; TORRES J. Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. **Ann Gastroenterol**. p. 14-23, 2018.

SANTOS, Y.; JARAMILLO, A. P. Effectiveness of mesalamine in patients with ulcerative colitis: a systematic review. **Cureus**, v. 15, 2023.

SAREEN, R.; JAIN, N.; RAJKUMARI, A.; DHAR, K. L. pH triggered delivery of curcumin from Eudragit-coated chitosan microspheres for inflammatory bowel disease: characterization and pharmacodynamic evaluation. **Drug Delivery**, v. 23, p. 55–62, 2016.

SHAO, H.; LIU, M.; JIANG, H.; ZHANG, Y. Polysaccharide-based drug delivery targeted approach for colon cancer treatment: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 302, 139177, 2025.

SHEN, Y.; TANTAI, J. Co-Delivery Anticancer Drug Nanoparticles for Synergistic Therapy Against Lung Cancer Cells. **Drug Design, Development and Therapy**, 2020.

SINGH, S.; MURAD, M.H.; YUAN, Y. Comparative Efficacy of Advanced Therapies for Management of Moderate-to-Severe Crohn's Disease: 2025 AGA Evidence Synthesis. **Gastroenterology**, v. 169, p. 1516-1536, 2025.

SISODIYA, R.; GANJU, E. Development and characterization of mesalamine nanoparticles for effective targeting of ulcerative colites – Review. **International Journal of Pharmaceutical Research and Application**, v. 9, p. 2012-2018, 2024.

SILVESTRE, A.L.P.; VIEGAS, J.; CARVALHO, A.M.; et al. Surface charge behavior of mezalazine-loaded chitosan–alginate nanoparticles in a 3d multi-layered intestinal in vitro model. **Carbohydrate Polymers**, 124821, 2025.

SOSNIK, A.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030–2075, 2014

SPÓSITO, L.; MORAIS-SILVA, G.; FONSECA, D.; NEVES, M. M.; SILVA, M. V. Nano-in-microparticles approach: Targeted gastric ulcer therapy using trans-resveratrol nanoparticles encapsulated in hyaluronic acid and alginate microparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 305, 141010, 2025.

SUBRAMANIAN, V.; LOGAN, R. F. Chemoprevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 4–5, p. 593 606, ago. 2011.

SUARATO, G.; LI, W.; MENG, Y. Role of pH-responsiveness in the design of chitosan-based cancer nanotherapeutics: A review. **Biointerphases**, v. 11, 2016.

SUN, M.; SU, X.; DING, B.; HE, X.; LIU, X.; YU, A.; LOU, H.; ZHAI, G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**, v. 7, n. 7, p. 1085-1100, 2012.

SUTARIA, R.; MOK, Z. H. Nanoparticle-enhanced mesalazine therapy for inflammatory bowel disease. **Pharmaceutical Science Advances**. v. 16, 2023.

TEDEIIND, S.; WESTBERG, F.; KJERRULF, M.; VIDAL, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology, Beijing**, v. 13, n. 20, p. 2826–2832, 2007.

THULUVATH, P. J.; NINKOVIC, M.; CALAM, J.; ANDERSON, M. Mesalazine-induced nephritis. **Gut**, v. 35, p. 1493–1496, 1994.

TIAN, Y.; HUANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, C.; ZHOU, Z.; YANG, H.; QIU, Y. Inflammatory bowel disease and metabolic reprogramming: From pathological mechanisms to targeted interventions. **Interdisciplinary Medicine**, v. 6, 2026.

TSILINGIRI, K.; RESCIGNO, M. Postbiotics. **Beneficial Microbes**, 2013.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology: Guidance for Industry. Silver Spring: **FDA**, 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (**FDA**). Asacol HD (mesalamine) delayed-release tablets, for oral use: full prescribing information. Silver Spring, 2021. 15 p. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugsatfda>.

VENTURA, I.; CHOMON-GARCÍA, M.; TOMÁS-AGUIRRE, F.; PALAU-FERRÉ, A.; LEGIDOS-GARCÍA, M. E.; MURILLO-LLORENTE, M. T.; PÉREZ-BERMEJO, M. Therapeutic and immunologic effects of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, 2024.

VIEUJEAN, S.; JAIRATH, V.; PEYRIN-BIROULET, L.; DUBINSKY, M.; IACUCCI, M.; MAGRO, F.; DANESE, S. Understanding the therapeutic toolkit for inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 22, p. 371–394, 2025.

VILLALOBOS, M.C.; NICOLAS, M. Antihyperglycemic and cholesterol-lowering potential of dietary fibre from lemongrass. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 14, p. 1-15, 2021.

WANG, S.; LI, C.; COPELAND, L.; NIU, Q.; WANG, S. Starch retrogradation: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 568–585, 2015.

WANG, S.; ZHOU, P.; LI, Z. A Case Report and Literature Review of Mesalazine-Induced Kidney Injury in a Pediatric Patient With Ulcerative Colitis. **Frontiers in pediatrics**, 2022.

WANG, F.; HARKER, A.; EDIRISINGHE, M.; PARHIZKAR, M. Micro- and Nanomanufacturing for Biomedical Applications and Nanomedicine: A perspective. **Small Science**, v. 3, n. 11, 2300039, 2023.

YAN, J.; YU, T.; ZHAO, X.; LIU, Z.; SUN, H.; ZHANG, X.; LIU, Y.; WANG, W.; MENG, L.; SHE, J.; JING, X. Engineered resveratrol nanoantioxidants: intestinal targeted oral delivery system of mesalazine for inflammatory bowel disease via spatiotemporal-ecological regulation. **Advanced Composites and Hybrid Materials, Cham**, v. 8, art. 458, 2025.

YANAT, M.; SCHROËN, K. Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. **Reactive and Functional Polymers**, v. 161, 2021.

YAO, T.; DONG, X.; LV, J.; FU, L.; LI, L. Propionate alleviated colitis by modulating iron homeostasis to inhibit ferroptosis and macrophage polarization. **International Immunopharmacology**, v. 162, 115151, 2025.

YEUNG, C.; MCCOUBREY, L. E.; BASIT, A. W. Advances in colon-targeted drug technologies. **Current opinion in gastroenterology**, v. 41, p. 9-15, 2025.

ZHANG, C.; CHEN, Z.; HE, Y.; XIAN, J.; LUO, R.; ZHENG, C.; ZHANG, J. Oral colon-targeting core-shell microparticles loading curcumin for enhanced ulcerative colitis alleviating efficacy. **Chinese Medicine**, v. 16, 2021.

ZHANG, L. Chitosan-modified nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2912–2920, 2006.

ZHAO, L.; LIU, X.; WANG, F.; NIU, M.; MA, Z.; WANG, Z.; DU, Y.; GONG, S.; LI, Y.; SONG, Q.; ZHANG, Y.; WANG, L. Probiotic-drug co-delivery system enhances sulfasalazine activation for inflammatory bowel disease therapy. **Materials Today Bio**, v. 36, 102669, 2026.

ZHENG, B.; WANG, L.; Yi, Y.; YIN, J.; Liang, A. Design strategies, advances and future perspectives of colon-targeted delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, 2024.

ŻÓŁKIEWICZ, J.; MARZEC A.; RUSZCZYNSKI M.; FELESZKO W. Postbiotics. **Nutrients**, 2020.

APÊNDICE A: OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO

1. MATERIAL

1.1 Principais matérias primas e reagentes

Ácido hialurônico da Pure Kemika®; Fosfato de potássio monobásico da Synth®; Alta amilose Hylon VII da National Starch & Chemical; Hidróxido de sódio da Vetec; Mesalazina, propionato de sódio e quitosana baixo peso molecular (Mw=50.000-190.000 Da, grau de desacetilação de 75-85%) da Sigma Aldrich®.

1.2 Equipamentos

Analizador de partículas (Malvern®, modelo Zetasizer Nano-ZS); Analizador Termogravimétrico (PerkinElmer®, modelo TGA 400); Autoclave vertical analógica (Primatec®, modelo CS-50); Balança analítica (Marte®, modelo AUW220D); Gotejador (SyringeID®, Baintree Scientific Inc. BS-300); Agitador magnético (Quimis, modelo 751, sem aquecimento).

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.1. Variação da concentração de polímeros

Inicialmente diferentes concentrações da blenda polimérica (AH:AR) em uma proporção 3:1 foram testadas e os seguintes resultados apresentados na Tabela 6 foram obtidos:

Tabela 6 – Efeito das variações estequiométricas na proporção da blenda polimérica sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Amostra	Blenda polimérica AH: AR (mg/mL)	Quitosana (mg/mL)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI	PZ (mV)
NP1_AR	0,10	0,50	374 ± 6	0,28	24 ± 1
NP2_AR	0,15	0,50	368 ± 16	0,27	26 ± 5
NP3_AR (Selecionada)	0,20	0,50	253 ± 13	0,26	20 ± 5

A formulação NP3_AR foi selecionada devido a obtenção de NPs com rearranjos conformacionais óticos, gerando diâmetros menores, populações monodispersas, sem a ocorrência de agregação e segregação de fases e denominada NP_B_AR.

Para a elaboração das NPs com a ausência de AR, o delineamento ocorreu na proporção de AH e os resultados obtidos foram exibidos na Tabela 7:

Tabela 7 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de ácido hialurônico sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Amostra	Ác. Hialurônico (mg/mL)	Quitosana (mg/mL)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI	PZ (mV)
NP1 (Selecionada)	0,10	0,50	229 ± 2	0,19	24 ± 1
NP2	0,15	0,50	164 ± 100	0,55	9 ± 4
NP3	0,20	0,50	89 ± 25	0,89	11 ± 3

Com a presença de AH não foi possível utilizar de soluções mais concentradas, tendo aparecido agregados e populações polidispersas nas formulações NP2 e NP3 e a NP1 ganhou a nomeação de NP_B.

2.2. Concentrações de princípios ativos

Baseado na pré-seleção do delineamento anterior das NPs com e sem AR, os princípios ativos foram adicionados a partícula e a variação de concentração testada e exibidas nas Tabela 8 e 9:

Tabela 8 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de mesalazina sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Amostra	Mesalazina (mg/mL)	Propionato (mg/mL)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI	PZ (mV)
NP_AR1	0,10	0,10	221 ± 12	0,18	15 ± 3
NP_AR2 (Selecionada)	0,20	0,10	182 ± 10	0,15	14 ± 2

Pensando na obtenção de uma incorporação teórica maior a formulação contendo AR com maior proporção de MLZ foi selecionada (NP_AR2) e chamada de NP_MLZ-P_AR. Além disso, obteve menor tamanho, população monodispersa e

pouca diferença de PZ apesar de teoricamente estar comportando quase o dobro de fármaco.

Tabela 9 – Efeito das variações estequiométricas na proporção de propionato sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Amostra	Mesalazina (mg/mL)	Propionato (mg/mL)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PDI	PZ (mV)
NP_1	0,20	0,10	230 ± 4	0,22	28 ± 2
NP_2 (Selecionada)	0,20	0,20	233 ± 9	0,22	29 ± 2
NP_3	0,20	0,30	280 ± 13	0,23	27 ± 2

Para o delineamento posterior da partícula sem AR, houve a tentativa de aumentar também a quantidade de PROP para a obtenção de uma partícula com uma maior quantidade de princípio ativo associado. As partículas com 0,2 mg/mL (NP_2) não obtiveram um aumento significativo no tamanho, PDI e PZ, enquanto a NP_3 com 0,3 mg/mL apresentou um aumento de diâmetro hidrodinâmico e a presença de agregados visualmente quando deixado em armazenamento por alguns dias. A formulação selecionada ganhou o nome de NP-MLZ-P

2.3. Mudança de metodologia

Para determinação da metodologia final no delineamento das NPs finais com AR foram testadas duas técnicas de complexação polieletrólíticas diferentes. A pré-complexação, exibida na Tabela 5B como NP_AR_PC, e a complexação direta, identificada como NP_AR_C.

Na pré-complexação, o fármaco (MLZ) é gotejado previamente, tendo o primeiro contato com a QS e o PROP em agitação e apenas posteriormente os polímeros restantes são gotejados, enquanto na complexação direta, a MLZ é adicionada juntamente aos polímeros aniônicos e todos são gotejados juntos na solução de QS e PROP.

Tabela 10 – Efeito da variação da técnica de complexação eletrólítica em pré-complexação (PC) e complexação direta (C) sobre as propriedades coloidais (diâmetro hidrodinâmico, PDI

e potencial zeta) de sistemas nanométricos analisados via espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Pdl	PZ (mV)
NP_AR_PC (Selecionada)	184 ± 5	0,14	16 ± 2
NP_AR_C	186 ± 15	0,08	11 ± 3

As técnicas no delineamento por DLS não apresentaram grandes diferenças, mas a pré-complexação representada como NP_AR_PC apresentou valores de PZ mais elevados, demonstrando uma estabilidade melhor, além de se destacar em ensaios posteriores, sendo, portanto, a técnica final selecionada. Para as NPs sem AR, a técnica de pré-complexação foi selecionada desde o início.

APÊNDICE B: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE MESALAZINA E PROPIONATO

O método de validação analítica foi realizado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com amostrador automático e detector DAD-UV operando à 216 nm. A separação cromatográfica foi conduzida em modo isocrático, utilizando uma coluna Luna 5 μ C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m) como fase estacionária e fase móvel composta por água ultrapurificada contendo 0,1% de ácido fosfórico (Eluente A) e acetonitrila (Eluente B) na proporção de 90:10 (v/v). O fluxo foi mantido constante em 1,0 mL min⁻¹, sob temperatura controlada de 25 °C, com tempo de corrida de 15 minutos. Os resultados foram interpretados segundo os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), da Farmacopeia Americana (USP, 2020) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH Q2(R1)), sendo analisados parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez e conformidade do sistema.

1. MATERIAL

1.1. Principais matérias primas e reagentes

Acetonitrila adquirida da Merck®; Ácido fosfórico da Synth®; Mesalazina e propionato comprados da Sigma Aldrich®.

1.2. Equipamentos

Balança analítica (Marte®, modelo AUW220D); Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Agilent Technologies®, modelo 1220 Infinity LC); Agitador magnético (Quimis, modelo 751, sem aquecimento)

2. METODOLOGIA

2.1 Conformidade do sistema

A conformidade do sistema foi avaliada previamente a fim de assegurar o desempenho do sistema cromatográfico sob as condições propostas. Para isso foi realizada seis injeções da solução de MLZ e PROP nas concentrações de 50 μ g mL⁻¹ e 1000 μ g mL⁻¹, respectivamente. Os parâmetros avaliados incluíram tempo de retenção e área de pico do analito, bem como a adequabilidade do sistema estimada por meio do número de pratos teóricos (N), fator de assimetria (10%) e fator de cauda (T).

2.2 Seletividade

A seletividade foi feita utilizando uma suspensão de nanopartículas vazias (NP_B), apenas com a presença dos componentes da matriz polimérica com a ausência do fármaco e do metabólito. As nanopartículas foram rompida utilizando da fase móvel como diluente, seguidas de agitação em vórtex por cinco minutos, seguida de centrifugação a 15.000 rpm. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), nas mesmas condições cromatográficas estabelecidas para o método. A seletividade foi confirmada pela comparação dos cromatogramas da fase móvel, das nanopartículas vazias e da solução padrão de mesalazina, verificando-se a ausência de picos interferentes no tempo de retenção correspondente ao analito.

2.3 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada por meio da média obtida a partir da construção de três curvas analíticas independentes, relacionando a área com a concentração dos analitos (MLZ e PROP). As curvas foram obtidas a partir de diluições preparadas nas concentrações de 100, 200, 350, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PROP e de 2,5; 5,0; 10; 17,5; 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MLZ, a partir de uma solução mãe preparada na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MLZ e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PROP. A curva foi realizada em triplicata.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo determinado o coeficiente de correlação (r), a fim de verificar a adequação do modelo linear, e avaliados considerando adequada a linearidade nos casos em que o r fosse igual ou superior a 0,99.

2.4 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado.

A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A determinação da repetibilidade foi realizada com as mesmas condições experimentais, mesmo analista e mesmo equipamento em um único dia utilizando três concentrações: baixa (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MLZ e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PROP), média (37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MLZ e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PROP) e alta (75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MLZ e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PROP), com três réplicas em cada nível. Já a determinação da

precisão intermediária foi realizada no mesmo laboratório sob a mesma condição, porém em dias diferentes por analistas distintos. A proximidade entre os resultados obtidos foi verificada, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme a Equação 5:

$$\text{Precisão} = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão foi obtida a partir de três concentrações: baixa (5 µg. mL⁻¹ de MLZ e 100 µg. mL⁻¹ de PROP), média (37,5 µg. mL⁻¹ de MLZ e 750 µg. mL⁻¹ de PROP) e alta (75 µg. mL⁻¹ de MLZ e 1500 µg. mL⁻¹ de PROP), em triplicata. O grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos foi avaliado por meio do cálculo de recuperação (Equação 2):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada com o intuito de verificar sua capacidade de permanecer inalterado pela introdução de pequenas variações nos parâmetros analíticos, refletindo a sua estabilidade operacional em condições levemente alteradas. Para tanto, foram analisadas amostras contendo MLZ e PROP na concentração 37,5 µg. mL⁻¹ e 750 µg. mL⁻¹, respectivamente, sob diferentes condições experimentais, sendo elas: comprimento de onda de detecção (variação de ±1 nm), fluxo do eluente (variação de ± 0,1 mL min⁻¹) e temperatura (variação de ±1 °C). Todas análises foram realizadas em triplicata.

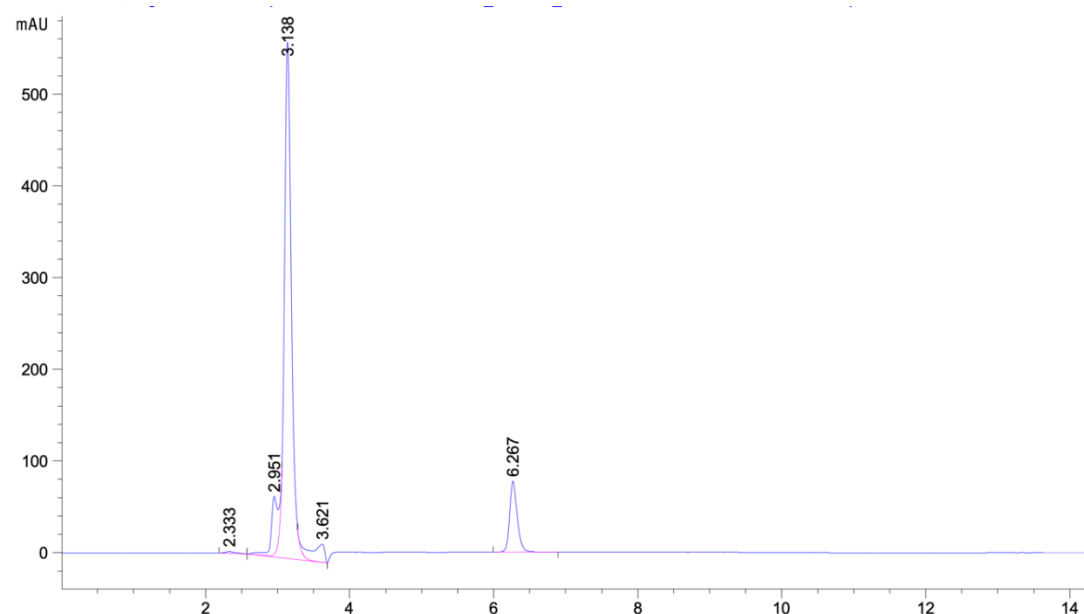
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a quantificação da MLZ e do PROP o método analítico foi validado e utilizado para quantificar o fármaco e do pós-biótico nas NPs. A adequação do método foi avaliada conforme orientado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

3.1. Conformidade do sistema

A avaliação da conformidade cromatográfica constitui uma etapa essencial na validação de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), assegurando que o sistema utilizado esteja apto a fornecer resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis. A conformidade é verificada por meio de parâmetros específicos que caracterizam o desempenho do sistema cromatográfico, como tempo de retenção, área, altura do pico, fator de assimetria, fator de cauda e número de pratos teóricos (ANVISA, 2003; ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2020). Tais parâmetros são fundamentais para garantir que a separação, detecção e quantificação dos analitos ocorram de forma eficiente e consistente. O cromatograma obtido a partir da injeção simultânea de MLZ e propionato estão evidenciados na Figura 24.

Figura 24 – Cromatograma da mesalazina (tempo de retenção: 3,138) e do propionato (tempo de retenção: 6,219) nas concentrações de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, obtido por UV-DAD em 216 nm.



De acordo com as diretrizes estabelecidas pela RE nº 899/2003 da ANVISA, pela RDC nº 166/2017 e pelo guia internacional ICH Q2(R1), a conformidade deve ser avaliada previamente à aplicação analítica do método, assegurando que o sistema cromatográfico esteja em condições ideais de operação. Com base nessas diretrizes, os parâmetros cromatográficos da MLZ foram avaliados e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, área do pico, altura do pico, assimetria, fator cauda e número de pratos teóricos) da MLZ e propionato obtidos na avaliação da conformidade do sistema de CLAE para a validação do método.

Parâmetros	MLZ $\pm$ DP	Propionato $\pm$ DP	Critério de aceitabilidade
Tempo de retenção (min)	3,86 $\pm$ 0,04	6,69 $\pm$ 0,02	-
Área	4846,25 $\pm$ 117,75	675,50 $\pm$ 106,69	-
Altura	511,19 $\pm$ 24,53	109,81 $\pm$ 3,41	-
Fator de assimetria (AS)	1,06 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,20	AS $\leq$ 2
Fator de cauda (FC)	0,79 $\pm$ 0,01	1,66 $\pm$ 0,24	FC $\leq$ 2
Número de pratos teóricos (N)	4637,83 $\pm$ 390,67	41017,66 $\pm$ 2682,73	N > 2000

O tempo de retenção (t_R) médio da MLZ foi de 3,86 $\pm$ 0,04 minutos, enquanto a média obtida pelo PROP apresentou um tempo de 6,69 $\pm$ 0,02, mostrando que ambos os picos podem ser identificados sem interferências.

Em relação ao fator de assimetria, o valor médio obtido foi de 1,06 $\pm$ 0,07 para a MLZ e 1,43 $\pm$ 0,20 para o PROP, ambos valores se mantiveram dentro do permitido pela ANVISA (AS $\leq$ 2). A simetria dos picos cromatográficos é uma característica importante para a exatidão da quantificação, pois picos assimétricos podem comprometer a reprodutibilidade e a linearidade dos resultados.

O fator de cauda foi de 0,79 $\pm$ 0,01 (MLZ) e 1,66 $\pm$ 0,24 (PROP), valores que confirmam a adequação da interação entre o analito e a fase estacionária, sendo inferior ao limite máximo de 2,0 proposto pela farmacopeia brasileira (ANVISA, 2017). Tal resultado reforça a qualidade da separação e o bom desempenho do método cromatográfico.

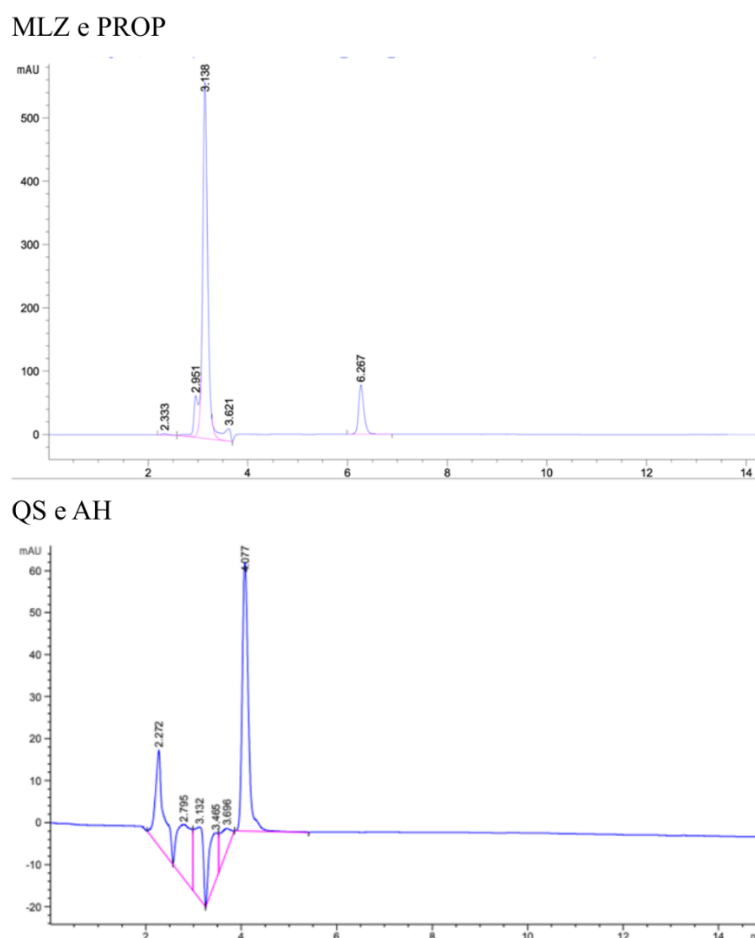
O número de pratos teóricos, parâmetro relacionado a eficiência da coluna, para o fármaco foi de 4637,83 $\pm$ 390,68, enquanto para o pós-biótico foi de 41017,67 $\pm$ 2682,74, valores esses bem acima do mínimo de 2000 pratos teóricos, conforme os critérios da USP (2020) e ANVISA (2017). Esse resultado indica que a coluna promove uma separação eficiente e é capaz de manter uma resolução adequada ao longo das análises.

Portanto, todos os parâmetros avaliados demonstraram estar em plena conformidade com os critérios estabelecidos pelas normas nacionais e internacionais. Isso evidencia que o sistema cromatográfico se encontra ajustado para fornecer resultados confiáveis e robustos, assegurando a qualidade metodológica e a segurança analítica exigidas para aplicações laboratoriais e farmacêuticas.

3.2. Seletividade

A seletividade do método tem por objetivo avaliar a capacidade do método em quantificar a MLZ e o PROP na presença dos componentes da formulação, assegurando a ausência de interferências provenientes dos excipientes. Os resultados obtidos foram apresentados na figura 2A.

Figura 25. Cromatograma dos componentes da matriz polimérica, ácido hialurônico e quitosana, obtido por UV-DAD em 216 nm.



O cromatograma da matriz polimérica apresentou picos pequenos de retenção inferiores ao da MLZ e um pico maior em 4,08 min atribuídos aos componentes da formulação ou resíduos do processo de preparo. Não coeluíram com

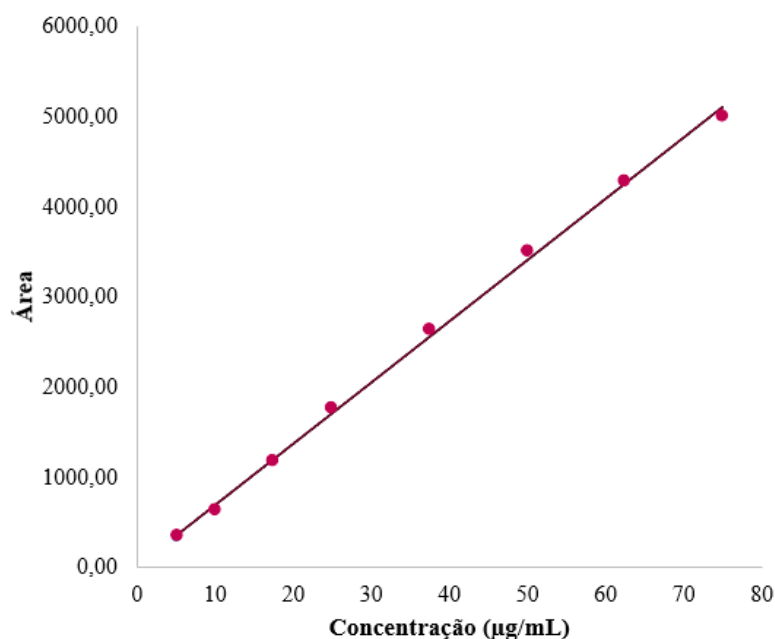
os picos correspondentes à MLZ e ao PROP, não comprometendo sua identificação e quantificação.

3.3. Linearidade

A linearidade tem por objetivo demonstrar a capacidade do método analítico em proporcionar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, dentro de uma faixa estabelecida. Segundo a ICH Q2(R1), a linearidade deve ser avaliada mediante a análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes do analito. As diretrizes da ANVISA (RE nº 899/2003; RDC nº 166/2017) e da Farmacopeia americana (USP, 2020) também recomendam o uso de réplicas e a avaliação de parâmetros estatísticos como a equação da reta.

A linearidade foi determinada para a MLZ a partir da construção de curvas analíticas com oito concentrações distintas (5 µg/mL, 10 µg/mL, 17,5 µg/mL, 25 µg/mL, 37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 62,5 µg/mL, 75 µg/mL) preparadas em triplicata e as áreas dos picos cromatográficos foram plotadas em função da concentração, como exibido na Figura 26.

Figura 26. Curva de calibração construída com oito pontos de concentração (5; 10; 17,5; 25; 37,5; 50; 62,5 e 75 µg/mL), injetados em triplicata, correlacionando a concentração de MLZ com a área do pico cromatográfico detectado a 216 nm.



A equação da linha de regressão obtida a partir da curva analítica foi expressa como $y = 67,911x + 13,784$ onde y representa a área do pico a 216 nm e x corresponde à concentração do fármaco (µg/mL). O coeficiente de correlação linear,

calculado como $r = 0,9985$, confirma a linearidade do método proposto para a análise (ANVISA, 2017).

Foi realizada análise de variância ANOVA a partir dos dados obtidos na curva analítica para verificar se a regressão linear foi significativa (Tabela 12). O valor de F calculado foi maior que F tabelado (4,3), indicando que a regressão é altamente significativa ($p > 0,0001$). Para falta de ajuste, por outro lado, F calculado foi inferior a F tabelado, indicando que não há falta de ajuste significativa. Assim, o modelo linear descreve adequadamente os dados da curva analítica.

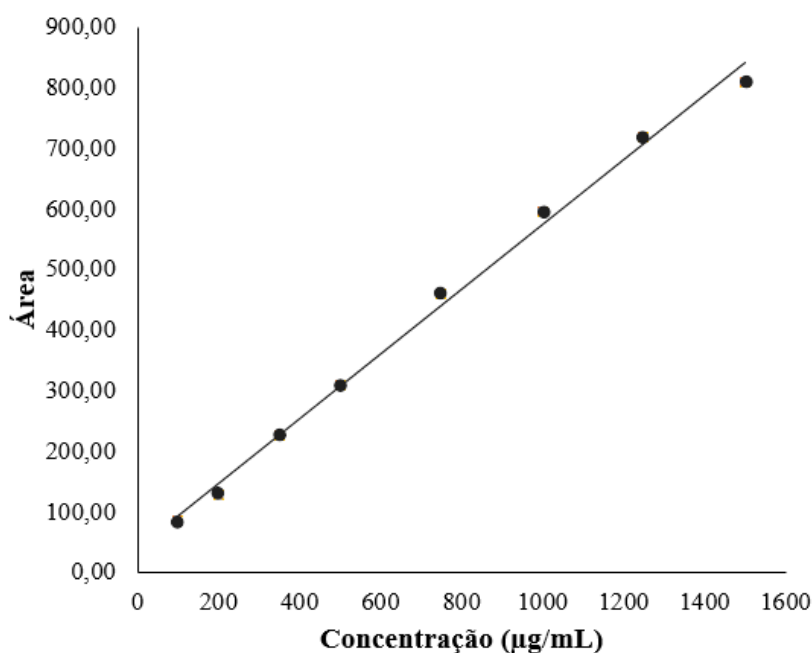
Tabela 12 - Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva da mesalazina

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado
Regressão	62.510.011	1	3580,73*	4,3
Resíduo	384.061	22	-	-
Falta de ajuste	91.324	5	1,00	2,85
Erro puro	292.737	16	-	-
Total	62.894.072	23	-	-

*Significativo para $p < 0,0001$.

A linearidade do PROP foi determinada a partir da construção de curvas analíticas com oito diferentes concentrações (100 µg/mL, 200 µg/mL, 350 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL, 1250 µg/mL, 1500 µg/mL) preparadas em triplicata tendo suas áreas plotadas em função da concentração, como mostra a Figura 27.

Figura 27. Curva de calibração elaborada com oito concentrações (100; 200; 350; 500; 750; 1000; 1250 e 1500 µg/mL), injetadas em triplicata, representando a relação entre a concentração de PROP e a área do pico cromatográfico em 216 nm.



A equação da reta de regressão obtida a partir da curva analítica foi determinada como $y = 0,5349x + 38,2428$, em que y representa a área do pico detectado a 216 nm e x corresponde à concentração do fármaco em µg/mL. O coeficiente de correlação linear obtido ($r = 0,9955$) evidencia a forte relação linear entre os dados experimentais, corroborando a adequação do modelo proposto para a quantificação do analito, conforme os critérios estabelecidos pela RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017). Para o propionato, também foi realizada análise de variância ANOVA a partir dos dados obtidos na curva analítica para verificar se a regressão linear foi significativa, os dados obtidos estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva do propionato

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	F calculado	F tabelado
Regressão	1.456.386,78	1	1438,05*	4,3
Resíduo	21.267,75	22	-	-
Falta de ajuste	6.871,74	5	1,19	2,79
Erro puro	14.396,01	16	-	-
Total	1.477.654,53	23	-	-

*Significativo para $p < 0,0001$.

O valor de F calculado foi superior ao de F tabelado, indicando que a regressão é altamente significativa ($p > 0,0001$). Para falta de ajuste, por outro lado, F calculado (1,19) foi menor que F tabelado (2,79), indicando que não há falta de ajuste significativa. Assim, o modelo linear descreve adequadamente os dados da curva analítica também para o propionato.

3.4. Precisão

3.4.1. Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi avaliada por meio da análise de três concentrações distintas da MLZ e PROP, realizadas por dois analistas diferentes. Os resultados expressos como média e desvio padrão relativo (DPR) encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da precisão intermediária para MLZ e PROP, obtidos em três diferentes concentrações sob as mesmas condições operacionais.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Média	DPR (%)
MLZ	5	226,4 $\pm$ 3,67	1,62
	37,5	1777,6 $\pm$ 50,90	2,86
	75	3579,1 $\pm$ 157,42	4,40
	100	37,9 $\pm$ 1,88	4,96
PROP	750	287,6 $\pm$ 2,63	0,91
	1500	587,9 $\pm$ 9,31	1,58

A avaliação da precisão intermediária indicou que não houve diferença significativa na variabilidade dos dados obtidos pelo analista, tendo em vista que os

dados obtidos apresentaram todos os DPR (%) abaixo de 5%, conforme preconizado (ANVISA, 2017).

Esses resultados corroboram a adequação do método para análises quantitativas simultâneas de MLZ e PROP, apresentando precisão e reprodutibilidade, conforme recomendam as normas internacionais (ICH, 2005; USP, 2020).

3.4.2. *Repetibilidade*

Refere-se à precisão dos resultados obtidos pelo mesmo operador, com os mesmos instrumentos, em um curto intervalo de tempo (ANVISA, 2017). As medições da área para cada amostra foram realizadas em triplicata e os resultados estão detalhados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados da análise de repetibilidade para o fármaco (MLZ) e o pós-biótico (PROP), obtidos por três repetições realizadas pelo mesmo operador e condições operacionais.

MLZ			PROP		
Concentração (µg/mL)	Média	DPR (%)	Concentração (µg/mL)	Média	DPR (%)
5	226,4 ± 3,7	1,62	100	37,9 ± 1,9	4,96
37,5	1777,6 ± 50,9	2,86	750	287,6 ± 2,6	0,91
75	3579,1 ± 157,4	4,40	1500	587,9 ± 9,3	1,58

Para a MLZ, os valores variaram entre 1,62% e 4,40%, enquanto para o PROP os resultados oscilaram entre 0,91% e 4,96%, evidenciando uma boa repetibilidade do método. Conforme os critérios estabelecidos pela RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017), valores do DPR% inferiores a 5% são considerados aceitáveis para amostras em concentração nominal, o que foi plenamente atendido em todas as faixas de concentração analisadas.

A baixa variação entre as réplicas confirma a precisão do método e a reprodutibilidade sob condições controladas, reforçando a adequação do procedimento analítico para aplicações futuras em rotinas de controle de qualidade.

3.5. *Exatidão*

A exatidão é definida como o grau de concordância entre o valor experimental obtido e o valor teórico real, quando se aplica o método analítico em estudo. Idealmente, os resultados devem se aproximar de 100% de recuperação; no entanto, valores dentro da faixa de 80 a 120% são considerados aceitáveis para a maioria das análises quantitativas, conforme preconizado pela RDC nº 166/2017 (ANVISA, 2017). Os resultados foram obtidos e expressos na Tabela 16 e 17.

Tabela 16 - Resultados da análise de exatidão do método analítico desenvolvido para quantificação de MLZ por CLAE

Concentração teórica	Concentração experimental	Exatidão (%)
5,0	4,70	93,93
37,5	38,54	102,76
75,0	73,40	97,87

Tabela 17 - Resultados da análise de exatidão do método analítico desenvolvido para quantificação de PROP por CLAE

Concentração teórica	Concentração experimental	Exatidão (%)
100	87,67	87,67
750	788,80	105,17
1500	1440,69	96,05

Com base nos dados apresentados na Tabela 16 e 17, observa-se que os percentuais de recuperação obtidos confirmam a exatidão do método desenvolvido, demonstrando sua adequação para a quantificação do fármaco em estudo.

3.6. Robustez

A robustez é definida como a capacidade de um procedimento de permanecer insensível a pequenas variações nos parâmetros operacionais, demonstrando assim sua confiabilidade durante o uso (ICH, 2005). A avaliação da robustez visa identificar a influência de variáveis como temperatura e fluxo assegurando que essas alterações não comprometam a performance do método e contribuam para a garantia da qualidade analítica assegurando consistência e exatidão.

Devido a isso, a MLZ e o PROP foram submetidos a variações de fluxo, temperatura e comprimento de onda em concentrações de 37,5 µg/mL e 750 µg/mL respectivamente preparadas em triplicata e a concentração real, área e robustez foram avaliadas e compiladas na Tabela 18 e 19.

Tabela 18 - Avaliação da robustez do método analítico para MLZ frente a variações controladas de fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda realizadas em CLAE.

Variação	Concentração (µg/mL)	Área	Robustez (%)
Fluxo 0,9 mL/min	30,75 ± 2,34	2101,83 ± 158,84	81,99
Fluxo 1,1 mL/min	30,93 ± 2,51	2114,13 ± 170,21	82,47
Temperatura 28 °C	32,91 ± 3,06	2249,03 ± 208,12	87,77
Temperatura 32 °C	31,87 ± 2,86	2178,40 ± 194,24	85,00
Comprimento de onda 215 nm	33,95 ± 2,74	2319,20 ± 186,01	90,53
Comprimento de onda 217 nm	30,09 ± 3,15	2057,10 ± 213,62	80,24

Tabela 19 - Avaliação da robustez do método analítico para PROP frente a variações controladas de fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda realizadas em CLAE.

Variação	Concentração (µg/mL)	Área	Robustez (%)
Fluxo 0,9 mL/min	628,95 ± 79,36	374,67 ± 42,45	83,86
Fluxo 1,1 mL/min	636,06 ± 128,90	378,47 ± 68,95	84,81
Temperatura 28 °C	670,64 ± 112,20	396,97 ± 60,01	89,42
Temperatura 32 °C	670,33 ± 119,99	396,80 ± 64,18	89,38
Comprimento de onda 215 nm	696,88 ± 106,57	411,00 ± 57,01	92,92
Comprimento de onda 217 nm	644,72 ± 121,01	383,10 ± 64,73	85,96

Idealmente, os resultados devem se aproximar de 100% de recuperação; no entanto, valores dentro da faixa de 80 a 120% são considerados aceitáveis para a maioria das análises quantitativas, conforme preconizado pela RDC nº 166/2017

(ANVISA, 2017). A MLZ apresentou variações de 80,24% a 90,53%, estando dentro do percentual requisitado, assim como o PROP que demonstrou resultados ainda mais próximos do ideal variando de 83,86% a 92,92%, demonstrando assim que pequenas variações não comprometem o método.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos e revoga a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (**ICH**). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Geneva: ICH, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (**USP**). United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43–NF 38). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2020.