



UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio Mesquita Filho"



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Maurício Palmeira Chaves de Souza

**Micropartículas gastrorretentivas de curcumina constituídas por
hidroxipropilmetilcelulose e quitosana aplicadas ao tratamento de úlceras
gástricas**

ARARAQUARA – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio Mesquita Filho”



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Maurício Palmeira Chaves de Souza

**Micropartículas gastrorretentivas de curcumina constituídas por
hidroxipropilmetilcelulose e quitosana aplicadas ao tratamento de
úlceras gástricas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Co-orientadoras: Profa. Dra. Taís Maria Bauab e Profa. Dra.
Andréia Bagliotti Meneguim

ARARAQUARA – SP

2021

-
- S731m** Souza, Mauricio Palmeira Chaves de.
Micropartículas gastrorretentivas de curcumina constituídas por hidroxipropilmetilcelulose e quitosana aplicadas ao tratamento de úlceras gástricas / Rodrigo Passos Evangelista. – Araraquara: [S.n.], 2019.
141 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientadora: Taís Maria Bauab.
Coorientadora: Andréia Bagliotti Meneguín.
1. Micropartículas. 2. Curcumina. 3. Liberação gastrorretentiva. 4. Liberação controlada. 5. Geleificação Ionotrópica. 6. Liofilização. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Bauab, Taís Maria, coorient. III. Meneguín, Andréia Bagliotti, coorient. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Micropartículas gastrorretentivas de curcumina constituídas por hidroxipropilmetilcelulose e quitosana aplicadas ao tratamento de úlceras gástricas

AUTOR: MAURÍCIO PALMEIRA CHAVES DE SOUZA

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORDINADORA: TAIS MARIA BAUAB

COORDINADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. MARISA MASUMI BEPPU (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos / Faculdade de Engenharia Química da Unicamp

Profa. Dra. LETÍCIA CRUZ (Participação Virtual)

Departamento de Farmácia Industrial / Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO (Participação Virtual)

Departamento de Produtos Farmacêuticos / Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA (Participação Virtual)

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Araraquara, 17 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES

Maurício Palmeira Chaves de Souza

Nascido a 27 de setembro de 1989, natural da cidade de Salvador, estado da Bahia.

Filho de Mary da Silva Palmeira e José Chaves de Souza

Graduou-se em farmácia pela universidade do estado da Bahia em 2015, tornou-se mestre em ciência e tecnologia de Alimentos pela universidade federal de Viçosa em 2018 e tornou-se doutor em ciências farmacêuticas pela universidade estadual paulista em 2021.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus e aos Orixás, que sempre me guiaram e iluminaram meus caminhos com felicidade, saúde, tranquilidade, disposição e bons amigos. Falando em bons amigos e sorte, gostaria de agradecer aos professores Marlus, Andréia e Taís Bauab por ter me aceitado como aluno de doutorado e terem me orientado com tanto carinho e atenção, sem ao menos me conhecer. Ainda sobre amigos, gostaria de agradecer à presença e o prazer do convívio com Leonardo Miziara, Fernanda Boni, Víctor Hugo, Gabriela Correa, Paula Scanavez, Denis Godoi, Franciele Baveloni, Maria Palmira Gremião, Leda Robusti, Izabelle Siqueira, Laura Tobias, Camila Pinheiro, e todos os alunos da graduação que conheci.

A ciência deve ser encarada como um bem comum a todos e ela deve pertencer a todos, sem barreiras sociais, linguística e econômicas, por isso agradeço a todos que de alguma forma objetivam tornar público este bem.

Aos órgãos de fomento, CNPq, Fapesp e em especial à Capes, pela bolsa concedida (código de financiamento 001).

Aos meus pais, pela dedicação, sacrifício, esforço para que eu pudesse ter o que nunca tiveram.

Gostaria de deixar um agradecimento especial à Dra. Natalia Naddeo e à farmácia Bothanica.

Em especial, gostaria de agradecer à Fernanda de Melo, por ter me incentivado sempre a dar o meu melhor e segurar minha cabeça sonhadora no chão.

Um agradecimento, aos sempre presente amigos (irmãos) de Salvador, que nunca me permitiram desistir dos meus sonhos: Léo, Ângelo, Rafael, Walkston, Alexandre, Islam.

À toda equipe do laboratório de tecnologia farmacêutica, em especial à Larissa Spósito e Bruna Furquin, pela árdua tarefa de me ajudar e ensinar a realizar os experimentos *in vivo*.

Um muito obrigado para o Senhor Paulo da portaria do prédio pelas conversas e excelentes conselhos sobre a vida.

Em especial ao colega de trabalho e mais novo amigo, Everton Miranda, por toda ajuda, ensinamentos e gentileza/humildade em compartilhar tanto conhecimento comigo e à Claudia Bueno, coordenadora de P&D dos Laboratórios Aché, por ter acreditado em alguém sem experiência e confiado na minha capacidade de aprender e me adaptar. E aos Laboratórios Aché, que é o local que me permite evoluir profissionalmente e pessoalmente, permitindo o desempenho das minhas funções com dignidade e alegria.

Por fim, a todos que porventura eu tenha esquecido de mencionar, especialmente àqueles que de alguma forma me enviaram boas intenções para que o trabalho fosse concluído.

EPÍGRAFE

*“O mundo me é dado apenas uma vez, não como um registro e sim como uma percepção.
Sujeito e objeto são apenas um. A barreira entre eles não pode ser discriminada, porque essa
barreira não existe.”*

Erwin Schrödinger

ABSTRACT

Gastric ulcers are pathologies caused by bacteria or use of medication, especially non steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs). The lack of treatment for this condition can lead to aggravation of the lesion and cause gastric cancer. Curcumin is a natural compound extracted from the rhizomes of the long turmeric plant and has been used in traditional Indian medicine for many centuries. However, due to its low solubility in aqueous media, its use is limited. The treatment of gastric diseases requires the drug remains in contact with the stomach mucosa, but the permanence time of pharmaceutical forms is impaired by the time of gastric emptying, which is about 2 h. One strategy that can be used to circumvent these limitations is the use of a gastro-retentive and controlled-release systems with targeting to the stomach. In this regard, the development of polymeric microparticles using mucoadhesive polymers such as hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and chitosan (CS), capable of controlling the release of drugs and triggering the release only in acidic media can be extremely advantageous. Thus, the aim of this study was to develop and characterize polymeric microparticles prepared by ionotropic gelation from CS/HPMC and sodium tripolyphosphate (TPP) for gastroretentive delivery of curcumin and to evaluate its in vivo antiulcer potential. The microparticles formulation could be selected using a quality by design methodology through ionotropic gelation and lyophilization processes. Microparticles were spherical in shape and show diameter between 620 and 820 μm . Scanning electron microscopy shows that particles containing curcumin have large pores in their interior, while those without curcumin present uniformity throughout their matrix. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) indicated as the main polymeric interaction regions; X-Rays Diffraction (XRD) was able to show that the microencapsulation process led to amorphization of curcumin. The encapsulation efficiency was greater than 50% and microparticles completely released curcumin after 24h, while the lyophilized ones had higher release rates than non-lyophilized ones, which showed the impact of the drying process. The same behavior was observed in liquid absorption tests. Thermal and gravimetric analyzes showed changes in the structure of polymers and curcumin and confirmed a polymeric interaction, mainly through hydrogen bonds and van der Waals forces. Mucoadhesion analysis showed that all microparticles obtained presented adhesion in the mucin disc. Results of the in-vivo study point in the direction that these systems are promising tools in the prevention of gastric lesions associated with NSAID use, presenting index of gastroprotection almost same omeprazole. From these results, developed MPs can be explored as a controlled release system of drugs with triggering mechanisms to acidic environments, with potential for application in gastroprotection, especially in patients that use NSAID chronically.

Keywords: Microparticles; Curcumin; gastroretentive drug release; Ionotropic Gelation, Lyophilization.

RESUMO

As úlceras gástricas são patologias causadas por bactérias ou uso de medicamentos especialmente os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), sendo que a falta de tratamento dessa condição pode levar ao agravamento da lesão e até mesmo ao câncer gástrico. A curcumina é um composto natural obtido a partir dos rizomas da planta *Curcuma longa* e é utilizada na medicina tradicional indiana há muitos séculos. Entretanto, por apresentar baixa solubilidade em meios aquosos, seu uso é limitado. Arelado a isso, o tratamento de doenças gástricas demanda que o fármaco permaneça em contato com a área, porém o tempo de permanência de formas farmacêuticas convencionais neste órgão é limitado pelo tempo de esvaziamento gástrico, que é de cerca de 2h. Uma estratégia que pode ser utilizada para contornar essas limitações é o uso de um sistema de entrega gastrorretentivo, mucoadesivo e de liberação controlada para o estômago. Nesse sentido, o desenvolvimento de micropartículas poliméricas utilizando polímeros mucoadesivos, capazes de controlar a liberação de fármacos e permitir que essa liberação somente aconteça em meios ácidos, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e a quitosana, pode ser extremamente vantajosa. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar micropartículas poliméricas constituídas de quitosana e HPMC para veiculação de curcumina e avaliar *in vivo* o seu potencial antiúlcera. As micropartículas puderam ser selecionadas usando uma metodologia de *'quality by design'*, as quais foram obtidas por meio de geleificação ionotrópica e processo de liofilização. As micropartículas apresentaram forma esférica e exibiam diâmetros entre 620 e 820 μm . A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as partículas contendo curcumina possuem grandes poros em seu interior, enquanto aquelas sem curcumina apresentam uniformidade em todo o seu interior. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) indicada como as principais regiões de interação polimérica; A difração de raios-X (DRx) foi capaz de mostrar que o processo de microencapsulação levou à amorfização da curcumina. A eficiência de encapsulação foi superior a 50% e as micropartículas liberaram completamente a curcumina após 24h, enquanto as liofilizadas apresentaram maiores taxas de liberação do que as não liofilizadas, o que evidenciou o impacto do processo de secagem. O mesmo comportamento foi observado nos testes de absorção de líquidos. As análises térmicas e gravimétricas mostraram que mudanças na estrutura dos polímeros e do curcumina e confirmaram uma interação polimérica, por meio majoritariamente de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. A análise de mucoadesão mostraram que todas as micropartículas obtidas apresentaram adesão no disco de mucina. E os resultados do estudo *in vivo* apontam na direção de que esses sistemas são ferramentas promissoras na prevenção de lesões gástricas associadas ao uso de AINES, apresentando índice de gastroproteção semelhante à conferida pelo omeprazol. A partir desses resultados, os MPs desenvolvidos podem ser

explorados como um sistema de liberação controlada de fármacos com mecanismo duplo, um desencadeado pela presença de ácidos, destinados à liberação gastroespecífica e outro mucoadesivo, com potencial para aplicação em gastroproteção, principalmente em pacientes que fazem uso crônico de AINES.

Palavras-chave: Micropartículas; Curcumina; Liberação gastroretentiva; Liberação controlada; Geleificação Ionotrópica, Liofilização.

SUMÁRIO

1.	Introdução e Justificativa	13
1.2.	Curcumina	21
1.3.	Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).....	24
1.4.	Quitosana.....	25
1.5.	Micropartículas poliméricas como sistema de entrega de fármacos.	27
1.6.	Quality by design (QbD).....	30
2.	Objetivos	33
2.1.	Objetivos específicos.	33
3.	Materiais e Métodos	34
3.1.	Principais Materiais:.....	34
3.2.	Obtenção das MPs.....	35
	3.2.1. Determinação da condição de obtenção das MPs	35
	3.2.2. Otimização das Micropartículas	38
3.3.	Caracterização das Micropartículas	38
	3.3.1. Tamanho médio e circularidade.	38
	3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	38
	3.3.3. Revalidação da metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência	39
	3.3.4. Análise de interações via espectroscopia na região do infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR).	41
	3.3.5. Difração de Raios-X	41
	3.3.6. Análises de termogravimétricas DSC/TG.....	41
	3.3.7. Eficiência de encapsulação e Teor	42
	3.3.8. Absorção de Líquidos	42
	3.3.9. Estudo de liberação in vitro da CUR a partir das MPs QS/HPMC e determinação das condições sink da curcumina no meio de liberação.....	43
	3.3.10. Estudo de Mucoadesão in vitro.....	45
	3.3.11. Ensaio de ação gastroprotetora in-vivo	45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Obtenção das Micropartículas	48
4.1.1. Delineamento experimental e otimização das MPs.....	48
4.2. Caracterização do sistema	59
4.2.1. Tamanho e Circularidade	59
4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
4.2.3. Revalidação de metodologia para quantificação de curcumina por HPLC.....	64
4.2.4. Análise de interações via espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	67
4.2.5. Difração de raios-X	77
4.2.6. Análises de termogravimétricas DSC/TG.....	80
4.2.7. Eficiência de encapsulação e teor.....	87
4.2.8. Absorção de Líquidos	89
4.2.9. Estudo de liberação in vitro da curcumina a partir de micropartículas gastroretentivas. .	92
4.2.11. Ensaio do efeito gastroprotetor in-vivo.....	105
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
ANEXOS e MATERIAL SUPLEMENTAR	114
Referências:.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura molecular da quitosana	18
Figura 2. Estruturas moleculares a) hidroxipropilmetilcelulose e b) curcumina.....	19
Figura 3. Representação gráfica da produção das MPs.....	37
Figura 4. Representação gráfica das médias dos tamanhos das micropartículas formadas.....	51
Figura 5. Análise da componenete mais importante sobre a formação das MPs.....	51
Figura 6. Representação gráfica das médias dos tamanhos das micropartículas formadas, agrupadas por Mw de CH, Concentração de TPP e Temperatura.	53
Figura 7. Respresentação gráfica da distribuição de resíduos	54
Figura 8. Representação gráfica dos efeitos individuais das variáveis estudadas sobre o tamanho das MPs	55
Figura 9. Representação gráfica das interações do efeitos das variáveis estudadas sobre o tamanho das MPs	56
Figura 10. Representação gráfica da predição da condição ótima de síntese de MPs apartir do modelo proposto.	56
Figura 11. Representação gráfica dos efeitos individuais das variáveis estudadas sobre o tamanho das MPs	58
Figura 12. Diâmetro médio das MPs obtidas (A, B, C, D)	60
Figura 13. Micrografias das Micropartículas poliméricas (a, b, c, d).....	63
Figura 14. A) Espectros de diferentes concentrações de curcumina demonstrativo da linearidade.B) Espectro de seletividade com a injeção de curcumina, tween-20, quitosana e HPMC.	65
Figura 15. Representação gráfica da curva média de regressão e da equação utilizada para determinação da concentração de curcumina (Mg.mL-1).....	66
Figura 16. Espectros de FTIR com as suas respectivas decovoluções e identificação das principais bandas (a, b, c, d, e, f).	73
Figura 17. Espectros de FTIR dos materiais e MPs com as bandas informativas identificadas.....	76
Figura 18. Difratomogramas dos materiais e MPs utilizados (a, b, c, d, e, f, g, h).....	78
Figura 19. Termogramas analisados dos materiais e MPs.	83
Figura 20. Perfil cinético e modelo ajustado para o estudo de absorção de líquidos das MPs	90
Figura 21. Percentual de líquido absorvido por cada tipo de MP em diferentes tempos.	91
Figura 22. Gráficos de liberação de curcumina para MP liofilizada e não liofilizada	95
Figura 23. Modelos cinéticos melhor ajustados para o estudo de liberação de curcumina a partir das MPs liofilizadas	97

Figura 24. Modelos cinéticos melhor ajustados para o estudo de liberação de curcumina a partir das MPs não liofilizadas	99
Figura 25. Gráfico dos dados comparativos para Trabalho de adesão (esquerda) e Força mucoadesiva (direita), para as MPs. B NL- branca Não liofilizada; Cur NL-Não liofilizada contendo curcumina; B L- Branca Liofilizada; Cur L-Liofilizada contendo curcumina.	102
Figura 26. Gráficos de barras e desvios para cada grupo de animais e seus tratamentos.	106
Figura 27. Infográfico de comparações entre diferentes tratamentos média a média.	107
Figura 28 Difratoograma das MPs brancas sem liofilização antes do processo de suavização digital (dado não tratado)	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos valores obtidos para desenvolvimento das MPs, utilizando planejamento fatorial.	36
Tabela 2. Parâmetros utilizados para validação.	64
Tabela 3. Parâmetros obtidos para avaliação da exatidão do método analítico	67
Tabela 4. Parâmetros obtidos para avaliação da precisão do método analítico	67
Tabela 5. Parâmetros de EE% e Teor de curcumina nas MPs	88
Tabela 6. Trabalho de mucoadesão e força de mucoadesão e avaliados com disco de mucina das micropartículas formadas.	103
Tabela 7. Sumário de dados para Teste de Grubbs.	105
Tabela 8. Dados removidos por serem considerados outliers pelo teste de Grubbs.	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos de sistemas gastrorretentivos e suas principais características.	17
Quadro 2. Ajuste de modelos para as MPs liofilizadas contendo curcumina.	96
Quadro 3. Ajuste de modelos para as MP não liofilizadas contendo curcumina.	99

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar 1. Planejamento fatorial com resultados de tamanho das MPs. As lacunas preenchidas com *, indicam que não ocorreu formação de Mps.....	114
Material Suplementar 2. Representação das médias com desvio padrão do efeito gastroprotetor em cada grupo de animais.	117
Material Suplementar 3. ANÁLISE de variância do modelo matemático proposto para o disenvolvimento das MPs.....	119
Material Suplementar 4. Análise de variância do efeito gastroprotetor entre diferentes grupos de animais.....	120
Anexo 1. Diagrama de CQAs utilizada no desenvolvimento das MPs contendo curcumina.....	116
Anexo 2. Dados de porosidade das MPs contendo curcumina (não utilizado).	118
Anexo 3. DOcumento de aprovação do CEUA da UNESP para a realização dos experiemtnos com animais.	121
Anexo 4. Lista de publicações realizadas durante o período de doutorado (2018-2021) Erro! Indicador não definido.	

1. Introdução e Justificativa

A ulcera gástrica é uma doença caracterizada por lesões ulcerativas na superfície da mucosa estomacal e é um problema de saúde com impacto global (Aihara et al., 2003).

Fatores comportamentais evitáveis, como consumo excessivo de álcool e tabagismo, bem como condições relacionadas à saúde, principalmente o uso de AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) e infecções por *Helicobacter pylori*, que são situações virtualmente inevitáveis, são as maiores causas de doenças gástricas, que podem se manifestar principalmente como gastrites e úlceras, podendo progredir para o câncer gástrico (K. Wang et al., 2021).

Os benefícios do uso de AINES para a humanidade são inegáveis, atuam no combate a inflamações, dores, febre e são parte do desenvolvimento médico que contribuíram e continuam contribuindo para a melhora da condição de saúde das pessoas. Ao longo dos anos, novas aplicações para esta classe de medicamentos tem sido testadas e implementadas, como seu efeito antitrombótico, tratamento de controle de lesão secundária após hemorragia intracerebral espontânea, dentre outras (Brunton et al., 2012; Ironside et al., 2021). Entretanto, uma das maiores limitações do uso de AINES é a sua capacidade de causar úlcera gastroduodenal e sangramento. O primeiro registro deste efeito dos AINES foi catalogado pelos estudos de Douthwaite e Lintott em 1938 (Douthwaite & Lintott, 1938).

Os AINES podem causar lesões gástricas por diversos mecanismos. Um deles é o mecanismo de irritação tópica do epitélio, decorrente do contato direto com o epitélio estomacal. Existem três bases teórico-experimentais para suportar essa afirmação e estes mecanismos são especialmente observados em AINES com grupos ácidos carboxílicos em sua estrutura, pois estes podem romper a barreira mucosa, permitindo assim um efluxo inverso do ácido gástrico para a mucosa, causando lise nas células do epitélio gástrico. Já as espécies que não foram ionizadas são capazes de entrar nas células do epitélio gástrico, e no ambiente celular, neutro, se ionizam, exercendo pressão osmótica, causando o efluxo de íons para dentro da célula e subsequentemente água, causando finalmente a lise celular por inchaço (Fromm, 1987; Somasundaram et al., 1995).

Um outro mecanismo proposto diz respeito à maioria dos AINES, tendo grupos carboxílicos ou não. Ainda que não seja completamente aceita, é a hipótese de que os AINES podem danificar o epitélio gastroduodenal por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa nas células epiteliais. Vários AINES demonstraram desacoplar a respiração mitocondrial (Mahmud et al., 1997; Somasundaram et al., 1995), levando a uma depleção de ATP e, portanto, uma capacidade reduzida de regular as funções celulares normais, como a manutenção do pH intracelular. A capacidade dos AINES de desacoplarem fosforilação oxidativa também parece estar relacionada, em certa medida, a frações ácidas (tais como resíduos de ácido carboxílico), uma vez que a substituição nesses locais interfere com a capacidade desses compostos de agirem como desacopladores (Mahmud et al., 1997; Somasundaram et al., 1995). E o terceiro mecanismo proposto para a gênese da ulcera por irritantes tópicos decorrente do contato com os AINES é a de que, estes medicamentos apresentam capacidade de diminuir a hidrofobicidade da camada de gel de muco no estômago (John L Wallace, 2000).

Goddard et al. (1987) e Lichtenberger (1995) propuseram que esta camada é uma barreira primária para dano induzido por ácido no estômago (Goddard et al., 1987; L M Lichtenberger, 1995). Eles demonstraram que a superfície do estômago é hidrofóbica e que esta hidrofobicidade pode ser reduzida por vários agentes farmacológicos. Por exemplo, mostrou-se que AINES se associam com os fosfolípidios tensoativos dentro da camada de gel de muco, reduzindo assim suas propriedades hidrofóbicas. Esses investigadores demonstraram ainda que o muco da camada de gel no estômago de ratos e camundongos que receberam AINES foi convertida de um material não molhável para um estado molhável. Este efeito persistiu por várias semanas ou meses após a cessação da administração de AINES (Goddard et al., 1987; L M Lichtenberger et al., 1995; Lenard M Lichtenberger et al., 1995).

Um outro mecanismo, talvez o mais conhecido é a inibição da cascata inflamatória, via inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) e, conseqüentemente, a síntese de prostaglandina, que no estômago inibe especificamente a prostaglandina E2, responsável pela via de sinalização que dará origem à síntese de muco protetor gástrico, ainda que o óxido nítrico possa aparecer com função parcialmente substitutiva à prostaglandinas gastroprotetoras (Brunton et al., 2012).

As prostaglandinas são também potentes vasodilatadores e a sua inibição causa redução temporária do diâmetro capilar e o tônus capilar. Sugere-se que ocorra dano ao endotélio vascular como um evento precoce após a administração de AINEs a animais experimentais (Rainsford, 1983; JOHN L Wallace et al., 1990). A correlação entre o dano vascular nos vasos do trato gastrointestinal (TGI) e as lesões gástricas encontram uma ligação no evento posterior que é a isquemia/reperfusão (D GRANGER et al., 1993), em que os neutrófilos demonstraram desempenhar um papel crítico como mediadores de lesão endotelial (Rainsford, 1983). Essa observação nos levou a examinar o possível papel da adesão de neutrófilo na patogênese da gastropatia experimental por AINEs, os quais não estão associados à gênese da lesão, mas são responsáveis pela severidade dela, já que essas células são capazes de liberar proteases e espécies reativas de oxigênio. Reside aí uma possível explicação de o porquê de substâncias antioxidantes, como a curcumina, serem capazes de proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por radicais livres.

Duas possíveis soluções para esta limitação são o desenvolvimento de novos AINES, o qual é custoso e leva tempo, e o uso de terapias profiláticas que evitem ou amenizem este tipo de efeito, atuando como gastroprotetores (John L Wallace, 2000).

A segunda causa levantada, relacionada à lesões gástricas, tem associação com a infecção por *H. pylori*. Trata-se de uma das mais comuns infecções bacterianas crônicas em humanos, causando doenças secundárias como gastrite, a qual sem o tratamento adequado pode progredir para úlceras gástricas, duodenais e câncer gástrico (den Hoed & Kuipers, 2020; Zagari et al., 2018). *H. pylori* é um bacilo helicoidal, gram-negativo, com presença de flagelos (JAWETZ & LEVINSON, 2005).

Por se tratar de um microrganismo altamente adaptado ao microambiente do TGI humano, é capaz de promover lesões no epitélio gástrico por meio de diferentes mecanismos. Uma característica que marca a alta adaptação desta bactéria ao hostil ambiente gástrico é a sua capacidade de produzir urease, enzima capaz de promover a degradação da uréia produzindo dióxido de carbono e amônia, alcalinizando assim o pH do meio que a bactéria se encontra, contribuindo para

manutenção de condições ótimas para o seu desenvolvimento (Madigan et al., 2016).

Desde 1997 estabeleceu-se, em consonância com a Primeira Conferência de Maastricht, o esquema terapêutico para o tratamento de infecções por *H. pylori*, composto por três fármacos, um inibidor de bomba de prótons (ex: omeprazol) e dois antibióticos, a amoxicilina e claritromicina. Entretanto, a taxa de sucesso no tratamento destas infecções situa-se em torno de 70% e, em alguns países, abaixo de 30%, taxas inferiores às estabelecidas pela OMS (Organização mundial da Saúde) para uma doença infecciosa (80%) (Gisbert et al., 2016), o que pode estar relacionado, entre outros fatores, à resistência bacteriana aos antibióticos (Kim, 2015) e ao reduzido tempo de retenção gástrica característico das formulações convencionais administradas por via oral.

Deste modo, a busca por novas alternativas terapêuticas e sistemas de liberação inovadores se torna premente. Dentre os avanços no campo da farmacotécnica e tecnologia farmacêutica, os sistemas gastrorretentivos podem ser considerados como uma importante estratégia para otimização do tratamento de infecções no TGI relacionadas ou não ao *H. pylori*.

Sistemas gastrorretentivos são formas farmacêuticas orais de liberação prolongada que apresentam maior tempo de retenção no estômago, promovendo o aumento de absorção e biodisponibilidade de fármacos, a adesão ao tratamento e redução da toxicidade (Rosen et al., 2017). A absorção de fármacos pelo TGI, bem como a ação de fármacos que atuam localmente nesta região, se torna por vezes insatisfatória devido às variações do tempo de retenção (Nayak; Maji; Das, 2010). Assim, formas farmacêuticas que permaneçam por mais tempo no TGI tornam-se vantajosas para veiculação de fármacos pouco solúveis, pois à medida que o conteúdo (fluido) gástrico saturado de fármaco é removido pelo esvaziamento gástrico, o novo fluido pode acomodar ou dissolver novas moléculas de fármaco presentes no medicamento, garantindo concentrações constantes de fármaco no órgão. Essas características indicam que estes sistemas se apresentam como uma opção viável para o tratamento de úlceras gástricas, condição que demanda ação local dos fármacos e, portanto, quanto maior o tempo de permanência do fármaco no local, maior a efetividade do tratamento.

Diferentes tipos de sistemas gastrorretentivos podem ser obtidos alterando-se os mecanismos de gastrorretenção, como apresentado no Quadro 1.

QUADRO 1. TIPOS DE SISTEMAS GASTRORRETENTIVOS E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.

Sistema	Características
Alta densidade	Pode ser obtido por revestimento do fármaco ou mistura com material inerte de alta densidade, de modo que apresenta densidade $\sim 1,5$ g/cm ³ . A elevada densidade forma um sedimento de longa duração no estômago.
Baixa densidade	Possuem capacidade de flutuar no conteúdo gástrico, liberando o fármaco por mais tempo. A sua baixa densidade deve-se a capacidade de aprisionar ar nos seus numerosos poros e/ou apresentar em sua constituição materiais de baixa densidade.
Mucoadesivo	Estabelecem um contato íntimo com a mucosa gástrica, aumentando o tempo de residência nesse órgão
Magnéticos	Campo magnético aplicado externamente aumenta tempo de retenção do sistema no estômago devido associação com partículas magnéticas.
Fonte: (Chugh & Nanda, 2017; Nayak, A.K.; Maji, R.; Das, 2010; Rosen et al., 2017)	

Dentre estes, destacam-se os sistemas mucoadesivos. Os sistemas mucoadesivos caracterizam-se por aderirem à mucosa gástrica aumentando assim o tempo de retenção no TGI, permitindo que os fármacos possam agir localmente e que se dissolvam ou se dispersem em maior extensão nos fluidos gástricos. (Moura et al., 2019). Físico-quimicamente, a adesão pode ser explicada como produto, inicialmente da molhabilidade e difusibilidade das cadeias poliméricas para o muco contendo mucina, nos qual essas cadeias poliméricas podem interagir por meio de interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio com o muco, completando o evento de adesão (Chugh & Nanda, 2017; de Souza et al., 2020; A. Kumar et al., 2015; Nayak, A.K.; Maji, R.; Das, 2010; Rosen et al., 2017)

Estes sistemas podem ser formulados utilizando polímeros ou combinação de polímeros como carbopol, quitosana, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) dentre

outros (Chugh & Nanda, 2017). Segundo Nayak *et. al.* (2009), alguns polímeros, como o HPMC, ainda podem gerar sistemas altamente porosos que, quando hidratados, formam uma barreira gel coesiva, prolongando o seu perfil de liberação.

É importante ressaltar que o muco, graças à mucina, assim como as células do epitélio gástrico, apresentam carga elétrica negativa (Varum *et al.*, 2008), de maneira que a aplicação da quitosana (Figura-1) torna-se possível, já que este biopolímero torna-se policatiónico em meios ácidos, condição fundamental para sua dispersão no meio e posterior exibição de propriedades mucoadesivas quando em contato com superfícies carregadas negativamente (Chatelet, 2001), como é o caso da mucina e do ambiente gástrico ($\text{pH} < 2$).

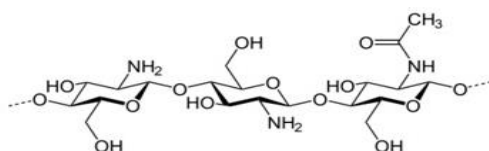


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DA QUITOSANA

Fonte: (Teng, 2011)

A quitosana (QS) é o segundo polissacarídeo mais disponível na natureza, sendo superado apenas pela celulose (Hamed *et al.*, 2016; Revathi *et al.*, 2012). É formada por unidades de N-acetil-D-Glicosamina e D-Glicosamina, obtida a partir da desacetilação de mais de 50% dos grupos acetamido presentes na molécula da quitina, obtida majoritariamente a partir de exoesqueletos de crustáceos. Apresenta baixa toxicidade, é biocompatível e biodegradável (Robert *et al.*, 1992). QS de elevado grau de desacetilação apresentam propriedades mucoadesivas, antioxidante, antibacteriana, formadora de filmes e antidislipidemiante (Zorofchian Moghadamtousi *et al.*, 2014), além de serem capazes de liberar fármacos em meios ácidos, devido à protonação das suas cadeias e a consequente dispersão (de Souza *et al.*, 2020).

Desse modo, a aplicação da QS combinada com um outro polímero que confira diferentes características à forma farmacêutica, como é o caso da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), torna inovador o desenvolvimento de sistemas farmacêuticos mucoadesivos, de liberação controlada e especificamente dirigidos, emergindo como uma opção viável, graças à versatilidade técnico-funcional de

ambas as moléculas, como: capacidade espessante com aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica, estabilidade em pH baixo (meio gástrico) e capacidade de formar géis (Huichao et al., 2014; M. N. V. R. Kumar, 2000; Salvador, 2017; Teng, 2011).

A HPMC, apresentada na Figura 2, é um éter de celulose dispersível em água, portanto um hidrocoloide (Osorio et al., 2011). A HPMC é um polímero com notável aplicação no desenvolvimento de sistemas gastrorretentivos, sendo também capaz de formar poros na estrutura que está contida (Auriemma et al., 2018). Comumente, este polímero é misturado com fármacos em cápsulas hidrodinamicamente balanceadas. O invólucro da cápsula se dissolve em contato com a água e a mistura intumescce formando uma camada gelatinosa espessa (Nayak et al., 2010).

Os referidos sistemas gastrorretentivos desenvolvidos a partir de QS e HPMC devem veicular e liberar eficientemente no estômago uma molécula que apresente notável ação farmacológica contra úlceras, como é o caso da curcumina apresentada na Figura 3.

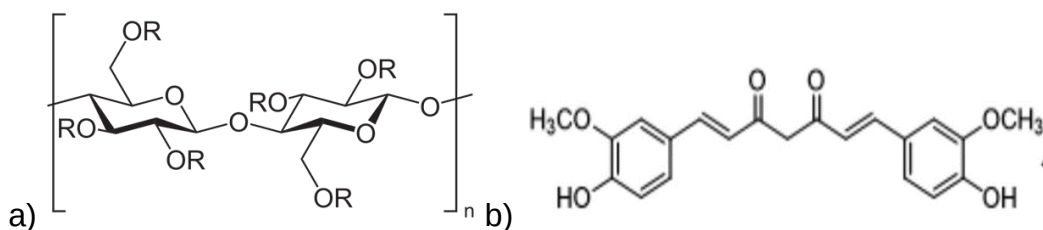


FIGURA 2. ESTRUTURAS MOLECULARES A) HIDROXIPROPILMETILCELULOSE E B) CURCUMINA.

Fonte: (Sharma et al., 2005; Wypych, 2012)

A curcumina é um composto polifenólico de baixa massa molar (367,37 g.mol⁻¹) encontrado no rizoma da planta *Curcuma longa* Linn, um vegetal de origem indiana. A curcumina é uma dicetona que existe em equilíbrio ceto-enólico com seu tautômero, oficialmente denominada de (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (Sharma et al., 2005). Diversos estudos investigaram e

comprovaram uma vasta gama de atividades biológicas relacionadas com a curcumina: antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antiparasitária, antiviral, tratamento de Alzheimer e ação anti-*H.pylori* (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014). Em uma busca realizada na base de dados google acadêmico, utilizando o termo *antiulcer curcumin*, foram encontradas 1160 publicações entre os anos de 2020 e 2021. Uma busca refinada pelo número de citações, o trabalho realizado por (Chattopadhyay *et al.*, 2004) reforça sua ação antiúlcera.

De *et al.* (2009) demonstraram que a curcumina dissolvida em dimetilsulfoxido (DMSO) pode erradicar a infecção por *H. pylori*, em ratos, após tratamento por 7 dias, mesmo das cepas resistentes ao tratamento convencional, sem apresentar evidências de toxicidade para os animais. Adicionalmente, análises histológicas mostraram que a curcumina também exibiu ação no reparo do tecido lesado e elevada ação antiinflamatória, relacionada a cicatrização da úlcera. Contudo, o mesmo estudo evidenciou a necessidade de elevadas concentrações do ativo natural para inibição destes microrganismos, fato relacionado à baixa disponibilidade da molécula graças à reduzida solubilidade em água e ao pouco tempo de contato na região devido às variações no tempo de retenção gástrica, condições que podem ser contornadas com o uso de sistemas gastrorretentivos. Associado aos sistemas gastrorretentivos surge a possibilidade de conjugação da molécula de curcumina com a quitosana objetivando o aumento da solubilidade desta biomolécula melhorando ainda mais a eficiência das micropartículas (Saranya *et al.*, 2018)

Dada a relevância científica e epidemiológica dos impactos dessa infecção e das suas repercussões patológicas (gastrite, úlceras e câncer gástrico), o desenvolvimento de micropartículas gastrorretentivas mucoadesivas, contendo curcumina, obtidas por meio da reticulação por TPP, quitosana e HPMC, representa uma importante estratégia tecnológica para o tratamento de doenças gástricas. Espera-se que nestes sistemas, o contato entre a superfície da mucosa gástrica, negativamente carregada, e a quitosana (policatiônica) e o HPMC hidratado, favorecerão a interação entre ambas as superfícies garantindo a adesão da micropartícula à mucosa gástrica, em que o fármaco será liberado.

Em face ao exposto, sistemas gastrorretentivos baseados em QS e HPMC contendo curcumina devem representar uma importante plataforma tecnológica para o tratamento de lesões gástricas. O desenvolvimento e estudo deste sistema liberação farmacêutica pode servir de base para a veiculação de outras moléculas com objetivo de tratar diversas doenças principalmente do TGI, mas não exclusivamente destes órgãos.

1.2. Curcumina

Classificado como um composto difenólico, apresenta na sua estrutura molecular três grupos químicos: dois sistemas de anéis aromáticos contendo grupos o-metoxifenólicos, conectados por um ligante de sete carbonos que consiste em um α,β -insaturado com uma porção β -dicetona. O momento dipolar calculado da curcumina no estado fundamental é 10,77 D. É uma molécula hidrofóbica com um valor logP de $\sim 3,0$. É quase insolúvel em água e prontamente solúvel em solventes polares como DMSO, metanol, etanol, acetonitrila, clorofórmio, acetato de etila, etc. É moderadamente solúvel em ciclohexano e hexano. O espectro de absorção da curcumina possui duas fortes bandas de absorção, uma na região do visível com máximo variando de 410 a 430 nm e outra banda na região do UV com máximo na região de 265 nm. O coeficiente de extinção molar da curcumina em metanol é $55.000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 425 nm. A curcumina é um ácido de Brønsted fraco, com três prótons lábeis e, conseqüentemente, três pKas foram estimados correspondendo a três equilíbrios prototrópicos (Priyadarsini, 2014)

A curcumina existe em meios líquidos, em equilíbrio entre as formas ceto e enólica, sendo que em solução predomina a forma enólica, podendo ser degradada em meios aquosos com pH alcalinos. Ambos NMR e espectrometria de absorção foram usados para estimar o pKa. O primeiro pKa na faixa de pH de 7,5 a 8,5 muda a curcumina de amarelo para vermelho.

A reatividade química e solubilidade da curcumina aniônica, ou seja, na faixa de pH básico, aumenta e esta forma de curcumina é mais solúvel em água do que a forma neutra (Priyadarsini, 2014).

Tem sido usada por séculos no oriente devido às suas propriedades farmacológicas e é também utilizada como corante alimentício. As principais alegações farmacológicas da curcumina estão relacionadas aos efeitos

antioxidantes, antiinflamatórios, antiapoptóticos, antiulcera anticâncer(Chattopadhyay et al., 2004).

Apesar de exibir grande biofuncionalidade, a biodisponibilidade oral da curcumina é considerada muito baixa, principalmente devido à má absorção e metabolismo intestinal e hepático rápido / extenso, embora o metabolismo intestinal possa ser maior que o hepático em humanos (Anand et al., 2007; Yang et al., 2008; Ireson et al., 2002). A curcumina é classificada como uma molécula de classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica com base na sua fraca solubilidade aquosa (11 ng / ml em tampão aquoso pH 5) e permeabilidade através das células epiteliais intestinais (12-14) (John et al., 2013). Mesmo com doses muito grandes (ou seja, várias quantidades de gramas), os níveis séricos de curcumina têm frequentemente estado abaixo dos limites de detecção, portanto, o cálculo de muitas propriedades farmacocinéticas em humanos permaneceu difícil e dados farmacocinéticos muito limitados estão disponíveis para humanos (Anand et al., 2007; Vareed et al., 2008). No entanto, alguns dados farmacocinéticos foram coletados para os metabólitos conjugados da curcumina (Vareed et al., 2008)

A degradação da curcumina é favorecida, em meios líquidos, à medida que o pH aumenta e em presença de luz solar. O principal grupo alvo da degradação da curcumina é a região diceto. Apesar de a literatura mostrar que a taxa com que essa degradação ocorre é elevada (90% em 30 min), algumas condições devem ser levadas em consideração. À medida que a concentração da curcumina no meio aumenta, essa taxa torna-se consideravelmente reduzida com a associação da curcumina a lipídios, lipossomas, albuminas, ciclodextrina, cucurbiturilo, tensoativos, polímeros e muitos outros sistemas macromoleculares e micro-heterogêneos. Entretanto, a fotodegradação da curcumina leva à formação de compostos como: *trans*-6(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal, aldeído ferúlico, ácido ferúlico, feruloilmetano e vanilina, que também apresentam atividade biológica (Priyadarsini, 2014; Vareed et al., 2008).

Apesar das suas propriedades biológicas, a curcumina é uma molécula bastante instável em certas condições. A degradação sofrida por fotólise é mais problemática e pode levar a uma elevada degradação da curcumina, sendo necessário protegê-la da luz. Os produtos de degradação iniciais são formados após

5 minutos e o padrão cromatográfico obtido após 28 h em pH 8,5 é representativo para a degradação alcalina (Tønnesen & Karlsen, 1985)

A curcumina pode sofrer reações reversíveis e irreversíveis, impactando diretamente sobre as suas propriedades biológicas. Também é instável, sofrendo fotólise e degradação em meios alcalinos. Em pH <1, as soluções aquosas de diferuloilmetano apresentam uma cor vermelha que indica a forma protonada (H₄A⁺). Na faixa de pH de 1-7, a maioria das espécies de diferuloilmetano está na forma neutra (H₃A). A solubilidade em água é muito baixa nesta faixa de pH e as soluções são amarelas. Em pH > 7,5, a cor muda para vermelho. Os valores de pK_a para a dissociação dos três prótons ácidos no composto 1 (formas H₂A⁻, HA²⁻ e A³⁻) foram determinados como sendo 7,8, 8,5 e 9,0, respectivamente (Tønnesen & Karlsen, 1985)

Os principais componentes da coloração da curcumina não são particularmente estáveis à luz, especialmente em soluções. Após a fotoirradiação do composto, um produto de ciclização foi detectado, bem como produtos de decomposição, como ácido vanílico, vanilina e ácido ferúlico (Sasaki et al, 1998). Deste modo, quando se objetiva desenvolver formulações veiculando curcumina, tais sistemas devem ser projetados para maximizar a sua solubilidade e permeabilidade, bem como atentar-se com a sua instabilidade diante da luz e de valores de pH alcalinos.

1.3. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

A celulose é o polissacarídeo mais disponível na natureza e apresenta uma vasta gama de aplicações nos mais diversos campos.

Apesar da sua grande versatilidade, esbarra na limitação de que não se dispersa em água. Assim, muitas modificações em sua estrutura foram realizadas com intenção de se obter derivados solúveis em água, bem como com propriedades físico-químicas diferentes do biopolímero original (Sarode et al., 2013).

A celulose e seus derivados são conhecidos por apresentarem propriedades de mucoadesão. São usados em vários tipos dessas formulações, tais como formulações bucais, oculares, vaginais, nasais e transdérmicas, sozinhas ou com combinação de outros polímeros (Al-Ani et al., 2019). Os éteres de celulose usados mais recentemente em sistemas mucoadesivos incluem éteres de celulose não iônicos, tais como etilcelulose (EC), hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose (HPC), metilcelulose (MC), carboximetilcelulose (CMC) ou hidroxilpropilmetilcelulose (HPMC). Dentre tantas modificações que outrora apresenta grande aplicabilidade na área farmacêutica destaca-se a HPMC (Knopp et al., 2016).

HPMC pode apresentar funções diferentes em formulações, dentre elas agente dispersante, emulsificante, espumante, solubilizante, estabilizador, agente suspensor (0,25-5%) e espessante (0,25-5%). Além disso, HPMC pode ser aplicado como um agente de liberação controlada e de liberação sustentada (Chadha & Bhandari, 2014).

HPMC, ou comercialmente conhecido como Hipromelose[®] é um derivado semissintético da celulose, classificado na família dos éter substituídos da celulose. Pode ser classificado de acordo com o grau de substituição em relação aos grupos metil (**MS**) e grupos hidroxipropil (**DS**). A nomenclatura dos diferentes HPMC é comumente informativa quanto ao seu grau de substituição, utilizando-se quatro dígitos após o seu nome, os dois primeiros dígitos são para designar o percentual de grupos metoxil (OCH₃) e os dois segundos representam o percentual de grupos hidroxipropil (OCH₂CH(OH)CH₃), assim: hipromelose 2208, hipromelose 2906, e hipromelose 2910. Essas variações no grau de substituição e de massa molecular impactam diretamente sobre as propriedades de dispersibilidade, temperatura de

geleificação térmica em solução aquosa, intumescimento, difusão e taxa de liberação do fármaco (Wypych, 2012).

HPMC é um material de matriz amplamente utilizado em sistemas de administração oral controlada e as matrizes de HPMC mostram padrão de liberação sustentada por dois mecanismos, isto é, difusão e erosão da camada de gel. (Siepmann et al., 1999)

Os polímeros HPMC para a fabricação de sistemas de matriz hidrofílica estão disponíveis em vários graus de viscosidade que variam de 4000–100.000 mPa s. A viscosidade do polímero afeta a via de difusão. HPMC pode ser empregado como uma matriz para controlar a liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Está sendo usado em comprimidos bucais de pentazocina e sistemas gastrorretentivos e sistemas de liberação cólon-específicas (Al-Tabakha, 2010; Caraballo, 2010).

HPMC também é amplamente utilizado em formas farmacêuticas orais sólidas, como aglutinante, em revestimento de filme e como matriz de liberação controlada.(Aulton & Taylor, 2017). Muitas vezes é o polímero de escolha na preparação de comprimidos de matriz hidrofílica devido à sua rápida formação de uma camada de gel forte e viscosa, que protege a matriz da desintegração e controla a taxa de liberação do medicamento.

1.4. Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo, comercialmente obtido pela desacetilação da quitina. Ainda que a maior parte da quitosana utilizada seja derivada de uma reação de desacetilação de um polissacarídeo precursor, a quitosana é um biopolímero e não deve ser classificada como um material semissintético, visto que é também encontrada em algumas espécies de leveduras e fungos filamentosos que contêm complexos de glucana com quitina ou quitosana em suas paredes celulares e septos (Kumari & Kishor, 2020; Muzzarelli et al., 2012).

Estruturalmente, a quitosana é formada por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, a primeira em menor número do que a segunda, ligadas por ligações glicosídicas (Ferreira et al., 2020).

Do ponto de vista físico-químico, as propriedades da quitosana são regidas, majoritariamente, pelo tamanho e a proporção das unidades monoméricas presentes

na cadeia deste biopolímero. Segundo Rinaudo (2006), relaciona-se três parâmetros como fundamentais a se considerar quando se deseja entender o comportamento da quitosana. O primeiro é a massa molecular (M_w), que está relacionada diretamente ao tamanho da cadeia polimérica e o segundo é o grau de desacetilação (GD), que se relaciona com a proporção dos grupos amina em relação aos grupos acetamida. A terceira propriedade é derivada das duas anteriores, que é a sua solubilidade em meio aquoso apenas quando estão acidificados (Rinaudo, 2006).

Devido à elevada presença de grupos amino na sua estrutura molecular, a quitosana comporta-se como uma base fraca ($pK_a < 6,5$), em meios aquosos acidificados, sendo capaz de atuar como umceptor de prótons (H^+). Quando protonados, os grupos amino exibem elevada densidade de cargas elétricas positivas. Isso promove uma repulsão eletrostática entre as cadeias antes associadas por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares e as unidades monoméricas dentro da mesma cadeia, sem que ocorra rompimento das ligações glicosídicas. A redução do número de interações inter- e intracadeias, por meio da ligação de hidrogênio, favorece um estado de maior liberdade configuracional da cadeia polimérica no meio, bem como de liberdade conformacional dos grupos químicos laterais e unidades monoméricas, favorecendo o estabelecimento de novas ligações de hidrogênio e interações do tipo íon-dipolo com as moléculas de água da sua vizinhança, culminando em última instância na dispersão e distensão da cadeia polimérica no meio. (Shariatnia, 2019)

A quitosana, além de ser um polímero de natureza catiônica, é também atóxica, biocompatível, biodegradável e apresenta uma vasta gama de atividades biológicas, dentre elas mucoadesivas, hemocompatíveis, biodegradáveis, apresentando propriedades antitumorais, antioxidantes e antimicrobianas. Além das propriedades biológicas, a quitosana é um biopolímero com grande aplicabilidade tecnológica, sendo amplamente utilizada como adjuvante no tratamento de água, clarificante de bebidas, excelente *scaffolds* de polímero em virtude de propriedades como alta porosidade, distribuição de tamanho de poro apropriada, alta área de superfície, não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e integridade estrutural com propriedades mecânicas adequadas. Quitina e seus derivados também têm sido usados para tratamento de queimaduras e curativos devido às suas propriedades únicas, como resistência, biocompatibilidade e permeabilidade ao

oxigênio e dentro do campo farmacotécnico a quitosana se destaca como um precioso polímero usado para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

A liberação controlada de fármacos é uma estratégia bastante interessante para regular a taxa de liberação e, portanto, aumentar a eficiência, segurança e qualidade dos medicamentos. Adicionalmente, é uma estratégia útil para a veiculação de fármacos pouco solúveis. Vários polímeros degradáveis naturais e sintéticos são usados para atingir este propósito (Ghadi & Dand, 2017)

A quitosana, sendo um polímero não absorvível e não tóxico, pode ser usada para encapsulação de fármacos isoladamente ou pode ser associada covalentemente ou não com outros polímeros, e assim alcançar diferentes perfis de liberação. Além disso, a quitosana também é favorecida na distribuição de medicamentos por causa das propriedades antiúlcera e antiácida, que ajudam na prevenção da irritação por medicamentos (Ito et al., 2000). O DA e o peso molecular da quitosana influenciam a hidrofobicidade e solubilidade e, portanto, são capazes de afetar a encapsulação do fármaco (Bozkir & Saka, 2004). A quitosana pode ser modificada de forma diferente para torná-la um veículo de entrega de fármacos mais eficiente, como a quitosana carregada com 5-fluorouracila (Santos, 2019).

1.5. Micropartículas poliméricas como sistema de entrega de fármacos.

Os polímeros apresentam uma vasta gama de propriedades tecnológicas. Nesse cenário, biopolímeros como o HPMC e a quitosana têm sido exaustivamente estudados como polímeros formadores de sistemas de entrega de fármacos, devido às suas propriedades físico-químicas e em certo ponto biológicas.

O avanço da tecnologia farmacêutica e da química supramolecular tornou possível contornar situações problemáticas, que até meados dos anos 70 eram impossíveis com os sistemas farmacêuticos convencionais. O advento dos sistemas de liberação vetorizados, capazes de liberar os fármacos em condições ambientais específicas, tornou possível delinear e projetar formas farmacêuticas capazes de serem efetivas e proporcionar tratamentos cada vez mais específicos (Benita, 2005).

Um exemplo dessa revolução é o caso de tratamento de doenças ou condições patológicas que afetam órgãos específicos de maneira localizada, como é o caso de lesões em mucosas, e em alguns órgãos como gastrites e úlceras

estomacais. Essas condições atualmente podem ser tratadas localmente sem necessidade do uso de medicamentos sistêmicos, evitando efeitos adversos ou colaterais. Tratamentos direcionados à doenças do estômago ainda é problemático, pelo curto tempo de esvaziamento gástrico, demandando uma forma farmacêutica que possa permanecer neste órgão por tempo suficiente para atuar localmente. Adicionalmente o uso de fármacos de baixa solubilidade ainda é uma problemática a ser contornada nesse caso (Hou et al., 2014).

Para contornar essas limitações, o uso de micropartículas é uma importante estratégia a ser explorada. As micropartículas são versáteis e dependendo da formulação, elas podem ser incorporadas em diferentes formas farmacêuticas como sólidos (cápsulas, comprimidos, sachês), semissólidos (géis, cremes, pastas) ou líquidos (soluções, suspensões, e até parenterais). (de Souza et al., 2020; de Souza Soares et al., 2019; Ferreira et al., 2020)

As micropartículas estão geralmente na faixa de tamanho de 1 a 1000 μm , servem como sistemas de liberação de fármacos multiunidades com benefícios fisiológicos e farmacocinéticos bem definidos, a fim de melhorar a efetividade, segurança e qualidade (M. P. Desai et al., 1996; Gupta et al., 2012; McClements, 2018).

Alguns parâmetros relacionados às micropartículas são considerados como parâmetros críticos de qualidade e devem ser conhecidos e priorizados quando se pensa em caracterizar uma micropartícula. O tamanho da partícula e a sua esfericidade estão relacionados, sobretudo, à área de contato disponível e à reprodutibilidade do processo de liberação. Com relação ao tamanho, as MPs acima de 100 μm apresentam-se vantajosas diante das nanopartículas, por não serem capazes de atravessar barreiras biológicas, sendo deste modo menos tóxicas e podendo atuar localmente. Em alguns casos em que as partículas obtidas apresentam tamanho de 1-10 μm , o tamanho influencia diretamente sobre a biodisponibilidade, sendo ligada à internalização através dos enterócitos evitando o metabolismo de primeira passagem (Desai et al., 1996; Eldridge et al., 1989). Para formas farmacêuticas projetadas para ação local no estômago, o reduzido tamanho pode ser benéfico para o caso desses sistemas poderem se alojar nos espaços das vilosidades estomacais e penetrar no muco (Lengyel et al., 2019).

As MPs podem apresentar-se de diversos tipos, como microcápsulas e microesferas. Uma estrutura clássica de microesferas contém o fármaco sólido ou líquido disperso ou dissolvido em uma matriz polimérica (McClements, 2018).

As microcápsulas são reservatórios de tamanho micrométrico, cercados por uma parede que é capaz de controlar a liberação do reservatório (Wong et al., 2018)

As micropartículas poliméricas apresentam geralmente mecanismo de liberação mediado pela difusão do fármaco pela rede polimérica ou através dos poros preenchidos com fluido. Para o caso dos fármacos solúveis em água, além destes mecanismos, é possível que essas moléculas se dissolvam nas redes de poros aquosos. A absorção de líquido faz com que as cadeias de polímero intumescam, indicando a formação de novos poros e / ou aumentando a pressão osmótica. Durante o intumescimento, o volume aumenta, a difusão do fármaco é aumentada e mais moléculas de fármaco migram para a fase líquida. Outro mecanismo possível é a erosão da matriz de polímero, liberando pedaços da forma farmacêutica no local (desintegração)(Siepmann et al., 1999; Siepmann & Peppas, 2012; Streubel et al., 2006).

Alguns dos métodos utilizados para a produção das MPs é a geleificação ionotrópica e a liofilização. A liofilização é usada com sucesso na microencapsulação de fármacos termolábeis. O processo consiste no congelamento, sublimação, secagem primária e secagem secundária. O processo promove a solidificação que então permite que as partículas sejam reconstituídas e facilmente reidratadas em uma solução aquosa e em muitos casos também promove a amorfização do fármaco (Jennings, 1999; Schwegman et al., 2005).

A geleificação ionotrópica é um processo físico-químico que envolve a interação entre um polieletrólito (quitosana) e um agente reticulante de carga oposta (tripolifosfato - TPP). É uma técnica utilizada para a produção de sistemas poliméricos multi-unidades. Tais sistemas apresentam-se como esferas, e são caracterizados por um diâmetro que pode variar entre alguns μm e alguns mm . A possibilidade de usar polímeros carregados eletricamente como quitosana, para formar a rede gel, e poder aprisionar e/ou interagir com outros polímeros como a HPMC, bem como aprisionar fármacos na estrutura do gel, abre precedentes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas com propriedades que auxiliam a sua

permanência no local de ação (mucoadesão), bem como alterar o perfil de liberação do fármaco (Joshi, 2011).

Deste modo, o uso de sistemas farmacêuticos de liberação controlada, capazes de aderir à mucosa gástrica, capazes manter uma liberação de fármaco a uma taxa menor, constante e contínua, é uma alternativa a ser explorada e aprimorada.

Como já foi mencionado, alguns polímeros apresentam capacidade de aderir às mucosas, sendo chamados mucoadesivos. A quitosana e o HPMC são polímeros adesivos e a quitosana, por se dispersar apenas em meios ácidos, como é o caso do ambiente gástrico, é capaz de proteger o fármaco em meios não ácidos, liberando-o apenas em condições ácidas.

1.6. Quality by design (QbD)

O uso de ferramentas que promovam o desenvolvimento racional de um medicamento já é uma preocupação por parte dos órgãos sanitários internacionais, como o Food and Drug Administration (FDA). O uso de QbD permite o completo conhecimento acerca de como as variáveis de síntese e de produção impactam sobre as características de qualidade do produto, garantindo medicamentos seguros, eficientes e de qualidade. Trata-se de uma abordagem sistemática do desenvolvimento, que inicia com objetivos pré-definidos e dá ênfase à compreensão do produto e do processo e ao controle deste, com base na ciência e no gerenciamento de riscos de qualidade (Guideline & others, 2009).

Segundo as normas do ICH 8 (R2), para o desenvolvimento de um novo produto baseado em QbD alguns parâmetros mínimos devem ser observados:

- Definir o perfil de qualidade do produto alvo (PQPA) no que se refere à qualidade, segurança e eficácia, considerando, por exemplo, a via de administração, forma de dosagem, biodisponibilidade e estabilidade;
- Identificar potenciais atributos críticos de qualidade¹ (ACQ) do medicamento, de forma que as características do produto com impacto na qualidade do produto possam ser estudadas e controladas;

- Determinar os atributos críticos de qualidade da substância medicamentosa, excipientes, e selecionar o tipo e a quantidade de excipientes para fornecer o medicamento com a qualidade ou propriedade desejada;
- Selecionar o processo de fabricação adequado;
- Definir uma estratégia de controle.

Uma estratégia viável para lançar mão da abordagem *quality by design* para desenvolvimento de novos produtos é atentar-se a cinco aspectos importantes: a escolha adequada de projetos experimentais, otimização precisa com auxílio de computador, desenvolvimento metódico de produtos farmacêuticos, definição precisa do espaço de design e controle, identificação de atributos críticos de qualidade/ variáveis resposta (CQAs), atributos críticos de formulação (CFAs) e parâmetros críticos de processo (CPPs) (Soni et al., 2020).

Um parâmetro crítico de processo é aquele cuja variabilidade tem impacto em um atributo crítico de qualidade e, portanto, deve ser monitorado ou controlado para garantir que o processo produza a qualidade desejada. Atributo crítico da qualidade é uma propriedade ou característica física, química, biológica ou microbiológica que deve estar dentro de um limite, faixa ou distribuição apropriada para garantir a qualidade desejada do produto (Guideline & others, 2009)

A observância a estes elementos permite a compreensão de todo o processo produtivo e os impactos sobre a qualidade final do produto obtido. A compreensão técnica do processo reduz as variabilidades no desempenho, torna mais fácil a resolução de problemas e possibilita a realização de alterações no processo dentro de um espaço de trabalho definido sem alterações indesejadas na performance do sistema farmacêutico desenvolvido.

A noção de espaço de trabalho introduzida pelo desenvolvimento farmacotécnico envolvendo a abordagem QbD, vem de um conceito importante, que é o de espaço de design. O espaço de design é a combinação multidimensional e interação de variáveis de entrada (por exemplo, atributos de materiais) e parâmetros de processo que foram demonstrados para fornecer garantia de qualidade. Trabalhar dentro do espaço de design não é considerado uma mudança. O movimento para fora do espaço de design é considerado uma mudança e

normalmente iniciaria um processo de mudança pós-aprovação regulatória (Guideline & others, 2009).

Para a determinação do espaço de design e parâmetros críticos de produção e materiais, a abordagem QbD utiliza ferramentas estatísticas como design de experimentos - DoE (Robinson, 2010; Togkalidou et al., 2001). Trata-se de uma importante ferramenta para a quantificação do efeito das variáveis de entrada sobre o produto sendo uma eficiente estratégia para o planejamento e desenvolvimento de sistemas farmacêuticos, de modo racional e sistematizado.

Com o uso dessa valiosa ferramenta estatística é possível avaliar todos os fatores envolvidos no processo simultaneamente, de forma sistemática e rápida. Seu uso demanda a aplicação de estatística experimental, geração de equações matemáticas e resultados gráficos, retratando um quadro completo de variação de resposta (s) em função do (s) fator (es) e com a análise adequada traz informações acerca das melhores condições de um processo, método e produto. Os primeiros estudos utilizando planejamento estatístico para obtenção de sistemas farmacêuticos datam de 1967 (B. Singh et al., 2005). A sua aplicação na indústria farmacêutica tem sido lenta, apesar de nos últimos anos ser estimulada e recomendada pelo ICH, FDA e EMEA (B. Singh et al., 2011).

É importante salientar que o QbD pode ser aplicado a moléculas pequenas e grandes, a substâncias e medicamentos, a vacinas, a produtos combinados, a todo ou partes de um processo, a novos medicamentos ou a genéricos (Schlindwein & Gibson, 2018). Deste modo, foram elencados os principais atributos críticos que impactam sobre a formação e desempenho das MPs, como é mostrado no diagrama mostrado no Anexo I, em materiais anexos.

Compreender a ciência que sustenta um produto e seus riscos associados ajuda a priorizar o que é importante para a fabricação e, portanto, normalmente leva a ganhos de eficiência e custo-benefício.

2. Objetivos

Desenvolver micropartículas gastrorretentivas mucoadesivas, utilizando QS e HPMC como matriz e curcumina como fármaco e avaliar sua performance *in-vitro* e *in-vivo* em modelo de úlcera gástrica.

2.1. Objetivos específicos.

- ;
- Desenvolver e otimizar micropartículas gastrorretentivas por meio de DoE e QBD, utilizando método de geleificação ionotrópica da quitosana contendo curcumina e HPMC, utilizando TPP como *crosslinker*;
- Caracterizar as micropartículas quanto ao tamanho, forma, EE%, capacidade de absorção de líquidos;
- Revalidar método analítico por HPLC para quantificar curcumina;
- Avaliar a mucoadesividade das micropartículas *in vitro*;
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* de curcumina a partir das micropartículas;
- Avaliar a atividade das micropartículas *in vivo* diante de modelo de úlcera.

3. Materiais e Métodos

3.1. Principais Materiais:

-Reagentes e Solventes

Quitosana (baixo e médio peso molecular) (Sigma-Aldrich)

Hidroxipropilmetilcelulose 2910 (HenriFarma)

Tipolifosfato de sódio (Synth)

Curcumina (Purifarma)

Ácido acético (Synth)

Ácido Clorídrico (Merck)

Tween 20 (Merck)

KBr (Synth)

Mucina (Sigma-Aldrich)

-Equipamentos e acessórios

Balança Analítica (Ohaus-AS200)

Agitador Magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a)

Barra magnética p/ agitação

Medidor de pH (Quimis Q-400M)

Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);

Agulha sem bisel

Seringa descartável

Funil de porcelana

Bomba de vácuo

Kitassato

Calorímetro Exploratório Diferencial (Mettler Toledo®)

Estufa modelo 702.780 (Quimis®, Brasil);

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Perkin Elmer, Brasil);

Coluna Zorbax C18 250 mm x 4.6mm, 5µm (Phenomenex, EUA);

Celular Iphone SE

Régua plástica

Placa de Pétri

Garra com suporte suspenso

Microscópio eletrônico de varredura

Gral e pistilo de Ágata

Pastilhador

Texturômetro (TA-XT2i Stable MicroSystems)

Espectrofotômetro FT-IR (Bruker)

Difratômetro de raios X Siemens®, modelo D5000

Dissolutor Hanson Research modelo New Hanson SR-8 Plus utilizando hastes com cestos (Aparattus I);

Filtros de PTFE 45 µm (Sigma-Aldrich)

Dispositivo de Enslin

3.2. Obtenção das MPs

3.2.1. Determinação da condição de obtenção das MPs

Dispersões poliméricas foram obtidas por meio da dispersão das massas de polímero mostradas na Tabela 1 em 20mL de solução aquosa (para HPMC) ou de ácido acético (2%) (para quitosana). Ambos os sistemas permaneceram sob agitação em temperatura ambiente por pelo menos 4h. Após completa dispersão, as dispersões foram misturadas na proporção de 1:1 v/v, totalizando 40 mL de

dispersão polimérica mista com concentração ácida de 1%, e as concentrações poliméricas sendo reduzidas à metade da concentração inicial.

TABELA 1. RELAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA DESENVOLVIMENTO DAS MPS, UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL.

Sistemas	Quitosana (m.v ⁻¹)*1	HPMC (m.v ⁻¹)*
S1	0,30	0,15
S2	0,60	0,45
S3	0,30	0,45
S4	0,60	0,15
S5	0,45	0,30
S6	0,60	0,30

(m.v⁻¹) corresponde ao g. em 20 mL

Quarenta mililitros das dispersões de S1 a S6 contendo os polímeros foram preparadas separadamente e permaneceram sob agitação em temperatura ambiente por pelo menos 24 h. Decorrido este tempo as dispersões foram misturadas e novamente permaneceram sob agitação por 2 h, em temperatura ambiente. Após completa dispersão, a mistura foi instilada sobre uma solução contendo TPP (2%) com ajuda de uma seringa e agulha sem bisel de 22 gauge. A solução de TPP, receptora, foi mantida sob agitação durante todo o processo. Após a última gota ser instilada, o sistema permaneceu sob agitação, por mais 5 min.

Para a secagem, as partículas foram filtradas em papel de filtro qualitativo, com auxílio de funil e bomba de vácuo. Foram lavadas com água e armazenadas em temperatura, pressão, umidade ambiente e mantidas em sacos plásticos, furados com auxílio de uma agulha de 22 gauge, por 48 horas. Alternativamente, empregou-se um método complementar/adicional de secagem, a liofilização, em que um grupo partículas foram previamente congeladas em freezer por 24h, a -20°C e, posteriormente, liofilizadas por 12 horas.

Após obtenção, as partículas permaneceram armazenadas em dessecador contendo sílica gel. A Figura 3 ilustra o processo detalhado da obtenção das MPs.

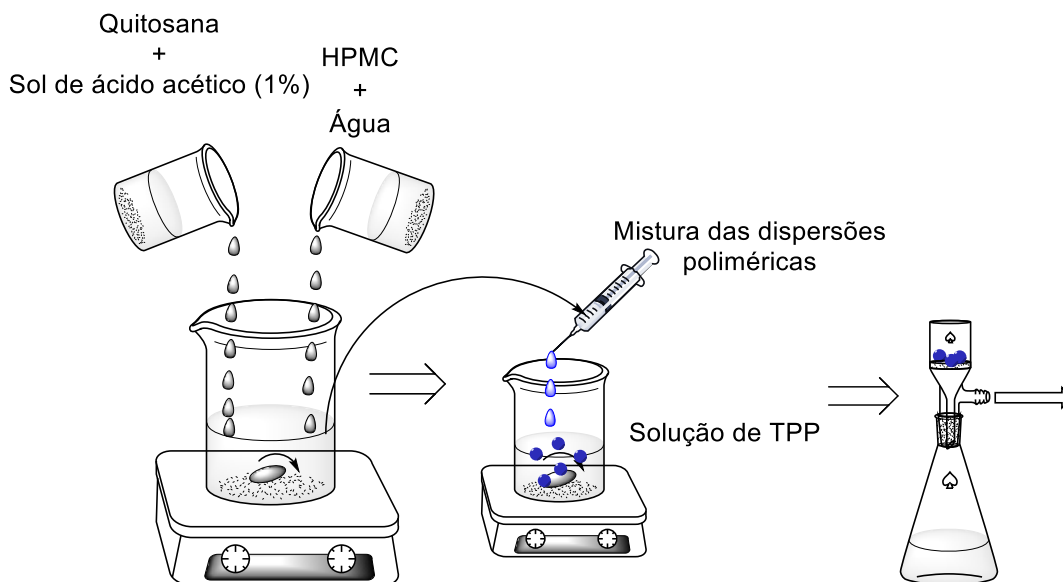


FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DAS MPS.

Após o processo de obtenção das MPs, o software Minitab® 18, foi utilizado como ferramenta para analisar um delineamento experimental supracitado, do tipo fatorial, com 2 fatores (HPMC e Quitosana 220KDa) e 3 níveis (concentrações de HPMC e quitosana). As concentrações definidas para os polímeros variaram de 0.3, 0.45 e 0.6 $g \cdot 20 mL^{-1}$ para a quitosana dispersa em solução de ácido acético na concentração 1% (vol/vol), e 0.15, 0.3 e 0.45 $g \cdot 20 mL^{-1}$ para o HPMC dispersa em água. A concentração de TPP utilizada foi de 2% (m/v) (K. G. H. Desai & Park, 2005).

Após a determinação das condições de obtenção das MPs com menor diâmetro possível, bem como a identificação dos fatores (estudados) que mais influenciaram sobre a formação e o seu tamanho, descritos na sessão delineamento experimental e otimização das MPs, objetivou-se otimizar e conhecer ainda mais fatores envolvidos nas características da formação dos sistemas e finalmente incorporar a curcumina.

3.2.2. Otimização das Micropartículas

A otimização das micropartículas foi realizada por meio de experimento fatorial completo 2^3 utilizando como variáveis concentração de TPP (1,5-3,0%), temperatura de obtenção (25-70°C) e Mw da quitosana (baixa 160KDa- média 220KDa), totalizando 8 experimentos realizados em triplicata

Na sessão material suplementar (material suplementar I) é possível visualizar a tabela de experimentos utilizada para a otimização dos sistemas.

Para incorporar a curcumina nas MPs, pesou-se uma massa equivalente a 2,5mg de curcumina por mL de dispersão polimérica. Essa massa de curcumina foi homogeneizada sob abrigo da luz, em temperatura ambiente, junto com o 1g de Tween-20, equivalente a 2,5 % m/v da dispersão polimérica. Após cerca de 20 minutos de agitação, a dispersão polimérica foi adicionada ao béquer contendo a curcumina dissolvida no Tween-20. O sistema permaneceu sob agitação por mais 30 minutos, antes de ser instilado na solução de TPP.

Para a formulação das amostras sem curcumina (branco), a mesma massa de Tween-20 foi adicionada à dispersão polimérica.

3.3. Caracterização das Micropartículas

3.3.1. Tamanho médio e circularidade.

Após a definição das melhores condições de formulação foram produzidas as partículas com e sem curcumina, secas pelo método de evaporação sob temperatura ambiente e sob evaporação sob temperatura ambiente somada à liofilização. A determinação do tamanho médio das partículas foi realizada utilizando fotografias, retiradas utilizando câmera de celular Iphone SE, a uma altura e inclinação padronizada (20 cm e 180°) e então analisadas, no software ImageJ. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, de um *pool* de MPs contendo 25 unidades amostrais.

3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A morfologia de superfície e da seção transversal das MP foi avaliada por MEV em microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi TM-3000 sob baixo vácuo,

sem metalização e com Aceleração de Voltagem Variável de 2.00kV. As amostras foram analisadas em aumentos de 50, 350 e 100 vezes. MP liofilizadas e não liofilizadas, contendo ou não curcumina, foram analisadas.

3.3.3. Revalidação da metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Segundo a RDC 166 de 2017, a revalidação de um método analítico consiste na repetição parcial ou total da validação de um método analítico e tem como objetivo assegurar que esse continua cumprindo com os requisitos estabelecidos.

O método validado e utilizado em nosso grupo de pesquisa para quantificação de curcumina foi desenvolvido e validado por Fonseca-Santos et al. (2017) e vem sendo revalidado e continuamente utilizado, logo, optou-se pela revalidação.

Os parâmetros analisados foram: seletividade, linearidade, exatidão e precisão.

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias. A seletividade foi determinada por meio da injeção de todos os componentes juntamente com o analito (curcumina), com objetivo de identificar alguma interferência sobre o tempo de retenção da curcumina.

A faixa linear de trabalho foi obtida por meio da produção de três curvas de calibração. Para a obtenção das curvas, a curcumina foi diluída em metanol nas concentrações de [0,924; 1,848; 3,85; 6,41; 15,4; 23,1 µg.mL⁻¹], partindo-se de uma solução estoque na concentração de 61,6 mg.mL⁻¹. Todas as amostras foram filtradas empregando membrana com 0,45 µm.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir dos dados obtidos das curvas padrão, através das equações 2 e 3 (Ribani et al., 2004; Wichitnithad et al., 2009):

$$LD = (DPa \times 3) / IC \text{ (eq. 2) e } LQ = (DPa \times 10) / IC \text{ (Eq. 3)}$$

Onde: DPa = desvio padrão médio do intercepto de três curvas padrão.

IC = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como referência. A análise da exatidão foi realizada por meio de ensaios de recuperação, sendo essa realizada em três diferentes concentrações, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método [0,924; 3,85; 23,1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$].

O estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado.

As amostras dos sistemas brancos foram preparadas e adicionadas de três concentrações diferentes de curcumina, a menor concentração da curva, a média e a mais alta. Após a adição, o material permaneceu em repouso por 60 minutos e então foi adicionado um volume de 5mL de metanol e as partículas foram destruídas por ação da solubilização em metanol e agitação com ultraturrax. As amostras foram filtradas e analisadas.

O parâmetro precisão foi avaliado a partir da análise de 3 amostras de concentrações conhecidas e em diferentes concentrações 0,924 $\mu\text{g/mL}$, 6,416 $\mu\text{g/mL}$ 23,1 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram realizados em dias diferentes, por analistas diferentes, porém com o mesmo equipamento.

3.3.4. Análise de interações via espectroscopia na região do infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR).

As amostras foram homogeneizadas numa proporção 1:10 de KBr, o qual foi previamente desidratado em estufa. As partilhas foram obtidas por meio da compressão direta da mistura dos pós (as MPs foram pulverizadas). O experimento foi realizado, por meio de 48 análises e os resultados plotados no intervalo de número de onda de 400-4000 cm^{-1} .

3.3.5. Difração de Raios-X

Para analisar as amostras, lançou-se mão de difratômetro de raios X Siemens®, modelo D5000, com velocidade do goniômetro de 0,05°/s, sob radiação de Cu-K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) e com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 70°.

A análise dos difratogramas foi realizada utilizando-se os valores estimados para o ângulo de Bragg por meio da estimativa do tamanho do cristalito e o utilizando a equação de Scherrer que pode ser representada na equação 1.

$$d = k\lambda/\beta\cos\theta \quad (\text{Eq.1})$$

Onde, d é o diâmetro médio de cristalito; k é o (= 0.94) fator de forma, apresentado na literatura para este tipo de sistema fator dimensional; λ é o comprimento de onda para Cu-K α (=1,5406 $\text{\AA}$); β é a largura a meia altura do pico (FWHM); θ é o ângulo de Bragg.

Por meio do uso do software Origin 2016, foi possível identificar e ajustar modelos de Voigh para estimar a largura do pico à meia altura, tornando possível a realização dos cálculos.

3.3.6. Análises de termogravimétricas DSC/TG

As curvas de DSC (do inglês, *Dynamic Scanning Calorimetry*) foram obtidas a partir de 5 mg das amostras em equipamento TA Instruments DSC 2910, de 25 a

300 °C, sob atmosfera de nitrogênio (50 ml min⁻¹), taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, em placas de alumínio seladas.

A degradação térmica foi seguida usando equipamento TA Instruments 2960 SDT, na faixa de temperatura de 25-300 °C em referência de alumina aberta e recipientes de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 ml.min⁻¹) e uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹.

3.3.7. Eficiência de encapsulação e Teor

As micropartículas contendo curcumina, liofilizadas e não liofilizadas, foram trituradas em gral e pistilo e o pó foi precisamente pesado (10 mg), adicionado ao volume de 10 mL de metanol e mantidas sob agitação magnética (720 rpm) constante por 24 horas. Em seguida, para a extração completa da curcumina, as amostras foram trituradas em ultra-turrax (IKA), durante 2 min, centrifugadas, filtradas e a curcumina quantificada por HPLC, em triplicata.

Adicionou-se às dispersões poliméricas 2,5mg de curcumina /mL de dispersão. A EE foi (Eq. 4) é definida como a massa de curcumina quantificada (*m_q*) pela massa total de curcumina adicionada (adaptado de Meneguín et al., 2018), a qual corresponde à 2,5mg de curcumina para uma massa de partículas equivalente a 1mL de dispersão (78 MP pesando 25,6mg, depois de seco).

$$EE\% = (m_{cur} * 100\%) / 2.5mg \text{ (Eq. 4)}$$

O teor de curcumina contida nas MP foi calculado empregando a Equação 4 onde *m_{cur}* é a massa de curcumina quantificada em 25,6 mg de MP (equivalente a 1mL de dispersão polimérica) e o termo 2,5 mg é referente à massa teórica de curcumina em 1 mL de dispersão.

3.3.8. Absorção de Líquidos

Pesou-se, rigorosamente, uma massa (25 mg) de micropartículas (*m₀*) que foi disposta sobre a placa de vidro sinterizada do funil do dispositivo de Enslin adaptado e o sistema foi fechado com auxílio de filme de policloreto de vinila e papel alumínio. O volume de líquido absorvido pelas MP foi avaliado após 5, 15, 30, 45, 60 e 120

minutos. O fluido utilizado foi meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2) para simular o pH do ambiente estomacal (Meneguín et al., 2018; Meneguín, 2016).

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em volume de líquido absorvido por massa de amostra

$$\%LAm = (V/m) \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

3.3.9. Estudo de liberação *in vitro* da CUR a partir das MPs QS/HPMC e determinação das condições *sink* da curcumina no meio de liberação

A cinética de liberação de moléculas a partir de formulações farmacêuticas tem papel fundamental no estudo das características da fase biofarmacêutica de uma dose de medicamento após sua administração (Larsen et al., 2009).

O processo de liberação de um fármaco a partir de formulações farmacêuticas pode modular a absorção do fármaco nos vários compartimentos biológicos; além de ser possível, a partir destes dados, estimar a sua taxa de absorção e biodisponibilidade em fluidos biológicos (Wilson et al., 1989). Deste modo, o uso de abordagens capazes de controlar ou modificar o perfil de liberação do fármaco da forma farmacêutica, constitui uma importante estratégia para melhorar a performance de ativos pouco solúveis, como a curcumina.

O entendimento de como um fármaco é liberado a partir de uma forma farmacêutica é complexo por envolver variáveis fisiológicas, que podem ser analisadas em estudos *in vivo* ou *in silico*, e variáveis físico-químicas, que podem ser analisadas e controladas em estudos *in vitro*. As variáveis físico-químicas principais são: estruturas químicas, espessura das camadas poliméricas, a interação entre fármacos e matriz polimérica e o coeficiente de partição e difusão também podem afetar o perfil de liberação dos sistemas de liberação de fármacos (Mircioiu et al., 2019).

3.3.7.1. Determinação da solubilidade da curcumina em solução receptora -Condição *sink*.

O estudo da solubilidade do fármaco nos meios de eluição que mimetizam o local de aplicação é uma etapa fundamental a ser realizada antes dos ensaios de liberação *in vitro*. Isso porque os experimentos de liberação devem ser delineados utilizando composição e volume de meio que permitam 100% da dissolução/liberação da massa de fármaco testada. Caso contrário, o passo limitante

da liberação seria a solubilidade, e não a performance do sistema de liberação desenvolvido. Assim, a determinação da solubilidade permite o cálculo das condições *sink*. A condição *sink* corresponde ao volume de meio de dissolução capaz de dissolver entre 5 a 10 vezes a concentração de fármaco a que se pretende testar, a fim de que durante o teste de dissolução nunca se estabeleça o equilíbrio de concentração pela saturação da solução (Bettini, 1994).

Os experimentos realizados permitiram determinar a condição *sink* para meio gástrico simulado, composto por ácido clorídrico-cloreto de sódio (pH = 1,2) acrescido de 0,5% (m/v) de Tween 80 (Chanburee & Tiyaboonthai, 2017). Em seguida, adicionou-se uma quantidade em excesso de curcumina (10 mg em 10mL de meio), em triplicata, as amostras foram agitadas por 24 h, em temperatura ambiente (menor que a temperatura do experimento), centrifugadas (5000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante foi coletado, filtrado em membranas de PTFE (0,45 µm) e diluídas em metanol antes da injeção (100µL para um volume de 2 mL). Para as análises, a solução foi filtrada e analisada a partir do método analítico revalidado. As análises foram realizadas em triplicata (n=3).

3.3.7.2. Perfil de liberação *in vitro* da curcumina utilizando aparato I modificado (minicestos e cuba com volume reduzido).

Os ensaios de perfil de liberação *in vitro* da curcumina foram realizados para as MP liofilizadas e não liofilizadas contendo curcumina, em triplicata.

O estudo foi realizado em dissolutor SR-8 Plus Hanson Research®, aparato I adaptado (mini-cestos), adicionando uma massa de MPs equivalente à 4 mg de curcumina, 100mL de meio, sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Foi utilizado como meio de dissolução meio gástrico simulado contendo 0,5% (m/v) de Tween-20 para permitir a total liberação da curcumina no meio, com valor de pH de 1.2. O volume utilizado garantiu a condição *sink* para essas condições experimentais.

As coletas das alíquotas (2mL) foram realizadas em tempos pré-definidos ao longo de 24h, utilizando seringa, acopladas a hastes metálicas com altura de coleta calibrada, garantindo que todas as coletas fossem realizadas no mesmo ponto e altura da cuba. Todas as alíquotas coletadas foram filtradas imediatamente em filtro

de PTFE (0,45 μm) e armazenadas em recipientes do tipo *vial*, âmbar, mantidos em local escuro até o momento da análise, cerca de 20 min após a coleta (Meneguín et al., 2018).

3.3.10. Estudo de Mucoadesão *in vitro*

As MPs foram submetidas a avaliação de mucoadesividade para avaliação da força máxima de destacamento e o trabalho de mucoadesão, usando o Texturômetro TA-XT2i Stable MicroSystems (Reino Unido) equipado com dispositivo específico para avaliação de mucoadesão (Mucoadesão Rig A / MUC).

Para este estudo, foi utilizada uma sonda cilíndrica com 10 mm de diâmetro, onde foram fixadas cerca de 25 mg de cada MP, com auxílio de fita dupla face 3M®. O ensaio começou com a sonda descendo a uma velocidade de 0,5 mm s^{-1} até o contato das MPs com o disco de mucina, previamente umedecido em solução de ácido clorídrico 1N (de modo a simular as condições de ionização da mucina e MPs em ambiente gástrico). O contato entre as MPs e o disco de mucina foi de 60 s. Após este tempo, a sonda subiu, separando as MPs da superfície, e os parâmetros foram calculados através do gráfico obtido força *versus* tempo, onde a força máxima de desprendimento (N) se refere à força de adesão e a área sob a curva (N. s $^{-1}$) refere-se ao trabalho de adesão. As medições foram realizadas em quintuplicata para cada formulação e os resultados apresentados como média e desvio padrão

3.3.11. Ensaio de ação gastroprotetora *in-vivo*

3.3.11.1. Ulceração gástrica induzida por indometacina *in vivo*

Quarenta ratos *Wistar* machos, pesando 250-270g no início dos experimentos, foram alojados em uma sala com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) com livre acesso a comida e água em um ciclo claro / escuro de 12h. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP (CEUA / FCFAR 30/2020) e foram conduzidos de acordo com os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentos Animais (CONCEA), com base nas Diretrizes do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, o documento encontra-se nos Anexos deste manuscrito.

A indução de ulceração gástrica *in vivo* foi baseada em Lou e colaboradores (2018), Wu e colaboradores (2018) e Nabil e colaboradores (2021) com modificações. Os 64 animais foram pesados, avaliados quando a presença de lesões ou sinais de estresse e aleatoriamente designados a oito grupos:

- Controle positivo (Controle)- (Indometacina + iogurte);
- Omeprazol (OME) 40mg/Kg;
- Curcumina livre (CUR) 2mg/Kg;
- Micropartículas branco não liofilizadas (MPBr não liofilizadas) 33,3 mg/kg;
- Micropartículas branco liofilizadas (MPBr liofilizadas) 33,3 mg/kg;
- Micropartículas carregadas com CUR não liofilizadas (MP cur não liofilizadas) 33,3 mg/kg do sistema contendo 2 mg/kg de curcumina;
- Micropartículas carregadas com CUR liofilizadas (MP cur liofilizadas) 33,3 mg / kg do sistema contendo 2 mg / kg de curcumina;
- Controle negativo (iogurte)

Com 8 animais por grupo (quatro por gaiola).

Após o período de adaptação, de 4 dias, sendo alimentados com ração e água *ad libitum*. Após este período a água e a ração foram mantidas, mas deu-se início ao tratamento. Os animais receberam, por sete dias consecutivos, por via oral (gavagem), uma vez ao dia, seus respectivos tratamentos, exceto os controles positivo (iogurte e indometacina) e negativo (somente iogurte), que receberam iogurte como veículo (Vigor® Grego, sem sabor, Vigor Alimentos SA, São Paulo-SP, SUTIA). Após o último dia de tratamento, os animais foram mantidos em jejum sólido por 18h e indometacina 60mg / kg foi administrada por gavagem para todos os grupos, exceto o controle negativo. Após seis horas, os animais foram eutanasiados. O estômago dos ratos foi cuidadosamente removido e aberto ao longo da grande curvatura e lavado com solução salina.

As análises dos dados de atividade antiúlcera foram realizadas por meio da medida da área total da região ulcerada, com base na escala de Forrest, para

cada órgão (Forrest et al., 1974), utilizando o software ImageJ®. Os dados foram agrupados e analisados utilizando o software Minitab 16.

A análise consistiu em medir a área total da secção do órgão e depois o somatório das áreas com lesões ulceradas e então foi obtida a razão da área ulcerada pela área total. Após determinar o percentual de área lesionada, foram determinadas a presença de valores outliers, utilizando teste de Grubbs, e então foi realizada a análise estatística descritiva.

Durante a análise dos valores outliers, foram encontrados dois valores considerados outliers, que foram removidos do grupo de dados. A partir desse preparo de dados as análises de variância e comparação entre médias puderam ser realizadas (Anexos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das Micropartículas

4.1.1. Delineamento experimental e otimização das MPs

Partindo-se da metodologia descrita por Majekodunmi & Uzoaganobi (2017) modificada em nosso estudo piloto, foi adotada a concentração de 2% de TPP preconizada pela metodologia de Desai & Park (2005), sendo possível obter as primeiras micropartículas como resultado de um estudo piloto. Das concentrações relatadas na literatura consultada, e a partir de dados coletados em nosso estudo piloto (acima de 1,5% de quitosana equivalente a 0,45 g em 20 mL%), foi observado que a viscosidade das dispersões é um parâmetro importante a ser considerado, já que dispersões muito concentradas e, portanto, mais viscosas, não são passíveis de gotejamento, levando ao entupimento da agulha empregada.

MPs de quitosana foram obtidas por geleificação ionotrópica com o TPP, de acordo com metodologia descrita por Majekodunmi & Uzoaganobi (2017). No estudo realizado pelos autores supracitados, foi possível a obtenção das micropartículas, utilizando-se diferentes concentrações de quitosana e de solução reticulante. A geleificação da quitosana utilizando TPP ocorre pelo fato de que o polímero disperso em meios aquosos acidificados apresenta regiões positivas capazes de interagir com o TPP e estabelecer interações coulombicas, entrecruzando as cadeias poliméricas numa rede tridimensional gelatinosa. No entanto, as concentrações de TPP utilizadas pelos autores foram bastante elevadas (5%), bem como o tamanho das micropartículas maior que 1mm.

A formação das MPs apresenta alguns parâmetros críticos de formulação e de processo que podem impactar sobre a resposta ou parâmetros críticos de qualidade. Neste trabalho, foram considerados como parâmetros críticos de qualidade, inicialmente a formação de partículas esféricas e posteriormente a redução de tamanho das MPs. Por outro lado, como parâmetros críticos de formulação, elencou-se concentrações poliméricas, tipo de quitosana (Mw) e

concentração do agente reticulante, e como parâmetro crítico de processo, a temperatura de reticulação. Com a seleção destes parâmetros foi possível estimar o efeito de cada atributo de formulação e de processo sobre a qualidade da formulação, bem como estimar um modelo matemático e uma condição ótima para a formulação, tornando o sistema o mais funcional e efetivo possível.

Outros parâmetros críticos de processos devem ser considerados para o desenvolvimento deste tipo de formulação; entretanto, já apresentaram otimização em estudos anteriores concluídos pelo nosso grupo de pesquisa. Um deles é a altura adequada para o gotejamento, que foi previamente validado por nosso grupo, como uma altura de 20 cm sendo adequada para a formação de esferas com boa circularidade. De acordo com Meneguín et al. (2018), o gotejamento da dispersão a partir da altura adequada permite o desprendimento de uma gota com um formato esférico, e a esfericidade tem significativa influência nos processos de liberação do fármaco. Como a geleificação é um processo que ocorre relativamente rápido, apenas alguns segundos após o contato com a solução contendo reticulante, a forma da partícula produzida durante o contato com a superfície do líquido é mantida após a secagem. Por este motivo, o líquido é mantido em agitação, ainda que branda, para auxiliar a desestruturação o filme interfacial formado entre a gotícula e a água, reduzindo o efeito de achatamento na gota.

Por se tratar de uma molécula apolar, observou-se que ao adicionar a curcumina juntamente com as dispersões aquosas dos polímeros, havia a formação de uma suspensão com distribuição irregular do material e consequente sedimentação. Outro fator observado foi a formação de aglomerados de curcumina na dispersão polimérica. Com objetivo de contornar este problema, lançou-se mão do uso de um tensoativo com aplicação farmacêutica e alimentícia, e que pudesse ser capaz de auxiliar a manutenção da curcumina dispersa no meio.

Foram testados dois tensoativos, o Tween 20 e o Span 20, para contemplar tanto os tensoativos hidrofóbicos quanto os hidrofílicos, respectivamente.

O Tween 20 foi escolhido por formar micropartículas mais rígidas e por dispersar melhor a curcumina, já que se trata de um tensoativo mais hidrofóbico e, portanto, mais adequado para solubilizar moléculas apolares. Outra questão que foi levada em consideração foi o efeito estruturante observado sobre as partículas, o qual já havia sido reportado por (Nadzir et al., 2017) sobre a formação de niossomas mais rígidos em maior presença de Tween 20. (Kshitij & others, 2016) também observaram que ambos Span 20 e Tween 20 exerceram efeito sobre a redução de tamanho de micropartículas. Contudo, tal comportamento não foi observado no presente trabalho, tendo somente a presença de curcumina contribuído para isso.

Os sistemas contendo 0,3 e 0,45 (% m.m⁻¹) de quitosana não geraram partículas de modo efetivo. Estes sistemas apresentaram baixa resistência mecânica, se desfazendo durante o processo de agitação ou não mantinham o formato esférico após a secagem, apresentando formato de disco, o que pode ser atribuído à baixa concentração polimérica, incapaz de formar uma rede estruturada e com resistência mecânica adequada. Entretanto, as dispersões poliméricas contendo 0,6 (% m.m⁻¹) de quitosana produziram micropartículas esféricas e rígidas. Destes, os sistemas S2 e S4 apresentaram diâmetro maior que as dimensões desejadas (>1000 µm), e apenas o sistema S6 (0,6QS+0,3 HPMC) apresentou tamanho adequado para ser classificado como micropartícula com cerca de 0,8661 mm (Figs. 4 e 5).

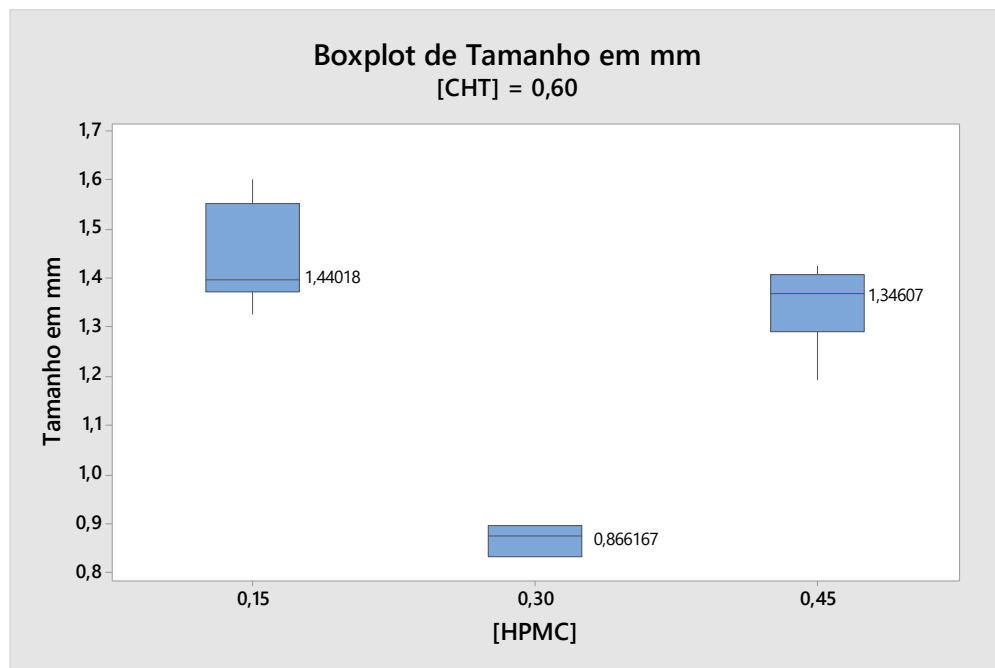


FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DAS MICROPARTÍCULAS FORMADAS.

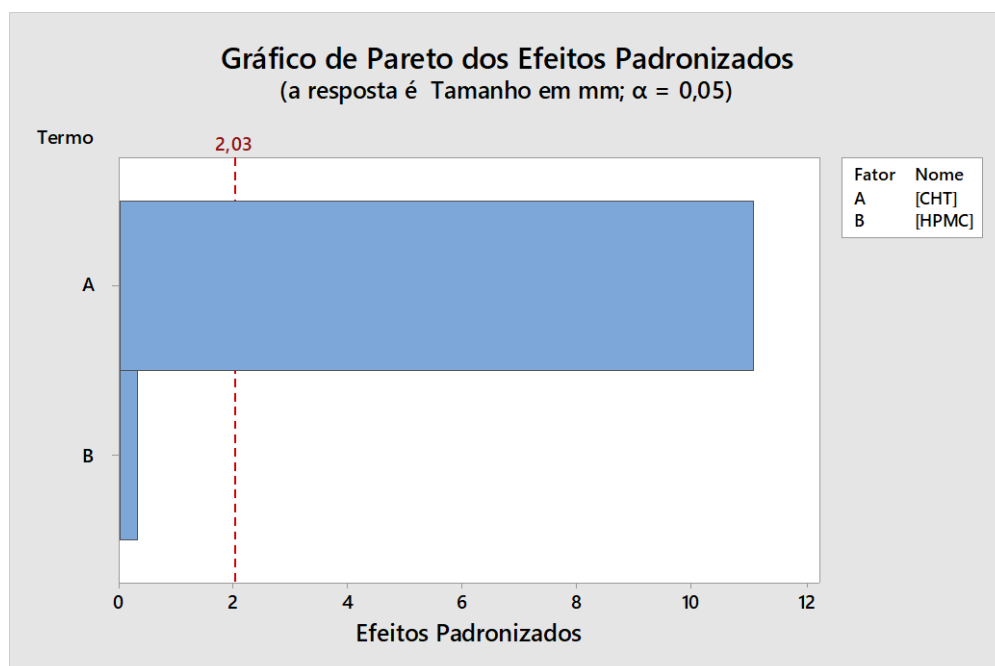


FIGURA 5. ANÁLISE DA COMPONENTE MAIS IMPORTANTE SOBRE A FORMAÇÃO DAS MPS.

Após a verificação de que a concentração de quitosana constituía o único fator importante sobre a formação dos microssistemas (Fig. 5), nas condições acima descritas, foi avaliada a importância das diferentes concentrações de HPMC sobre o tamanho destes sistemas. Por meio do gráfico expresso na

Figura 4 acima foi possível identificar que apenas a concentração de 0,30mg/mL foi capaz de originar micropartículas. Na Figura 5 é possível observar que pelo impacto dos efeitos sobre a formação das micropartículas, apenas a concentração de quitosana transpôs a linha de significância, tracejada em vermelho (2,03). Isso reafirma o fato de que, nestes casos a concentração de quitosana é o fator mais importante e significativo para a formação das MPs (Sreekumar et al., 2018a).

Os experimentos seguintes foram realizados com objetivo de otimizar a formulação contendo a proporção de quitosana e HPMC tidas como ótimas. Além de otimizar os sistemas, é possível, por meio das análises estatísticas adequadas identificar o impacto de cada fator sobre o tamanho das micropartículas.

Após a tabulação dos dados (Fig. 6), identificou-se que o sistema obtido a partir de QS com Mw 220 KDa, em solução de TPP a 3% e sob aquecimento de 70 °C, mostrou o menor tamanho médio (0,765 mm). A maior temperatura é capaz de reduzir a viscosidade da dispersão polimérica, isso leva a uma maior fluidez da rede gelatinosa, permitindo que mais solução contendo reticulante adentre a matriz polimérica e assim reticulando pontos mais internos da esfera. (Csaba et al., 2009; Kiilll et al., 2017; Majekodunmi & Uzoaganobi, 2017b)

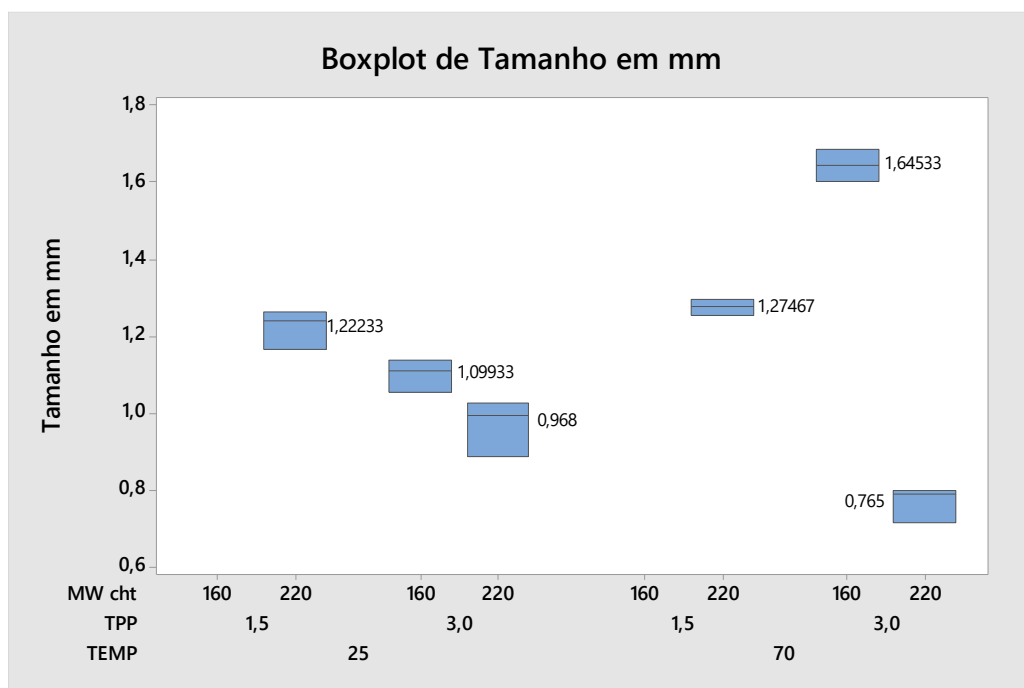


FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DAS MICROPARTÍCULAS FORMADAS, AGRUPADAS POR MW DE CH, CONCENTRAÇÃO DE TPP E TEMPERATURA.

Também foi possível observar que os sistemas constituídos por quitosana de baixo peso molecular (160kDa) e baixa concentração de TPP (1,5%), não foram capazes de formar micropartículas no método estudado. Isso decorre do fato de que baixas concentrações de reticulante, associada a um polímero menor e consequentemente menos pontos para reticulação são incompatíveis com a estruturação da matriz gelatinosa que dará origem à MP.

Antes das inferências acerca das componentes mais importantes para a formação das micropartículas e o impacto de cada uma delas sobre o tamanho e formação dos sistemas, torna-se fundamental a análise dos resíduos.

Para a obtenção do gráfico de distribuição dos resíduos, utilizou-se o método de Shaphiro-Wilk, com o qual é possível determinar se tal distribuição apresenta comportamento normal ou não normal. O teste de Shapiro-Wilk testa a hipótese nula que uma amostra, retirada de uma população, tem distribuição normal e é recomendada para amostras com dimensões ou número amostral mais reduzidas $n < 30$. O teste foi realizado ao nível de significância $\alpha = 0,05$, assim sendo o valor de $P > 0,1$ indica que a distribuição dos resíduos apresenta distribuição normal, sendo

assim possível seguir os procedimentos estatísticos de comparação de variâncias médias para dados paramétricos Fig. 7.

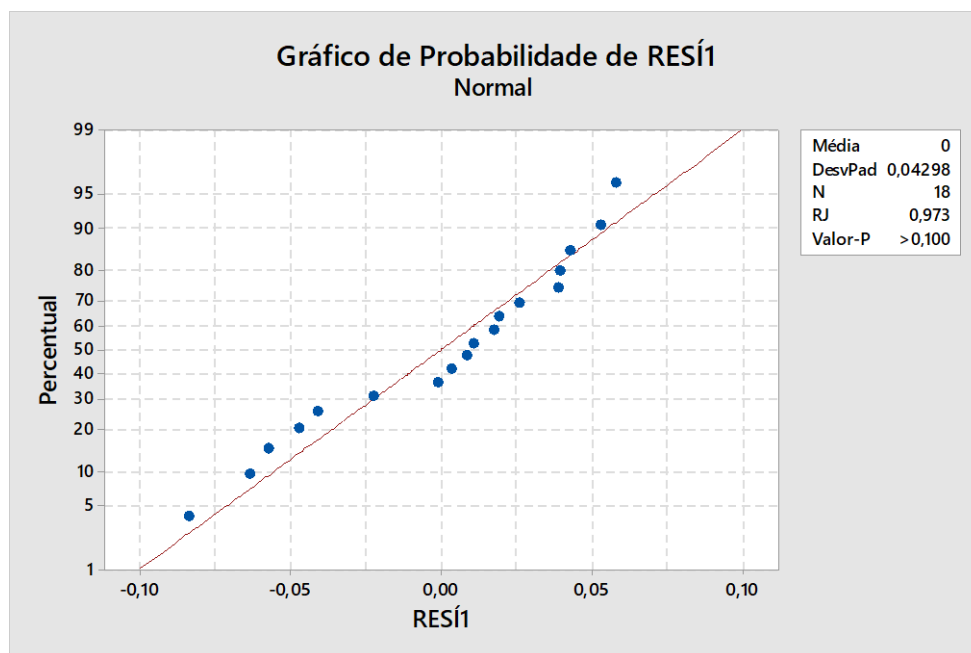


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS

Após identificar que a distribuição dos resíduos dos dados amostrais apresenta comportamento normal ou paramétrico torna-se possível determinar a(as) componente(s) que impactaram mais significativamente sobre o tamanho das partículas. Na Figura8 é possível observar que todas as variáveis testadas impactam significativamente sobre o tamanho das partículas.

Na Figura 8 de efeitos principais individuais, observa-se que o efeito isolado do aumento da concentração de TPP, e da Mw da quitosana produz um efeito positivo na redução do tamanho das partículas. O aumento da temperatura não provocou alteração quando se compara QS de 220kDa em TPP 1,5, nos casos em que se observou as QS de 160KDa, observa-se que a temperatura elevada provoca o aumento do tamanho das partículas, e finalmnete em sistemas obtidos com QS de 220 KDa, o aumento de temperatura causou uma redução significativa sobre o tamanho da MP.. Quando se analisa os efeitos em combinação (Figura 9) é possível identificar que existe uma condição ótima em que a maior temperatura (Figuras 9 e 10), juntamente com a maiores concentrações de TPP e quitosana com maior massa molecular, são capazes de produzir partículas menores e com boas características

visuais. Diferentes níveis de fator afetam a resposta de maneira diferente. Quanto maior a inclinação da linha (verticalidade), maior é a magnitude do efeito principal. Durante os experimentos foi possível observar que sistemas formulados com 1,5% de TPP e quitosana de 160KDa não se formaram ou após a sua formação não foram capazes de manter a forma após a secagem, independente da temperatura, mostrando-se extremamente frágeis.

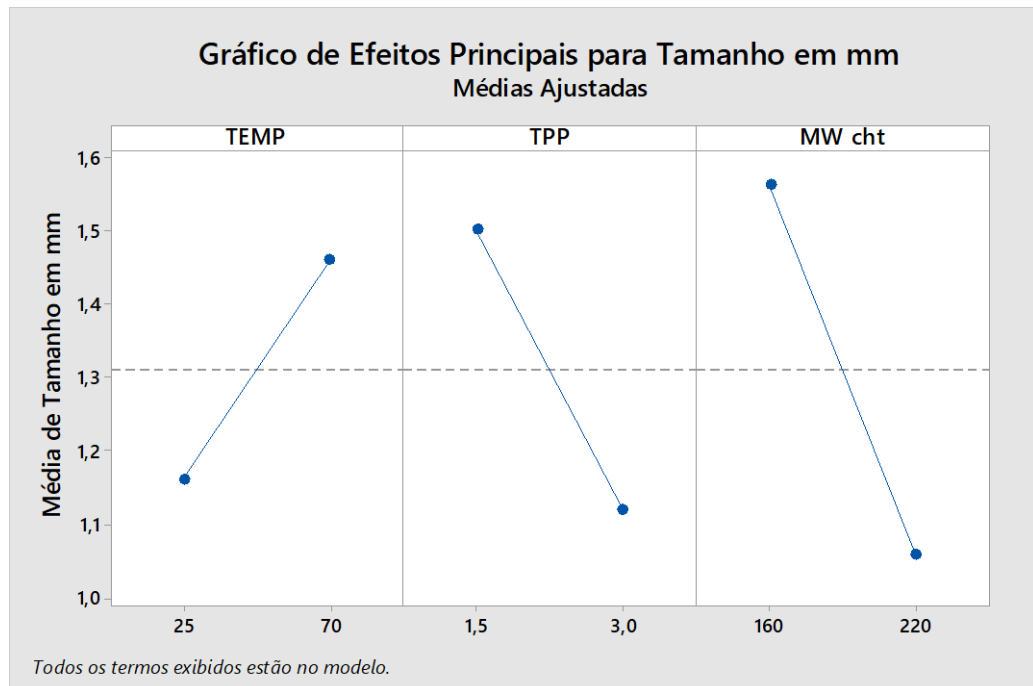


FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS EFEITOS INDIVIDUAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS SOBRE O TAMANHO DAS MPS

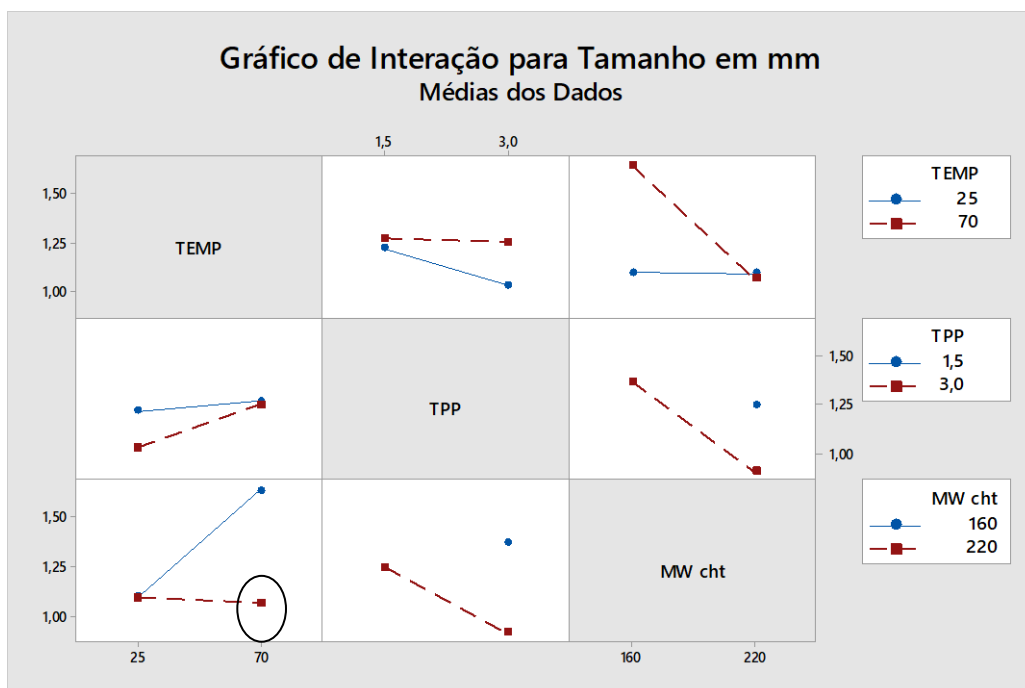


FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS INTERAÇÕES DO EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS SOBRE O TAMANHO DAS MPS



FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PREDIÇÃO DA CONDIÇÃO ÓTIMA DE SÍNTESE DE MPS APARTIR DO MODELO PROPOSTO.

Por fim um modelo matemático de primeira ordem foi proposto para explicar o comportamento do tamanho das partículas em função das variáveis estudadas. Os dados experimentais apresentaram ajuste de 97,91% a estes modelo, representado pela Equação do modelo Equação 5.

$$\text{Tamanho das MP em mm} = 0,262 + 0,06787 \text{ TEMP} - 0,0750 \text{ TPP} + 0,00475 \text{ MW cht} - 0,003783 \text{ TEMP*TPP} - 0,000277 \text{ TEMP*MW cht} \quad (\text{Eq.5})$$

Os dados relacionados ao sumário do modelo, indicaram que o valor de R^2 ajustado foi de 97,04% e o R^2 predito foi de 95,30%

Após a obtenção das variáveis que mais impactam sobre a formação, é importante analisar os sinais que aparecem antes do valor de cada fator, expresso na tabela do modelo (Anexo III), o sinal negativo indica que quando aquela variável ou combinação de variáveis é aumentado o efeito sobre as micropartículas é a redução de tamanho, e o contrário é verdadeiro.

Após definida a condição ótima de formação das micropartículas (Mw quitosana 220 kDa; [TPP]-3,0 % e Temperatura 70°C), os sistemas foram produzidos com e sem curcumina, liofilizados e não liofilizados, contendo 0,6QS+0,3HPMC (nomeado S6).

Para o delineamento dos experimentos de obtenção das MPs, observou-se que a técnica de geleificação ionotrópica foi capaz de produzir micropartículas utilizando quitosana, HPMC e TPP. Os tratamentos estatísticos e matemáticos adequados como foi descrito anteriormente, forneceram informações úteis sobre como dirigir os experimentos para a redução de tamanho dos sistemas, condição necessária à administração do sistema para o modelo animal proposto (gavagem em ratos).

Através dos dados obtidos para a quitosana com elevada massa molecular 220KDa e alto grau de desacetilação ($GD > 80\%$, informado pelo fabricante) foi possível sugerir que os pontos de interação NH_2 protonados permitem a interação com o TPP e o HPMC. Outra informação importante que foi possível extrair dos dados preliminares de pré-formulação, é o fato de os sistemas não terem sido formados em outras condições de concentração, indicando que o processo de formação apresenta dependência maior da concentração de quitosana do que de HPMC, como é possível observar na Figura 11. Entretanto, uma análise mais criteriosa dos dados nos permitiu inferir, que a concentração de HPMC impacta sobre o tamanho dos sistemas. Em síntese, a maior concentração de quitosana é fundamental para a formação dos sistemas, sem haver uma tendência clara dentro das concentrações estudadas, com relação ao aumento ou diminuição da concentração de HPMC sobre o tamanho das partículas. No entanto, a visualização

do gráfico da figura 11, nos permite identificar que apenas na concentração de 0,3% deste polímero apresenta dimensões micrométricas. Sendo assim, esta pode ser considerada uma condição ótima para a formação e otimização dessas partículas.

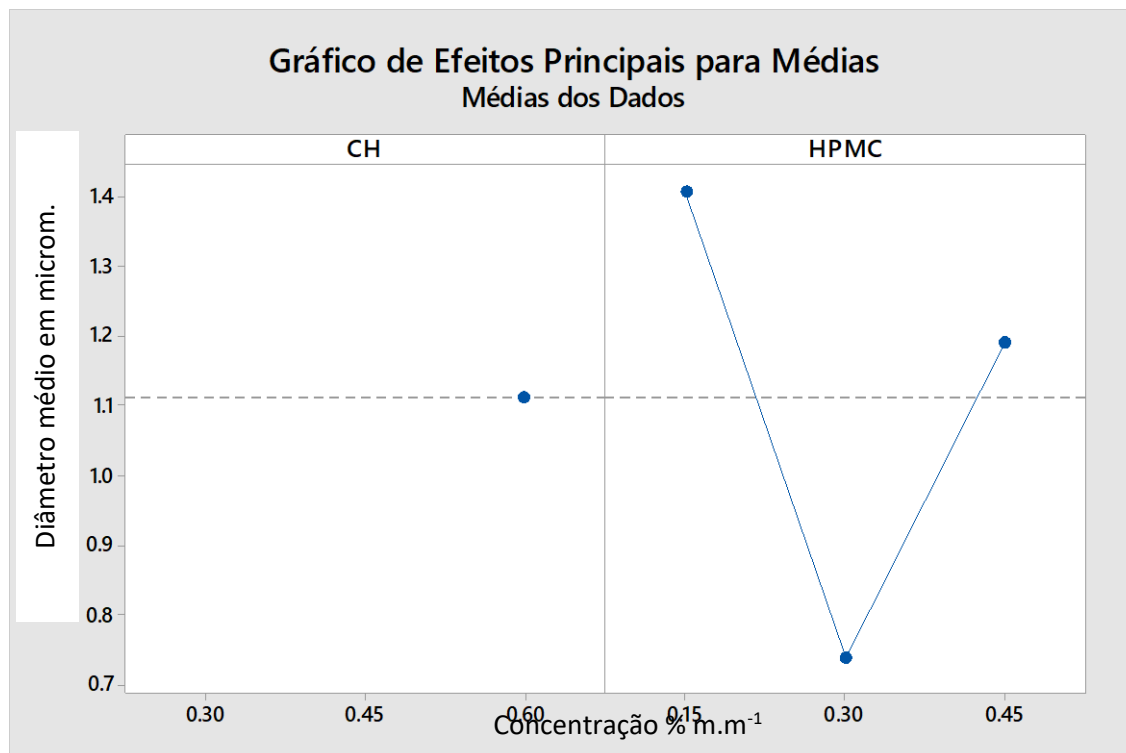


FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS EFEITOS INDIVIDUAIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS SOBRE O TAMANHO DAS MPS

Em síntese, quanto maior a concentração de quitosana, mais interações de maior potencial estabilizador e formador podem ocorrer. Por isso, é possível identificar sua presença para condição fundamental de formação das MPs. (Sreekumar et al., 2018b)

A quitosana é capaz de estabelecer interações dos mais diversos tipos, van der Waals, ligações de hidrogênio, porém as interações coulombicas entre a quitosana e o TPP ocorrem de modo que o TPP atua como uma ponte entre grupos amino protonados, e pode se dar entre diferentes cadeias poliméricas ou na mesma cadeia polimérica, desde que estas apresentem regiões protonadas (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006; MOHAMMED et al., 2017), por se tratar de interações com alta capacidade de redução de energia no sistema e alta estabilidade, sendo por isso os dois principais componentes estruturantes do sistema. Essa afirmação poderia justificar o fato de as partículas manterem a forma esférica apenas em elevadas concentrações de quitosana.

4.2. Caracterização do sistema

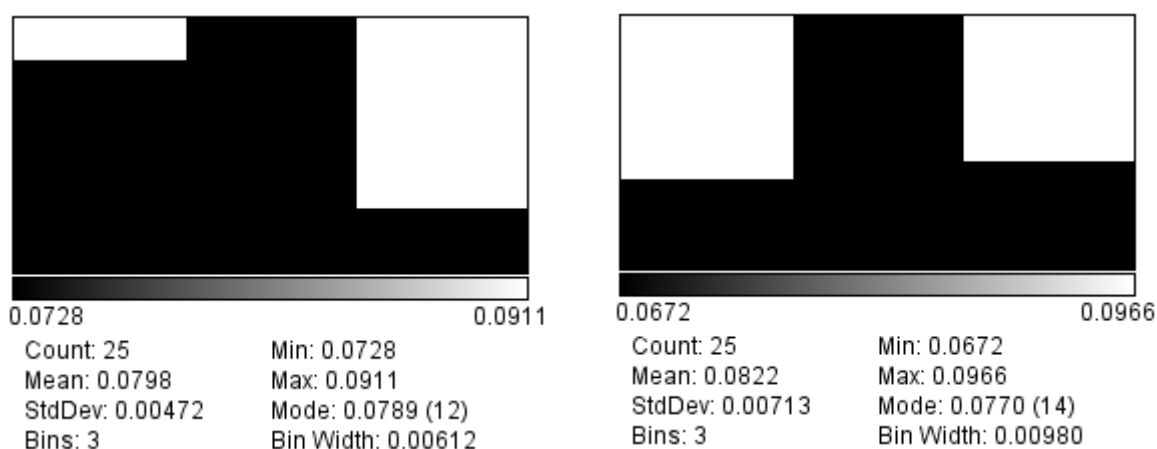
4.2.1. Tamanho e Circularidade

O tamanho da partícula, bem como a sua circularidade, são considerados parâmetros críticos de qualidade no sistema farmacêutico. São parâmetros importantes, pois a redução de tamanho da partícula permite um aumento considerável da área de superfície do sistema, tornando, para um mesmo volume de dispersão polimérica, maior a área de contato com a mucosa gástrica (Sreekumar et al., 2018b). Além disso, o reduzido tamanho da partícula permite que estes sistemas possam interpenetrar as vilosidades estomacais ficando alojados neste sítio liberando o fármaco.

A esfericidade é um outro parâmetro importante pois, quanto mais esférica a partícula, menores serão as variações nos perfis de liberação do ativo e de absorção de líquido (Garg & Gupta, 2008).

Assim, a morfologia dos carreadores de fármacos desempenha um papel importante nos processos de entrega terapêutica, como adesão de partículas à superfícies irregulares, distribuição pelas vilosidades gástricas (Liu et al., 2012).

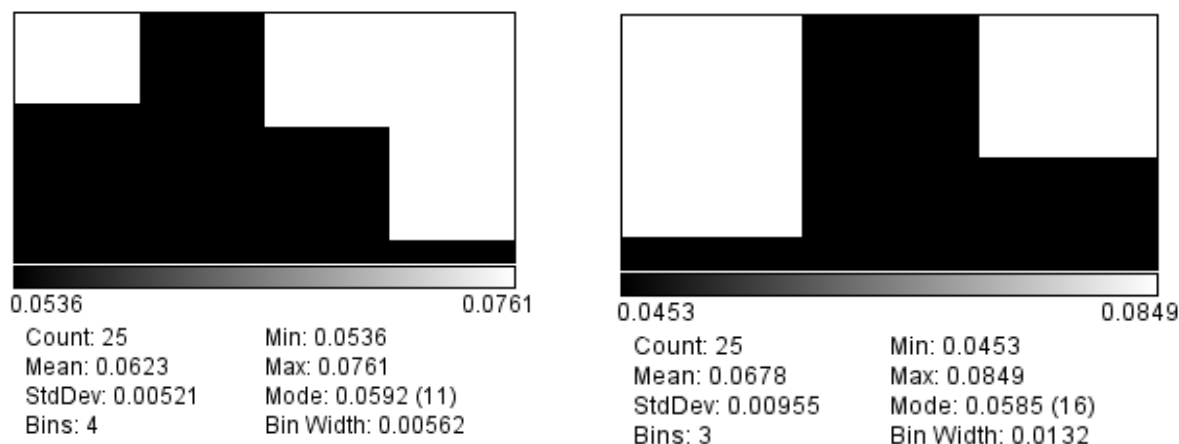
Um parâmetro considerado crucial para o desenvolvimento destes sistemas foi a sua capacidade de atravessar a agulha de gavagem, para que o experimento *in vivo* pudesse ser realizado com sucesso.



12A-Diâmetro médio das MP sem curcumina não liofilizadas. (12B-Diâmetro médio das MP sem curcumina liofilizadas. (a)

Circ-0.954 SD-0,0037

Circ-0,957 SD-0,0047



12C-Diâmetro médio das partículas não liofilizadas contendo curcumina (b)

12D-Diâmetro médio das partículas liofilizadas contendo curcumina(b)

Circ-0,876 SD-0,011

Circ-0,894 SD-0,018

FIGURA 12. DIÂMETRO MÉDIO DAS MPS OBTIDAS (A, B, C, D)

Através da análise dos histogramas contidos na Figura 12, é possível concluir que o diâmetro médio das MP sem curcumina foi maior do que o diâmetro médio das partículas contendo curcumina, sugerindo que o método de secagem não impactou significativamente sobre o tamanho das MPs apenas a presença ou ausência de curcumina. Com relação à circularidade das MPs, foi observado que segue a mesma tendência, os sistemas contendo curcumina apresentaram-se menos esféricos que os sistemas sem curcumina. A presença de curcumina leva a formação de MPs menores e menos esféricas. A redução de tamanho e a irregularidade no formato da MPs com presença de curcumina, apresentando um desvio considerável da forma esférica, foram achados surpreendentes. Podendo ser um indicador de que a presença de curcumina pode atuar alterando os diferentes tipos de interações intermoleculares presentes durante e depois da formação do sistema, alterando parâmetros intrapartícula, bem como as suas dinâmicas de interação com o meio circundantes, impactando diretamente sobre a tensão interfacial MP-meio aquoso, no momento da sua formação.

Os tamanhos obtidos para as MPs estão de acordo com os obtidos por meio de técnicas de mais alto custo, como o encapsulador Inotec®, configurado com um diâmetro de bico de 200 µm e um valor de carga eletrostática de 0,86 kV, utilizando quitosana (1-2%) e TPP foi de 400-500µm e os valores de circularidade estão

dentro de uma faixa considerada com adequada para sistemas esféricos $>0,8$ com frequências de oscilação entre 800-1200Hertz (Benamer, 2013).

Do ponto de vista molecular, essa redução de tamanho e a menor circularidade observados nos sistemas contendo curcumina podem indicar um efeito da curcumina como um agente que promove uma melhor interação entre os polímeros, podendo estar associado à redução de tensão interfacial (Shaw, 1975). Essa abordagem teórica encontra-se suportada, por técnicas espectroanalíticas e térmicas que são descritas e discutidas com mais detalhes na sequência. A partir de alguns resultados encontrados, e sistematicamente suportando por diferentes análises, não é absurda a inferência de que a curcumina interage com ambos os polímeros reduzindo os espaços intermoleculares entre eles.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de superfície e seção transversal obtidas por MEV das micropartículas liofilizadas e não liofilizadas são apresentadas na Figura 15. Externamente, as diferentes condições de síntese não causaram grandes variações na superfície e na forma das MPs. Entretanto, foi possível observar, após um corte transversal dos sistemas, que internamente, uns pareciam apresentar grandes vacúolos e outros eram estruturas sólidas e densas.

As análises de MEV revelaram que as MP contendo curcumina, independente de liofilização ou não, apresentaram grandes vacúolos internos, assemelhando-se a uma microcápsula (Fig 15. A e B), apresentaram-se menos esféricas, o que pode ser atribuído a mais baixa tensão interfacial no sistema que é incapaz de levar à construção de uma rede estrutural mais volumosa e contendo mais líquido difundido.

A incorporação de curcumina às MP levou à formação de vacúolos internos nas MPs, os quais revelam um rearranjo estrutural provocado pelo fármaco, o qual pode ser atribuído a forte interação fármaco-polímero, associado menor tensão interfacial entre a curcumina e os polímeros, bem como a água que em conjunto, provocando a rápida retração das estruturas, originando partículas menores.

As MPs contendo curcumina apresentaram superfície menos lisa que as MP sem curcumina, e, a liofilização levou à formação de pequenas rugosidades,

provavelmente, pequenos poros decorrentes do processo de remoção de água remanescente à secagem em temperatura ambiente.

Os cortes transversais mostraram que o material formado é homogêneo constituindo uma matriz em toda a extensão que está presente nos sistemas, não havendo internamente separação de fases visíveis, exceto o fato anteriormente mencionado com relação à formação dos vacúolos.

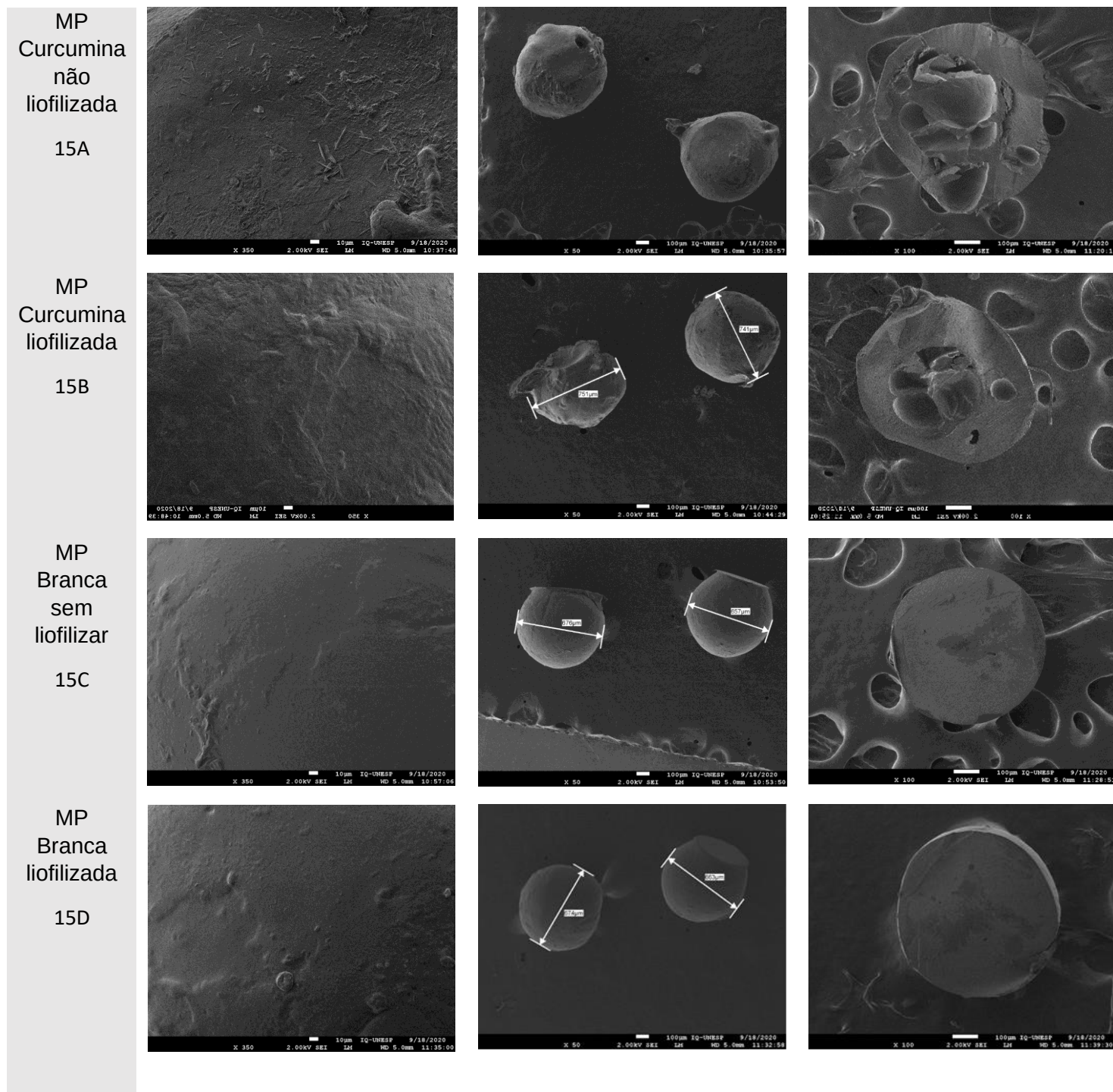


FIGURA 13. MICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS (A, B, C, D).

Os achados na Figura 15, corroboram a hipótese levantada no tópico anterior, tamanho e circularidade, onde levantamos a possível contribuição da curcumina como um agente redutor de tensão interfacial entre as MP e o meio aquoso. A evidência visual proporcionada pelas figuras 15A e 15B, onde as MPs contendo curcumina, exibem grandes poros, nos levam na direção de que a interação das

MPs com a água, foi facilitada a ponto de a água penetrar na estrutura das MPs durante o momento da sua formação e após a sua secagem a sua saúde deixou os grandes vacúolos observados. E isso pode ter contribuído para a deformação das MPs.

4.2.3. Revalidação de metodologia para quantificação de curcumina por HPLC

Para a quantificação da curcumina, um método analítico usando HPLC foi utilizado (Fonseca-Santos et al., 2017). O método foi validado quanto à especificidade ou seletividade, faixa de trabalho (linearidade), sensibilidade (limite de detecção e de quantificação), exatidão, precisão (repetitividade, reprodutibilidade) (Fig.13). As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 2.

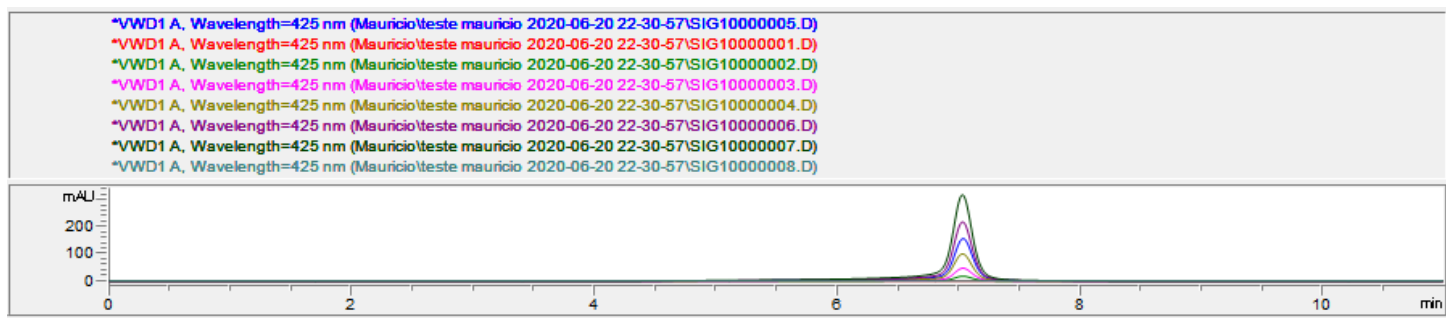
TABELA 2. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA VALIDAÇÃO.

Detecção (λ)	Uv-425nm
Fluxo	1,0 mL/min
Injeção	10 microlitros
Fase móvel	Acetonitrila:Ácido acético 1% (25:75 v/v)
Coluna	Zobax-C-18 com encapsamento duplo
Partícula	5 μ m
Tamanho do poro	95 Å
Comprimento	250mm
Temperatura	37,5°C

4.2.3.1. Seletividade

A seletividade é o parâmetro que indica a capacidade do método em distinguir inequivocamente a substância estudada dos demais materiais que podem constituir possíveis interferentes (Ribani et al., 2004). Neste caso foram injetadas a curcumina juntamente com os materiais componentes da forma farmacêutica (Tween-20, quitosana e HPMC) sem que fosse possível observar interferências ou variações quando comparada a injeção da amostra isoladamente (Figura 13). Isso se justifica, pelo fato de nenhum dos componentes da amostra apresentarem absorção em comprimentos de onda próximos do que foi utilizado para a quantificação da curcumina, fato que pode ser corroborado pelos resultados de exatidão.

A



B

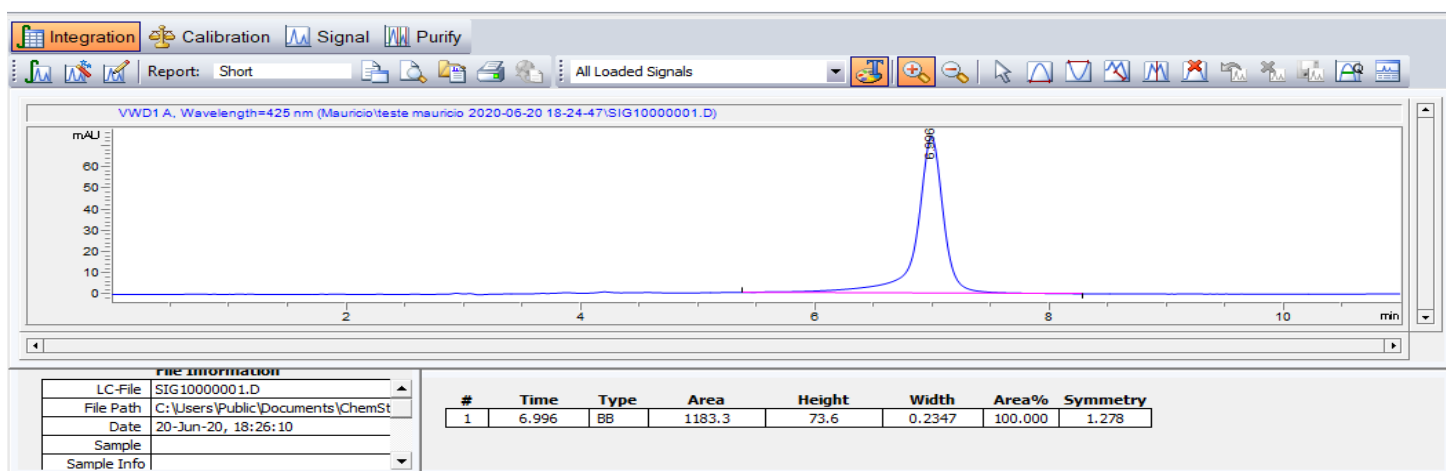


FIGURA 14. A) ESPECTROS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CURCUMINA DEMONSTRATIVO DA LINEARIDADE. B) ESPECTRO DE SELETIVIDADE COM A INJEÇÃO DE CURCUMINA, TWEEN-20, QUITOSANA E HPMC.

4.2.3.2. Linearidade

As curvas foram tratadas pelo método dos mínimos quadrados dando origem a uma curva média, obtida a partir de três curvas. A curva média (Figura 14) pode ser descrita pela equação $y=158646x+50,745$. O parâmetro de linearidade foi determinado e foi obtido o valor de 0,9995 para o coeficiente de correlação. Quanto mais próximo de 1, o coeficiente de correlação, maior a linearidade. O intervalo de concentração de $[0,924; 1,848; 3,85; 6,41; \text{ e } 15,4\mu\text{g.mL}^{-1}]$ foi determinado como a faixa linear de trabalho.

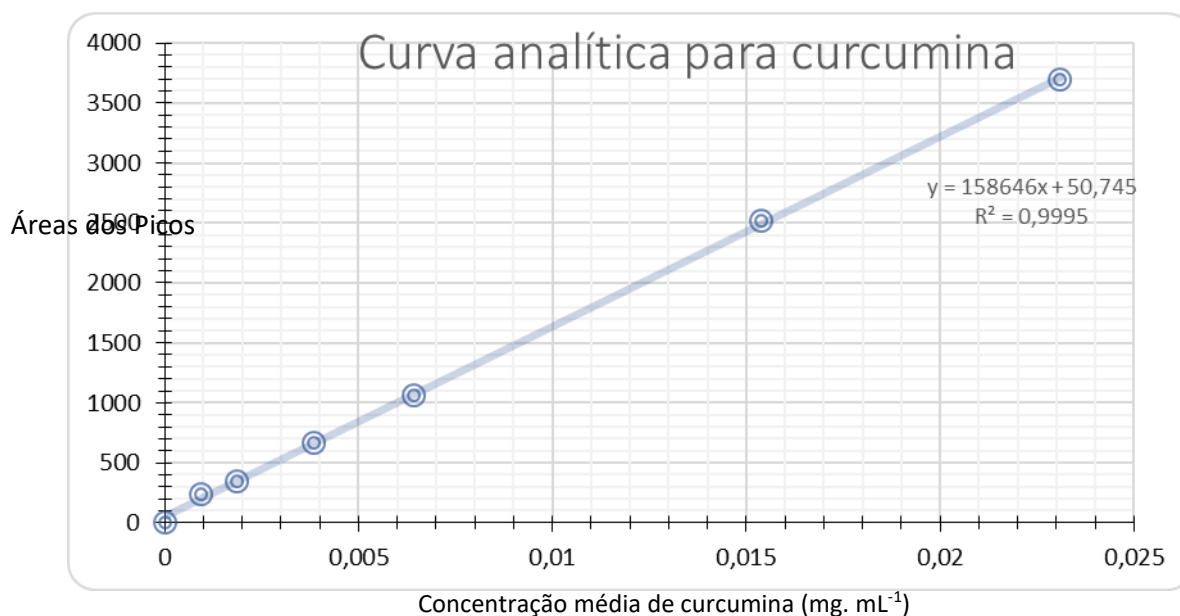


FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA MÉDIA DE REGRESSÃO E DA EQUAÇÃO UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA (MG.ML⁻¹).

4.2.3.3. Limites de detecção e quantificação.

Para o limite de detecção foi obtido o valor de $0,172654 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já para o limite de quantificação foi obtido o valor de $0,575514 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.3.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio do ensaio de recuperação. O teste de recuperação consistiu na análise em triplicata de três níveis das amostras de

concentrações conhecidas, baixa, média e alta nas amostras das micropartículas brancas (sem curcumina). A Tabela 3 descreve os parâmetros obtidos para a avaliação da exatidão do método analítico.

TABELA 3. PARÂMETROS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Concentração (ug.mL ⁻¹)	0,924	6,416	23,100
Média de recuperação(%)	99,8807	99,3768	97,6948
Desvio Padrão (±)	0,01083	0,028382	0,061773

Precisão

Os resultados de precisão são expressos através do coeficiente de variação do percentual obtido, conforme demonstrado na Tabela 4.

TABELA 4. PARÂMETROS OBTIDOS PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Concentração experimental ug.mL ⁻¹	Intradia (Desvio Padrão) ug.mL ⁻¹	Interdia (Desvio Padrão) ug.mL ⁻¹	CV(RSD) Intradia	CV(RSD) Interdia	Recuperação Intradia (Desvio Padrão)	Recuperação Interdia (Desvio Padrão)	P estatístico
0,924	0,92215(0,02)	0,92197(0,02)	5,10%	2,60%	99,80 (1,98)	99,78(2,60)	P>0,05
6,416	6,3698(0,13)	6,366(0,23)	3,95%	3,67%	99,28 (1,99)	99,23(3,65)	P>0,05
23,100	22,60797 (0, 9)	22,614 (0, 6)	3,97%	4,44%	97,87 (3,92)	97,90(2,87)	P>0,05

O FDA classifica como aceitável um método analítico que apresente valores de precisão e exatidão definidos em CV ≤15% e desvio padrão ±15%, respectivamente (European Medicines Agency, 2011; US Food and Drug Administration, 2018).

4.2.4. Análise de interações via espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

O espectrômetro de FT-IR emite radiação na região do espectro infravermelho. Essa energia é fraca o suficiente para não haver o rompimento de ligações, mas intensa o suficiente para promover a excitação das ligações/interações presentes nas moléculas (Pavia et al., 2016). Além da fonte de emissão, o

equipamento possui um detector capaz de registrar a quantidade de energia que foi absorvida pela amostra. Esses dados, associados à interpretação dos sinais decorrentes da absorção da radiação aplicando um procedimento matemático denominado “transformada de Fourier”, torna possível avaliar os diferentes movimentos vibracionais das ligações químicas das moléculas(Pavia et al., 2016; Silverstein et al., 2000).

Apesar da técnica de FTIR ser bastante difundida e largamente utilizada para obter informações sobre grupos funcionais presentes em moléculas, bem como identificar interações específicas nestes grupos funcionais, uma limitação da técnica reside no fato de que a análise das moléculas ou mistura de moléculas é baseada na observação do deslocamento e na alteração de intensidade em bandas específicas. Tais bandas podem apresentar-se como uma banda larga formada pela sobreposição de vários picos, tornando difícil a identificação e quantificação destes picos dentro da banda. Apesar de o uso de técnicas de derivação para aumento de resolução e quantificação destes picos componentes motivarem discussões, divergências e estimulado o estudo dessas derivações, a falta de uma técnica matemática definitiva permite o uso de tais artifícios matemáticos para tornar a análise o mais fidedigna possível, quando comparada com a análise visual. A análise por isolamento, deconvolução (Lorentziana) e tratamento matemático das bandas oferece a segurança de que o que estamos comparando são bandas e não perturbações ou ruídos decorrentes de erros sistemáticos inerentes à análise. Soma-se ainda o fato de ser altamente reprodutível por outros pesquisadores, permitindo a comparação de dados com redução do viés do analista. Por esse motivo avaliou-se, neste trabalho, os dados de FTIR por meio da derivada de segunda ordem, com a sua derivada calculada numericamente pelo algoritmo de Savitzky-Golay

Os espectros de FTIR e tratamento matemático realizado utilizando o software Origin 2016 podem ser visualizados isoladamente (Figura 16).

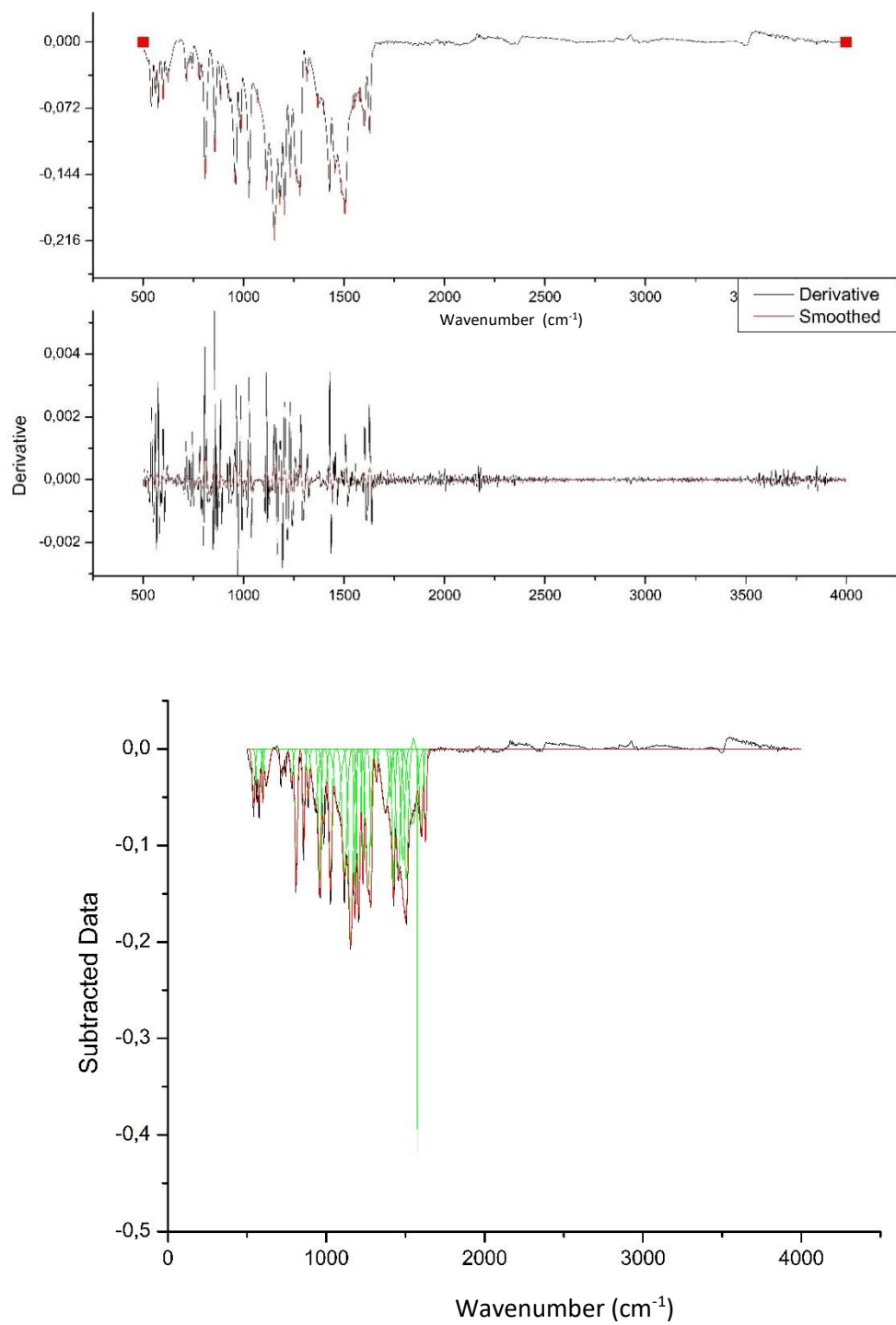


Figura 16. A) Espectro curcumina

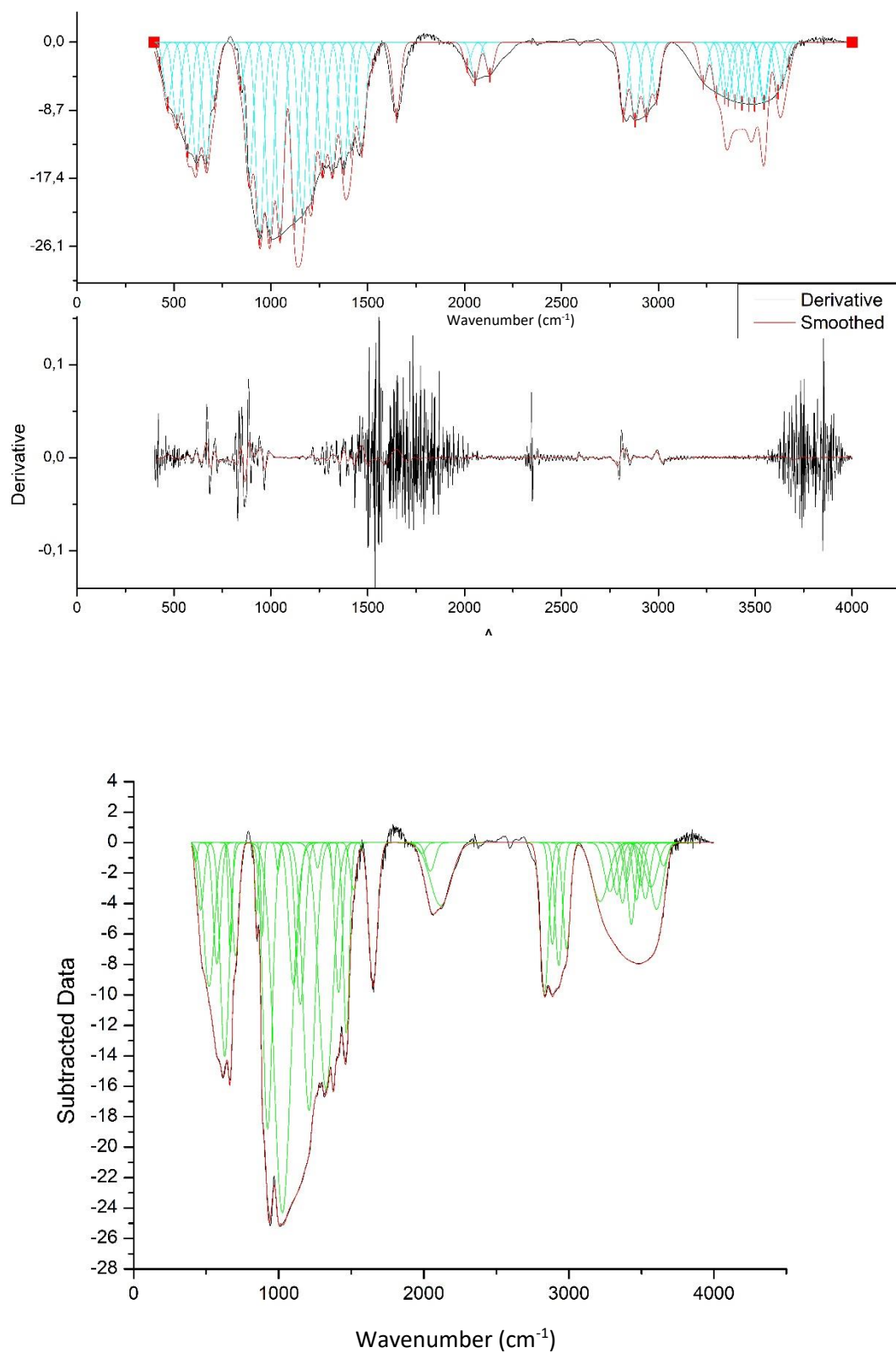


Figura 16. B) Espectro HPMC

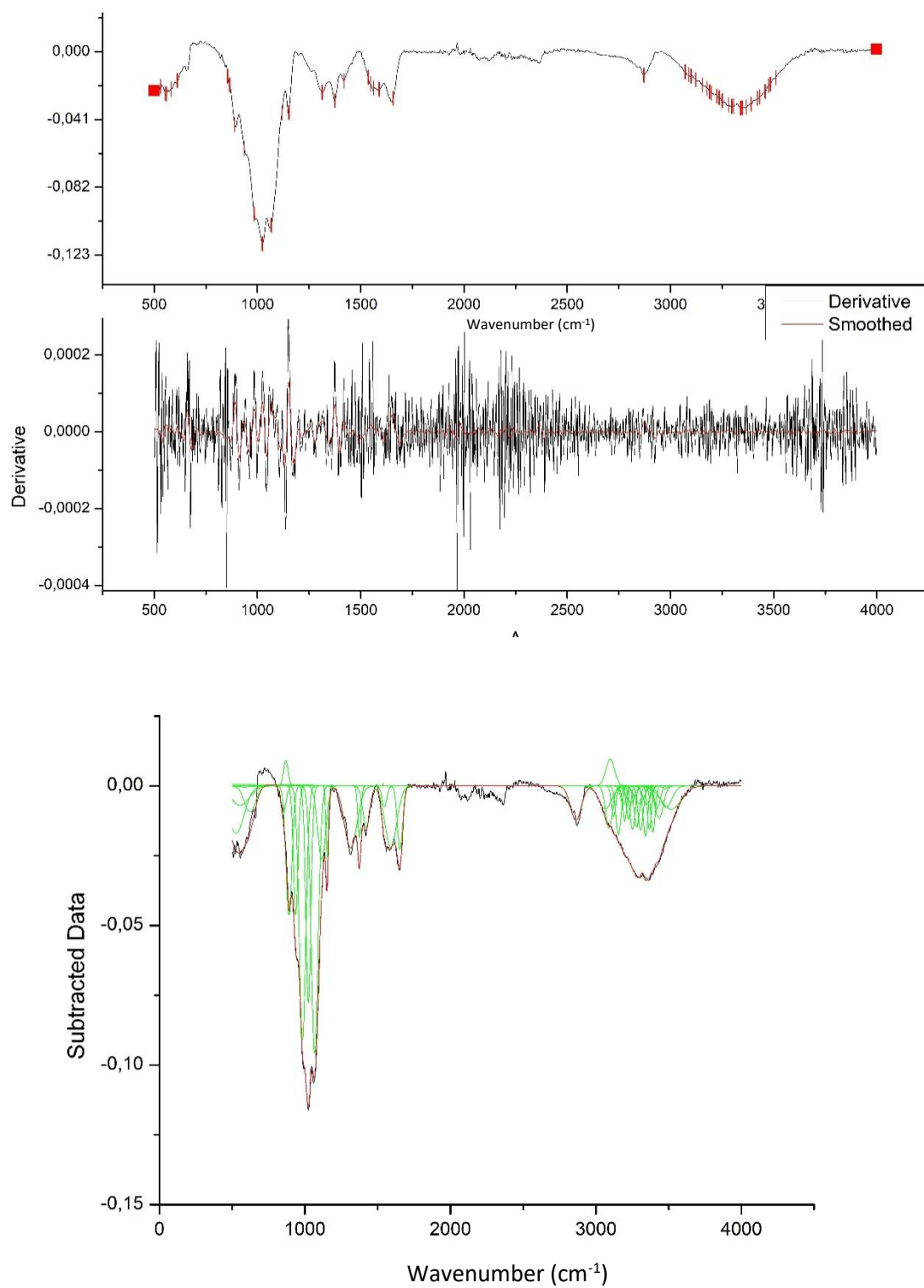


Figura 16. C) Espectro Qitosana

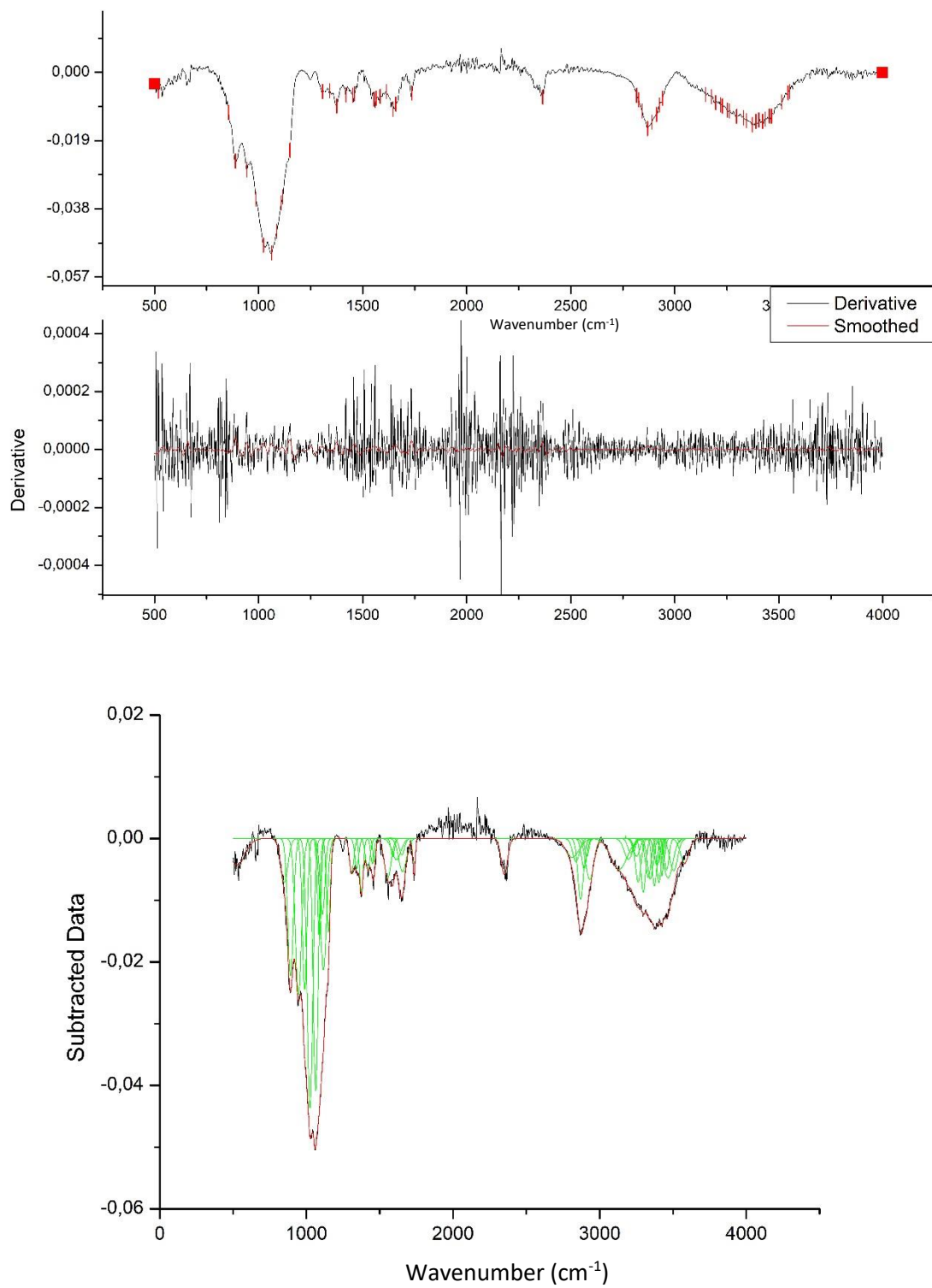


Figura 16. D) Espectro MP branco (liofilizada)

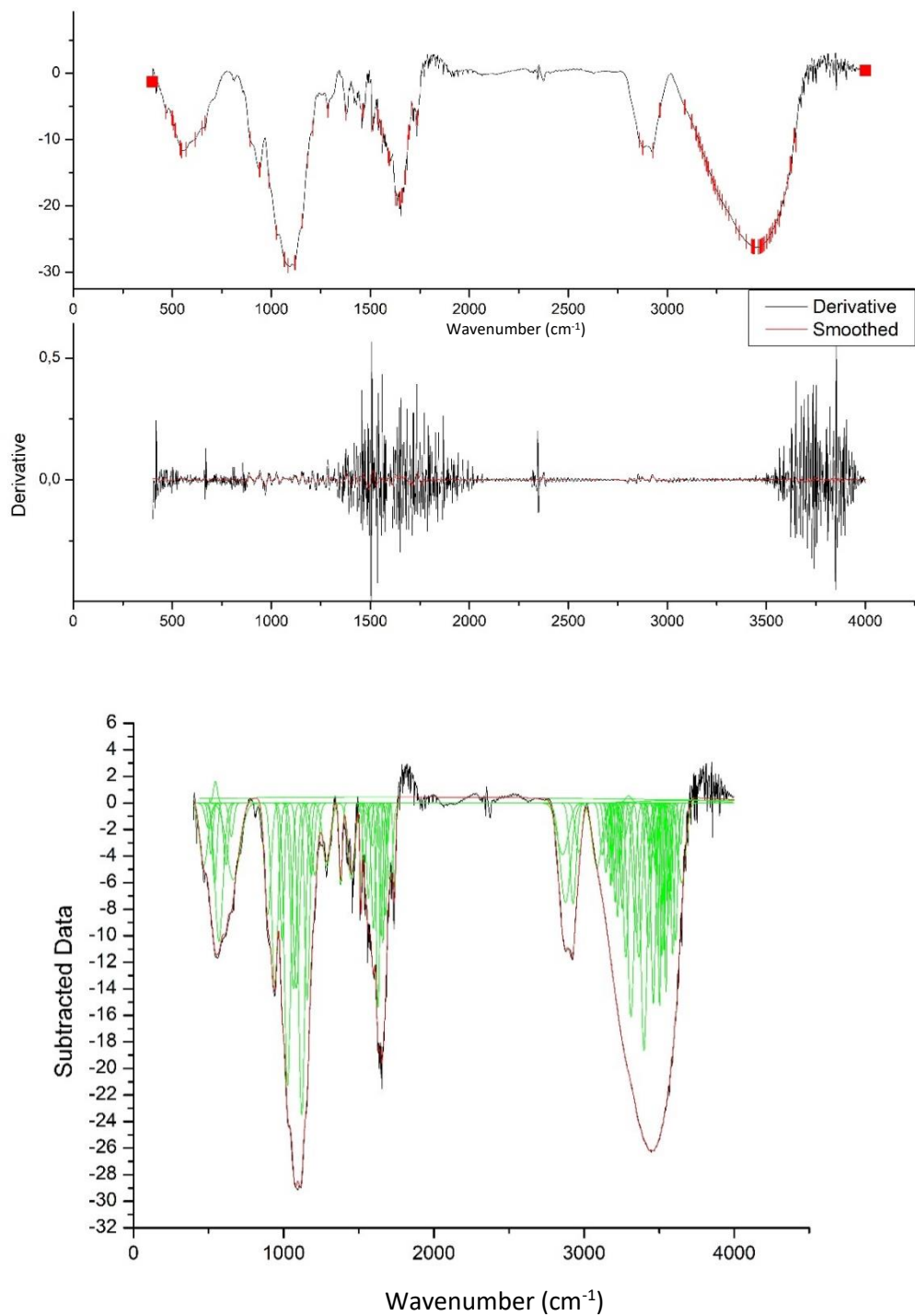


Figura 16. E) Espectro MPs contendo curcumina (liofilizada)

FIGURA 16. ESPECTROS DE FTIR COM AS SUAS RESPECTIVAS DECOVOLUÇÕES E IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS BANDAS (A, B, C, D, E, F).

As bandas obtidas a partir do espectro FT-IR foram usadas para analisar a estrutura de HPMC, quitosana, MP + cur(lío) MP-cur(lío), Cur (Figura 17).

A análise de polímeros e micropartículas por espectros FT-IR mostrou que muitas das bandas observadas apareceram na região da impressão digital, que abrange números de onda entre 1400 e 800 cm^{-1} . Para a curcumina, a região dos comprimentos de onda de 1700-1000 cm^{-1} foi selecionada para a análise de bandas da curcumina. A banda observada em 1626 cm^{-1} pode ser atribuída ao movimento de alongamento da ligação C = O em relação à presença de cetonas na estrutura. A banda em 1599 cm^{-1} está relacionada ao alongamento C = C dos anéis aromáticos nas extremidades da molécula de curcumina. A banda vista em 1508 cm^{-1} é atribuída à vibração C = C relativa à insaturação e à vibração de dobra do anel de benzeno. As bandas presentes em 1423 cm^{-1} referem-se à vibração de flexão C – H olefínica. A banda vista em 1284 cm^{-1} representa vibrações de alongamento C – O aromáticas (Silverstein et al., 2000).

Os polímeros e MP produziram espectros com algumas regiões em comum. Entretanto, diferenças importantes foram observadas entre os espectros dos materiais isolados e as MPs, especialmente, em algumas regiões e na intensidade de certas bandas. A banda mais intensa nos espectros ocorreu em 1080 cm^{-1} , que representa vibrações fora de plano associadas a um anel cíclico alquil substituído contendo ligações éter (de Almeida Barbosa, 2007).

A banda em 1000-1250 cm^{-1} está relacionada ao anel glicosídico presente nos polímeros estudados e, conseqüentemente, nos MPs. A banda em 1117 cm^{-1} está relacionada a ligações (CO) de álcoois primários presentes na quitosana e HPMC em grande proporção e em 1033 cm^{-1} está relacionada a ligações (COC) da vibração da estrutura básica do anel de piranose da quitosana e HPMC. Na quitosana, especialmente, uma banda de fraca intensidade associada a ligações (CN-; NH-) aparece tanto na cadeia da quitosana quanto nas MPs, a 1255 cm^{-1} . (Calvo et al., 2019)

Estruturas semelhantes à celulose, como os polímeros utilizados, possuem moléculas de glicose que contêm uma ligação éter na estrutura do anel e outra ligação éter entre as moléculas de glicose vizinhas (Teegarden, 2004). Os espectros obtidos das ligações éter (1053 e 943 cm^{-1}) verificam a presença desses éteres na

estrutura da glicose, bem como as ligações éter envolvidas na ligação covalente dos substituintes.

No HPMC é possível observar picos que se relacionam com grupos hidroxila nos substituintes hidroxipropila e anéis de glicose no carbono dois e três representam álcoois secundários; as ligações C-O envolvidas na estrutura do álcool secundário geralmente exibem absorção a 1100 cm^{-1} (Akinosho et al., 2013). Finalmente, a banda que surge das ligações O-H do álcool primário em C6 na molécula de glicose aparece em 1312 cm^{-1} (Langkilde & Svantesson, 1995).

As bandas que representam álcoois primários e secundários revelam que carbonos não substituídos permanecem nos anéis de glicose na estrutura da celulose após a eterificação.

As bandas em 1377 e 1458 cm^{-1} resultaram dos modos de flexão e alongamento (movimentos) do CH dos grupos metil; essas bandas são muito fracas em relação a outras no espectro. Wang e colaboradores (2007) analisaram a estrutura de HPMC usando FT-IR e identificaram as bandas em 1458 e 1377 cm^{-1} como vibrações CH metil. As bandas em 2833 e 2916 cm^{-1} representam as absorções dos modos de vibração CH dos grupos metil.

Na MP com curcumina, em 1290 cm^{-1} , é possível observar uma banda pequena e fraca, que possivelmente tem relação com movimentos das ligações CH, CN, NH, e o seu deslocamento para 1317 cm^{-1} (CH- OH e CN), na ausência de curcumina pode significar interação entre os grupos CN-NH da quitosana com grupos OH do HPMC via ligações de H.

Durante a análise vibracional da quitosana, a banda em 1079 cm^{-1} , atribuída ao alongamento das ligações C (sp^3) ligado à O de álcoois primários, apresentou diferenças perceptíveis em comparação aos espectros de FTIR das partículas (de Almeida Barbosa, 2007).

A banda que aparece muito fraca entre $1259\text{-}1286\text{ cm}^{-1}$, para as MPs com e sem curcumina é resultado da interação entre a QS e o TPP (Parize et al., 2012). Entretanto, é possível observar essas diferenças entre os sistemas com e sem curcumina, que foram principalmente devido à complexação entre as moléculas de QS e TPP em presença da curcumina, indicando que pode ocorrer interação entre o TPP-CUR-QS não apenas do tipo ligação de hidrogênio, como também interações

eletrostáticas do tipo íon-dipolo, as quais podem ocorrer para que haja a inclusão da curcumina no sistema.

As pequenas diferenças nos espectros de FTIR (faixa de 2250 a 3750 cm^{-1}) das partículas relacionadas ao espectro de FTIR de QS foram atribuídas às diversidades nas intensidades de ligações de Hidrogênio entre os segmentos de cadeia de QS-TPP e TPP-TPP. No entanto, essas diferenças espectrais foram sutis, uma vez que as ligações H entre os grupos amino e hidroxila nas cadeias QS também são extremamente pronunciadas (Martins et al., 2012)

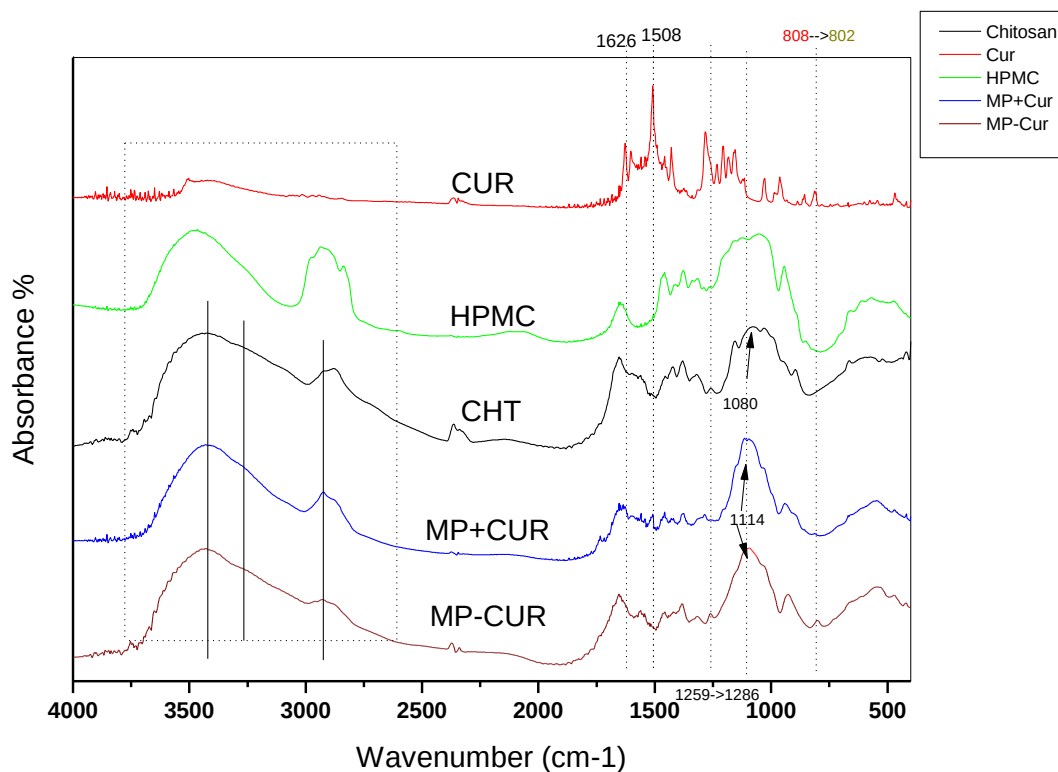
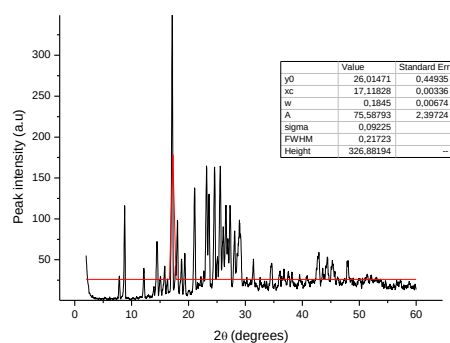


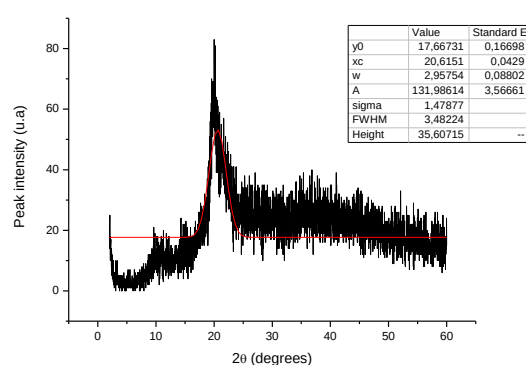
FIGURA 17. ESPECTROS DE FTIR DOS MATERIAIS E MPS COM AS BANDAS INFORMATIVAS IDENTIFICADAS.

4.2.5. Difração de raios-X

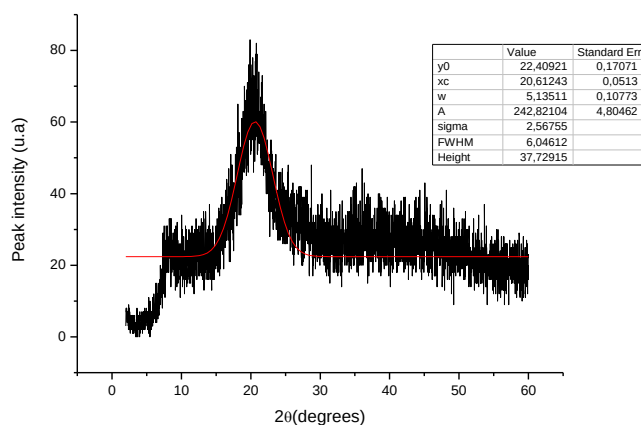
O uso da técnica de difração de Raios-X foi aplicado para estimar a estrutura cristalina e/ou amorfa dos materiais utilizados, bem como dos sistemas otimizados, liofilizados ou não. A Figura 18 apresenta os espectros dos materiais utilizados e das MPs com e sem curcumina. A análise dos difratogramas foi realizada por meio do software Origin. 2016, utilizando tratamento de Voigh em vermelho.



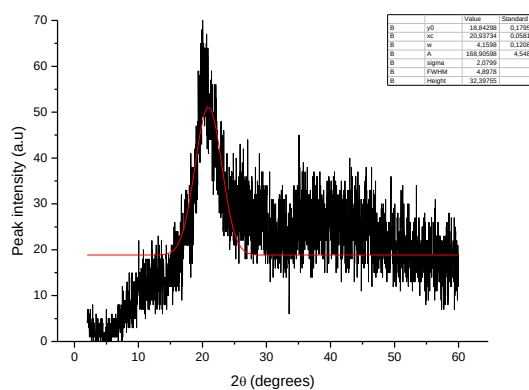
a) Curcumina - Tamanho do cristalito (38.43nm)



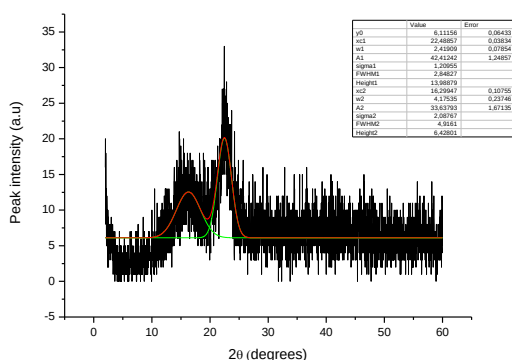
b) Quitosana Tamanho do cristalito (2.34nm)



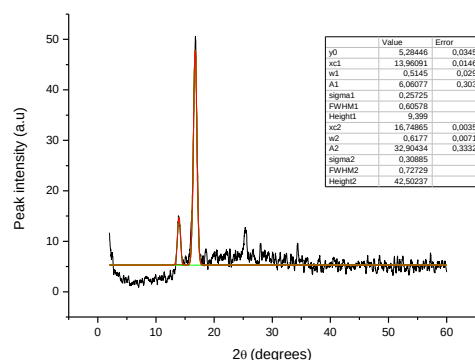
c) HPMC -Tamanho do cristalito (1.35nm)



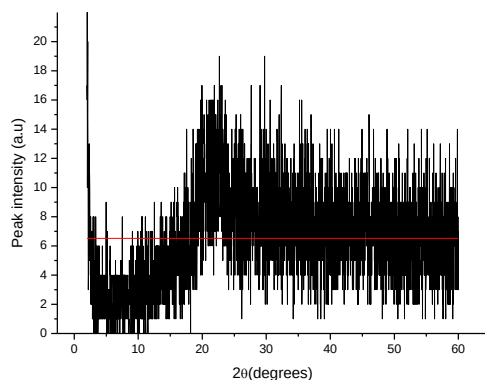
d) Mistura física -Tamanho do cristalito (1.66nm)



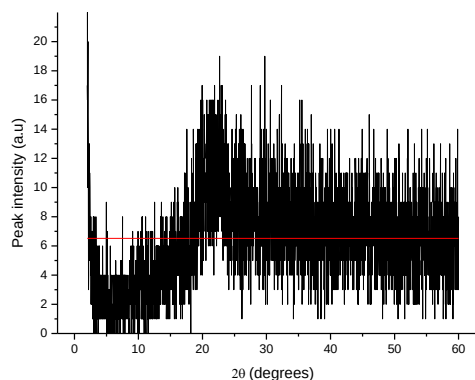
e) MP BR liof Tamanho do cristalito (2.26nm)



f) MP Branca sem liofilizar Tamanho do cristal (12.44nm)²



g) MP com cur liofilizada (Amorfo)



h) MP com Cur sem liofilizar (Amorfo)

FIGURA 18. DIFRATOGRAMAS DOS MATERIAIS E MPS UTILIZADOS (A, B, C, D, E, F, G, H).

Foi possível identificar, na Figura 18, picos de cristalinidade em todos os materiais puros, e na mistura física, destacando-se a curcumina, que apresenta-se altamente cristalina, bem estruturada com cristalitos maiores que os demais materiais, e apresentando a característica típica do seu *fingerprint* único devido à sua natureza cristalina (Saralkar & Dash, 2017). Já os polímeros apresentaram estruturas semi-cristalinas, com cristalitos menores como era de se esperar, devido às suas grandes cadeias que apresentam-se mais desorganizadas. Em outras

² Os dados da figura 18 f foram suavizados antes da análise e o dado original pode ser visualizado nos anexos.

palavras, os polímeros apresentam-se como materiais majoritariamente amorfos, com algumas regiões cristalinas. O grau de cristalinidade destes polímeros varia da origem e grau de hidratação. Usualmente a quitosana apresenta dois picos cristalinos entre 8,8°–10,78° e 18,8°–20,78°. O HPMC apresenta pico menor próximo de 10°, e um pico maior em aproximadamente 20° (Somashekarappa et al., 2013).

Para analisar as MPs, estes materiais serão divididos em dois grupos com características bem diferentes. O primeiro grupo é o das estruturas que mantiveram ainda um grau de cristalinidade observável, que são os sistemas sem curcumina. Foi possível observar que estes sistemas apresentaram perfil cristalográfico geral muito semelhante, com a possível visualização de dois picos bem definidos, provavelmente devido ao processo de reticulação e posterior desidratação dos polímeros. A desestruturação e reestruturação podem levar à formação de uma estrutura cristalina nas micropartículas; entretanto, o sistema liofilizado mostrou-se menos cristalino que o sistema não liofilizado. Isso ocorre, pois a liofilização é um processo que leva à amorfização ou redução de tamanho da estrutura cristalina (Aulton & Taylor, 2017).

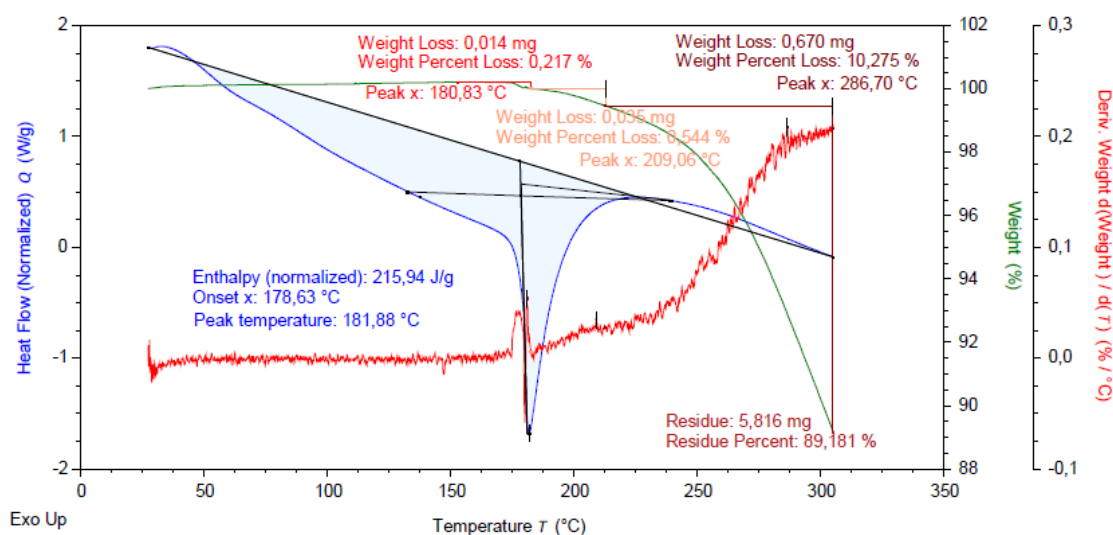
No segundo grupo, temos as MPs contendo curcumina, nas quais não é possível identificar picos de cristalinidade bem definidos, indicando que ocorreu ou uma redução muito grande de tamanho do cristal, ou essa estrutura é completamente amorfa. Com base na metodologia de obtenção da formulação, acredita-se que as MPs com curcumina sejam amorfas. A curcumina parece atuar como uma impureza que impede a recristalização a estruturação de cristais na amostra, assim como os polímeros também atuam mantendo a curcumina em um estado amorfo.

Estes resultados claramente revelam que o método otimizado de obtenção da MPs forma sistemas amorfos, bem como sistemas parcialmente cristalinos, de tamanho de cristalito menor que a curcumina de origem. Essas variações dos perfis cristalinos das amostras impactam diretamente sobre os parâmetros de dissolução, absorção de líquido, desestruturação da matriz polimérica e consequentemente biodisponibilidade. A redução de cristalinidade é sobretudo importante para moléculas pouco solúveis melhorarem sua solubilidade em meios biológicos e consequentemente aumentar a sua eficácia terapêutica (Rajasekar & others, 2015).

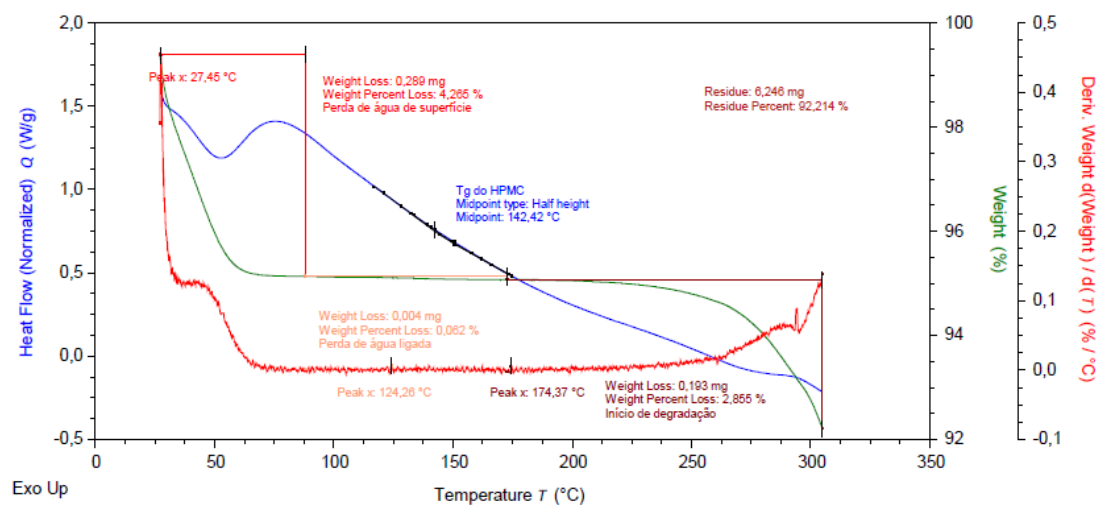
4.2.6. Análises de termogravimétricas DSC/TG

As técnicas térmicas são capazes de avaliar a estabilidade térmica das MPs, e o comportamento dos polímeros quando adicionada a curcumina. Outra importante aplicação das análises térmicas, especialmente a técnica de DSC, é de observar as transições de fases, e avaliar se ocorreram interações químicas entre os polímeros e a curcumina.

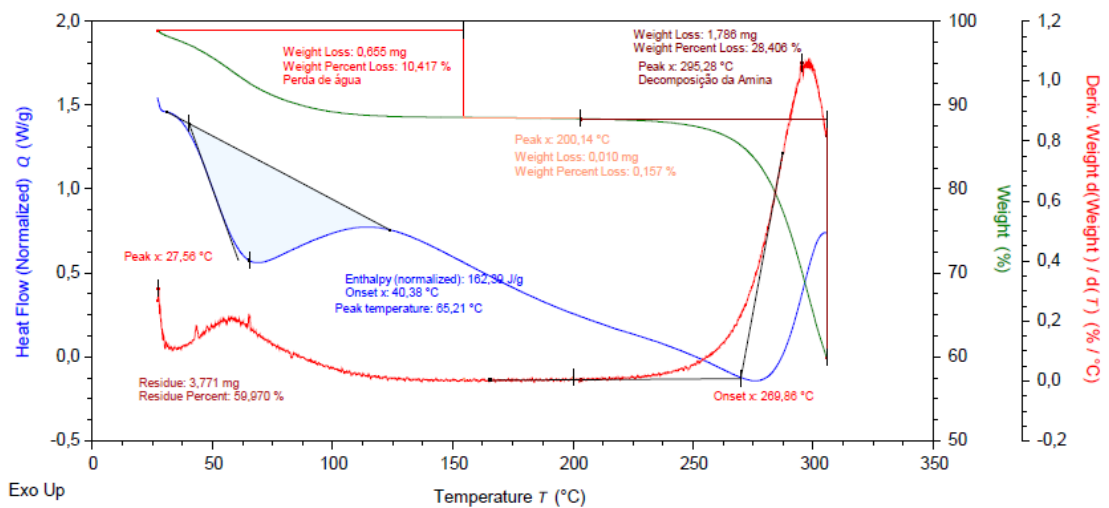
No conjunto de Figuras 23(A-H) é possível observar os termogramas para cada um dos componentes dos sistemas isoladamente e para as MPs. As linhas em verde são os dados referentes às perdas de massa, com a sua derivada em vermelho, e as linhas azuis são relacionadas com os dados de DSC.



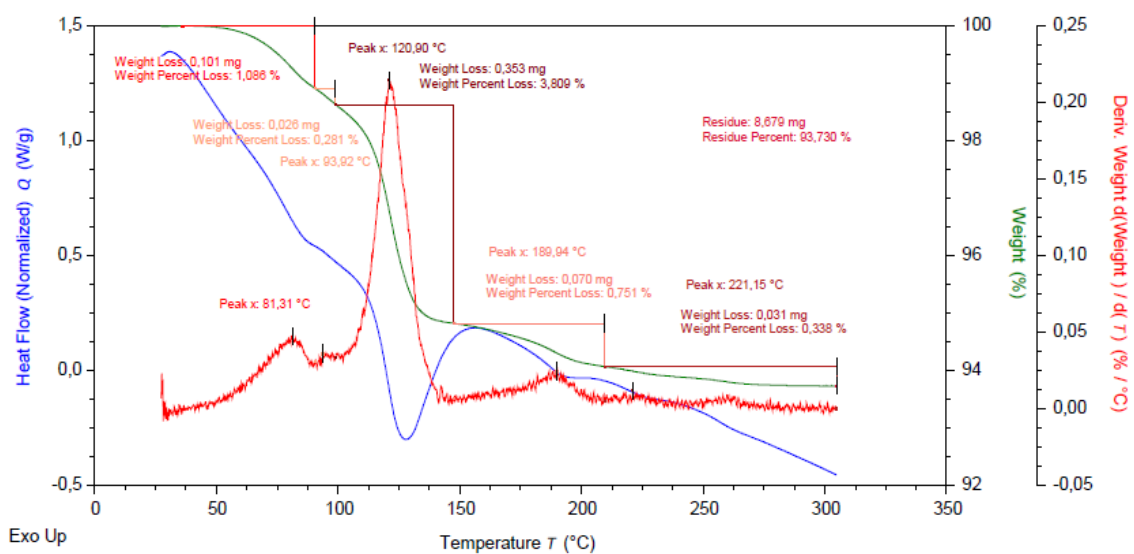
A)Termograma da Curcumina



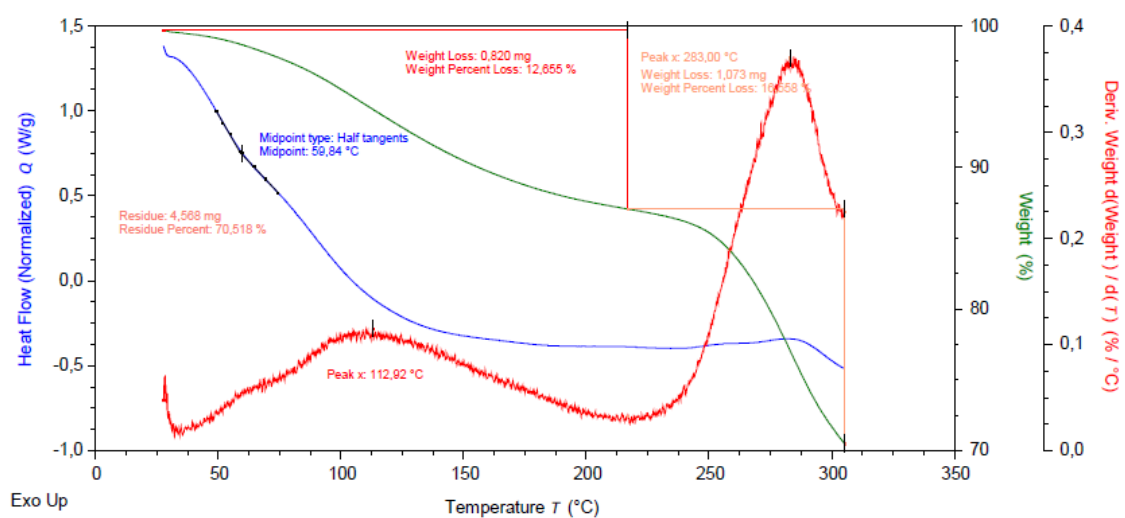
B) Termograma do HPMC



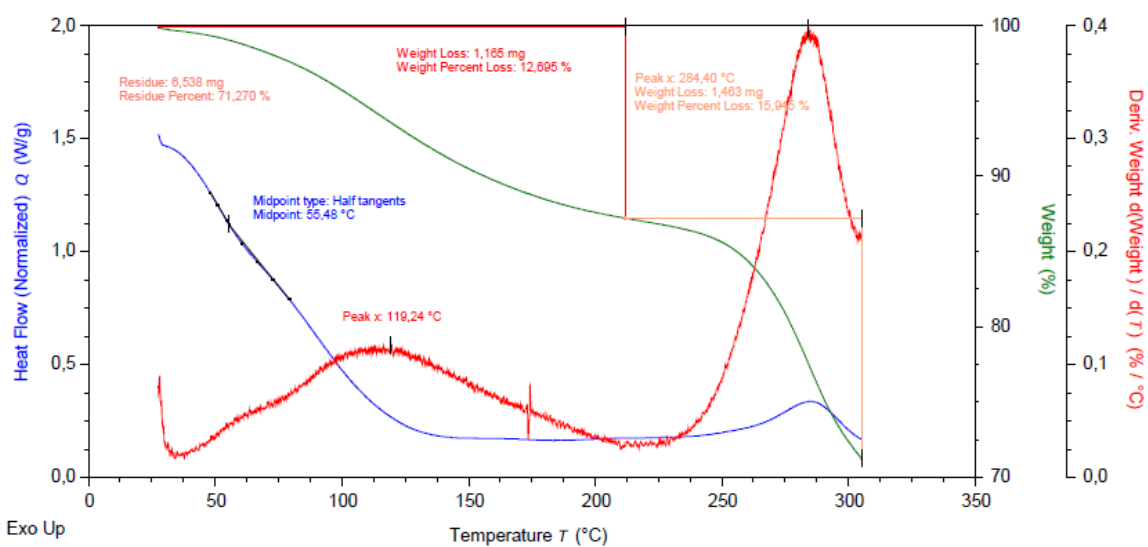
C) Termograma da quitosana



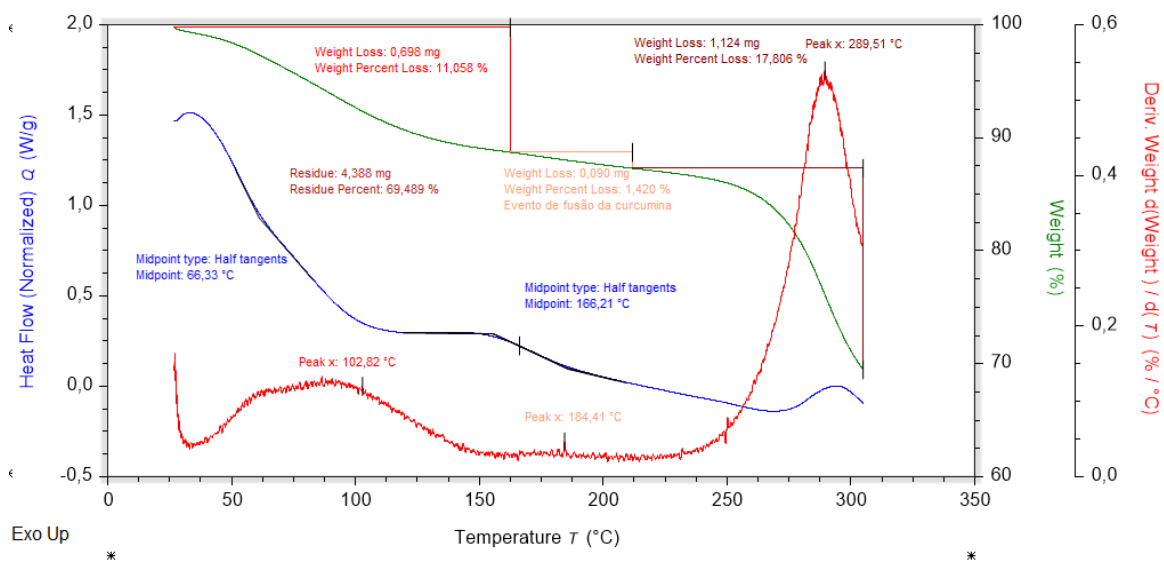
D) Termograma do TPP



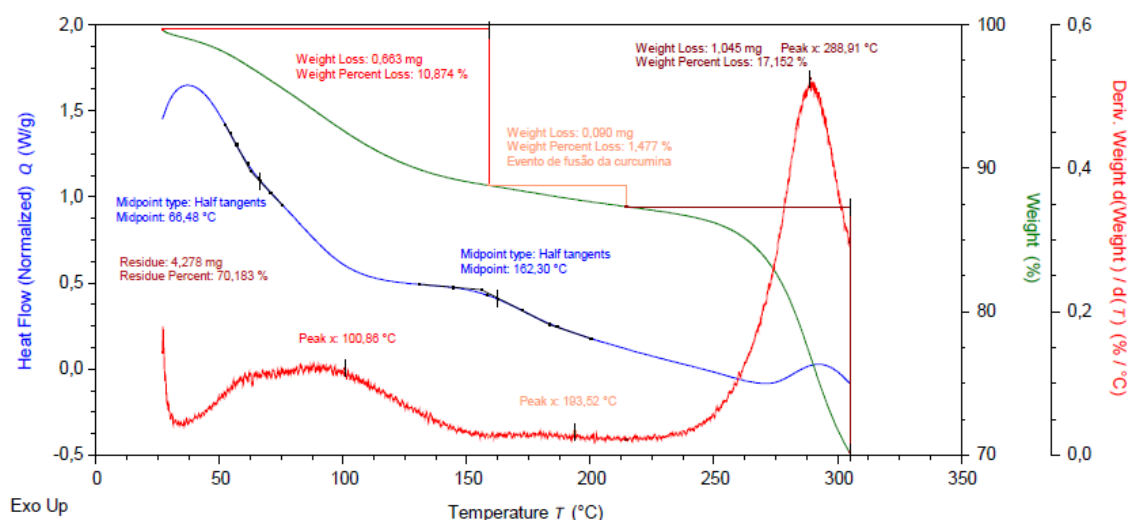
E) Termograma das MPs brancas não liofilizadas



F) Termograma das MPs brancas liofilizadas



G) Termograma das MPs contendo curcumina não liofilizadas



H) Termograma das MPs contendo curcumina liofilizadas

FIGURA 19. TERMOGRAMAS ANALISADOS DOS MATERIAIS E MPS.

4.2.6.1. TG/DTG

Em todos os termogramas mostrados para cada um dos materiais utilizados neste trabalho, é possível observar que o processo de perda de massa não ocorre em uma única etapa. Cada etapa de perda de massa está relacionada com evento moleculares que ocorrem em função da adição de calor no sistema (Vyazovkin et al., 2018). Nos termogramas, ainda estão indicados o percentual de perda de massa em cada uma das etapas.

Para a curcumina é possível observar que as perdas de massa ocorrem em três etapas. A primeira está relacionada à desidratação e evaporação de água, a segunda e a terceira etapa estão relacionadas com o início do processo de degradação do composto (Parize et al., 2012).

Para a quitosana e o HPMC, ambos conservam estruturalmente algumas semelhanças. Desta forma, a análise pode ser feita conjuntamente. Em ambos o processo ocorre em três etapas, havendo uma desumidificação, uma segunda etapa de desidratação, com remoção da água que está mais fortemente interagindo com as cadeias poliméricas e finalmente a degradação da cadeia polimérica na terceira etapa de perda de massa (Verma & Garg, 2004). Para o HPMC as curvas de perda de peso mostraram que a remoção de água a 27°C, com perda de 4,45% de massa e continua até 142°C, com perda de menos de 1% de massa. Acima de 200 °C, uma redução adicional do peso da amostra (2,85%) indicou o início da degradação da hipromelose (Cespi et al., 2011). Na quitosana este processo começa a 40 °C e se estende até cerca de 110°C com perda de água de cerca de 10% da massa total do material. Uma segunda etapa de perda de massa vai até 200°C e a partir daí inicia-se o processo de degradação polimérica (Neto et al., 2005), com perda de massa de 28%.

O Termograma do TPP apresenta cinco regiões de perda de massa. Por se tratar de um cristal, com estrutura dos cristalitos variada, bem como com diferentes intensidades de interação com a água, e devido ao fato de ser solúvel neste solvente, as interações com a água vão ocorrer de modo diferente. O primeiro evento ocorre antes de 90°C com perda de massa de 1,08%; segundo em 93°C, com perda de 0,28%; o terceiro próximo à temperaturas de 120°C com perda de massa de 3,8%; o quarto evento entre 176°C e 201°C com perda de 0,462% e o quinto evento foi entre 220°C e 369°C com perda de massa de 0,751%. Dessa forma, a primeira etapa de degradação correspondeu a uma perda de água de superfície e as perdas subsequentes foram devido à superfície de área reduzida do sal (COSTA, n.d.)

As MPs sem curcumina apresentam eventos de perda de massa em duas etapas. O primeiro evento, com perda de massa de 12%, ocorre com pico a 120°C, e uma possível explicação para isso pode ser que tais eventos podem

estar relacionados com as perdas de massa de desumidificação e desidratação dos polímeros. Posteriormente, é possível visualizar um evento de perda de massa marcante, com 16% de perda de massa, com pico a 283-284°C, que pode ser associada ao início da degradação de um dos polímeros, provavelmente da quitosana, por apresentar isoladamente temperaturas de degradação mais baixas que o HPMC (Porfirio et al., 2015). Como era de se esperar, as MPs não liofilizadas apresentaram um pouco mais de perda de massa percentual (71%) que as MPs liofilizadas (70%). Isso se deve ao maior conteúdo de água das primeiras MPs.

Nas MPs contendo curcumina é possível observar três eventos de perdas de massa, dois semelhantes aos que foram discutidos anteriormente, para as MPs sem curcumina. O primeiro evento ocorreu a uma temperatura mais baixa, pico a 100°C, indicando que as interações destes sistemas com a água ocorrem de modo menos intenso, o que é reforçado pela menor perda de massa de água, cerca de 10% nestes sistemas e 12% nos primeiros. O segundo evento é muito semelhante ao observado no termograma da curcumina, no seu evento de fusão, em cerca de 180°C, o que pode ser indicativo de um evento relacionado com a curcumina. E o terceiro evento, a 288°C, sofreu um leve deslocamento, quando comparado às MPs brancas, para uma temperatura maior, o que pode ser relacionado com um efeito termoestabilizador da curcumina, devido a uma interação da curcumina com o grupo amino da quitosana, que estabiliza mais o sistema energeticamente, aumentando assim a necessidade de adição de temperatura para iniciar a degradação deste polímero. O primeiro e o terceiro evento encontram apoio um no outro, visto que os principais grupos que interagem com água na quitosana são as amina e hidroxilas. No caso de a curcumina interagir com estes grupos, especialmente a amina, a água perde grupos químicos interativos, reduzindo assim a sua proporção nas MPs com curcumina. Essas suposições e observações são compartilhadas por Neto et. al. (Neto et al., 2005)

4.2.6.2. DSC

O termograma da curcumina mostra um pico endotérmico, a aproximadamente 181,88°C, correspondente aos dados de literatura para a sua temperatura de fusão (180-182°C)(Fugita et al., 2012). Após o evento de fusão é

possível acompanhar uma região exotérmica da linha de base do termograma, indicando uma subsequente degradação da cucumina (Fugita et al., 2012).

As curvas de DSC do HPMC mostra uma um vale endotérmico inicial, relacionado com a evaporação de água, e uma decrescente posterior, que pode se relacionar com o movimento das moléculas com aumento de temperatura. Entre 142,5°C e 174,37°C foi possível atribuir à Tg do HPMC, sendo que em muitos trabalhos essa temperatura é observada em 152°C, 154°C, 157°C e até mesmo 180°C, essas variações estão relacionadas a variações nas cadeias poliméricas, mas especialmente ao conteúdo de água do material (Ford, 1999). Para o HPMC elevados teores de água são capazes de reduzir a sua Tg, considerando uma perda de massa atribuída à desidratação para o material estudado de 4,5%, pode-se justificar essa variação pelo seu elevado conteúdo de água.

A curva de DSC da quitosana mostra um vale inicial, com um ponto em destaque em 65.21°C, que neste trabalho, foi atribuído à uma transição vítrea (Tg) da quitosana. Apesar de a Tg da quitosana ser alvo de debates, com autores discordando sobre a sua localização e este parâmetro ser dependente do grau de acetilação, teor de umidade e tamanho da cadeia polimérica. Lazaridou e Biliaderis em 2002, sugeriram que a Tg da quitosana está compreendida em uma região de temperatura que vai de -23°C a 67°C.

As curvas de DSC do TPP mostram vários vales endotérmicos, associados a etapas de desidratação dos cristais.

Nos gráficos de DSC das MPs brancas é possível observar uma transição vítrea a uma região de temperatura de 55 a 60°C, associada à quitosana. Para o sistema liofilizado foi possível observar que a Tg ocorre a uma temperatura mais baixa, isso pode ser associado ao fato de que a liofilização é um processo que promove a amorfização de sistemas contendo polímeros. Como a liofilização só foi realizada após a secagem do material isso pode ter ocorrido em uma extensão muito pequena, o que justificaria a pequena variação. Essa explicação encontra fundamentação quando se observa o tamanho estimado de cristalito (DRx) para as MPs brancas liofilizadas ou não, onde as MPs liofilizadas apresentam tamanho de cristalito muito menor que as MPs não liofilizadas. Para

o HPMC não foi possível verificar uma região específica demarcando algum evento térmico nas MPs brancas.

Nos gráficos de DSC das MPS contendo curcumina, liofilizadas ou não, é possível observar duas regiões de transição vítrea. A primeira como foi discutido anteriormente, relacionada à quitosana, neste caso não houve variação da Tg em ambos os casos (MPs Cur), que ocorreu em 66°C. Quando comparado com as MPs brancas, é possível verificar que a Tg se deslocou para uma temperatura mais elevada, fato também observado para o HPMC.

Para o HPMC, é possível verificar eventos de Tg em 162°C (liofilizado) e 166 °C (não liofilizado). Aparecem regiões associadas à transição vítrea do HPMC, porém em temperaturas mais elevadas quando comparada com os dados observados para o polímero puro. Ainda é possível observar eventos de perdas de massa, associados à curcumina em temperaturas mais elevadas que a temperatura de fusão desta molécula, o que pode ser indicativo de que a sua forma cristalina original foi alterada. Essas informações, nos levam a crer, que a presença da curcumina nos sistemas, interagindo com os dois polímeros exerce um efeito estabilizador termodinâmico sobre os polímeros, representado pelo deslocamento das temperaturas de Tg dos materiais, para temperaturas maiores para os polímeros. No caso da curcumina interações polímeros-curcumina, atuam, aumentando a sua temperatura de fusão, eventos de mudança de temperaturas de fusão da curcumina, interagindo com quitosana também já foram observados por Parize e colaboradores em 2012 e Pan e colaboradores em 2006. Associando essas inferências aos dados de DRx que mostram um perfil altamente amorfo de ambos os sistemas, que encontra fundamentação teórica na base teórica utilizada para explicar a formação de dispersões sólidas. É possível que os polímeros possam interagir com a curcumina dissolvida em um meio (contendo tensoativo) a fim de impedir sua recristalização numa forma cristalina, o que a tornaria mais solúvel e no caso destes estudo mais estável (Boruah et al., 2012; Das, 2013).

4.2.7. Eficiência de encapsulação e teor

A análise dos resultados abaixo permite inferir que não há diferenças significativas de teor e eficiência de encapsulação entre as MPs liofilizadas e não liofilizadas. A tabela 5 mostra os dados para as MP liofilizadas e não liofilizadas contendo curcumina.

TABELA 5. PARÂMETROS DE EE% E TEOR DE CURCUMINA NAS MPS

MP	EE%	Teor
Liofilizada	55,91% $\pm$ 0,22%	0,0838 $\pm$ 0,0004 mg.mg (eqv. 8,4%)
Não liofilizada	55,46% $\pm$ 4,11%	0,0754 $\pm$ 0,0073 mg.mg (eqv. 7,5%)

A eficiência de encapsulação das MPs liofilizadas e não liofilizadas, bem como o teor de fármaco encapsulado não diferiram significativamente ($P > 0,05$), isso era esperado já que o método de encapsulação utilizado foi o mesmo. Entretanto, é possível observar que as MPs liofilizadas, quando ignotos os valores de desvio padrão, parecem apresentar valores superiores, isso está associado ao fato de que a liofilização remove a água que ainda está nas MPs, que foram secas por método convencional. Essa remoção de água promoveu uma redução da massa das MPs e como consequência disso, é possível observar um leve aumento da massa de fármaco em relação ao total da MP.

Já uma análise mais cuidadosa do desvio padrão mostra uma variabilidade maior das MPs não liofilizadas. Isso se justifica pelo fato de que a liofilização posterior à secagem aberta promove uma remoção de água semelhante, pois se trata de um processo que ocorre em um ambiente com condições de secagem padronizadas e semelhantes. Isso promove a remoção de quantidades muito parecidas de água do sistema o que não ocorre com o método de secagem aberta.

De modo geral, com valores acima de 50%, podemos considerar que os sistemas apresentaram elevada eficiência de encapsulação, quando comparado à média de sistemas obtidos por meio da técnica de geleificação ionotrópica (Ng et al.,

2020). (Hwang & Shin, 2018) obtiveram valores de eficiências de encapsulação (%) de micropartículas de pectina-quitosana carregadas com curcumina que variaram entre 42 e 62%.

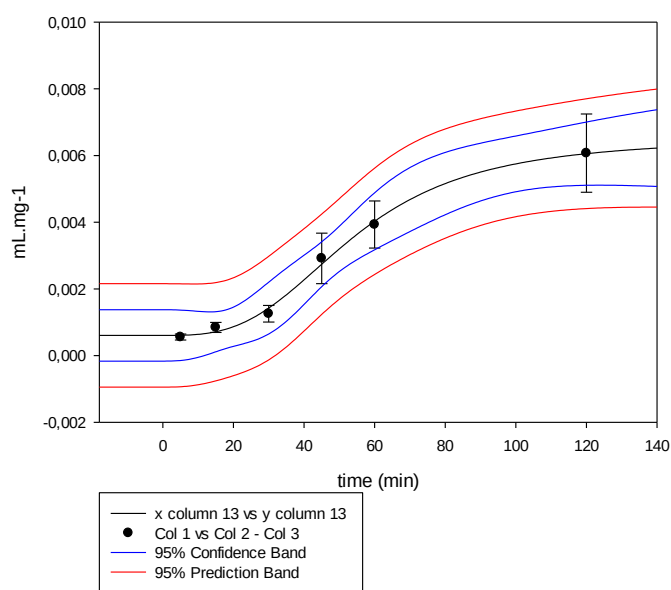
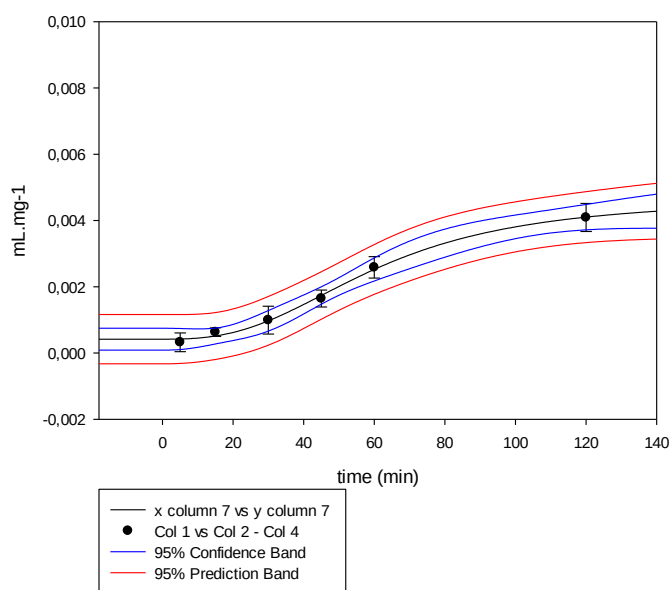
O fato de a geleificação ionotrópica ser uma técnica em que a partícula fica em um meio líquido durante a sua formação permite que o fármaco migre para o meio em questão (solução de TPP), soma-se a isso o fato de que as partículas foram adicionadas de tween-20 que promove um aumento de solubilidade da curcumina na água, sendo assim a perda de fármaco durante a formação das MPs, por meio da geleificação já era um fenômeno previsto.

4.2.8. Absorção de Líquidos

O estudo do perfil de absorção de líquido de uma matriz polimérica candidata a ser um sistema farmacêutico de liberação controlada, oferece importantes informações sobre a captação de água (normalmente) que é um processo físico-químico importante que, em última análise, influencia a cinética de liberação do fármaco. Portanto, este parâmetro deve ser entendido e criteriosamente com objetivo de se obter um sistema de liberação realmente controlado (Rapier et al., 2021).

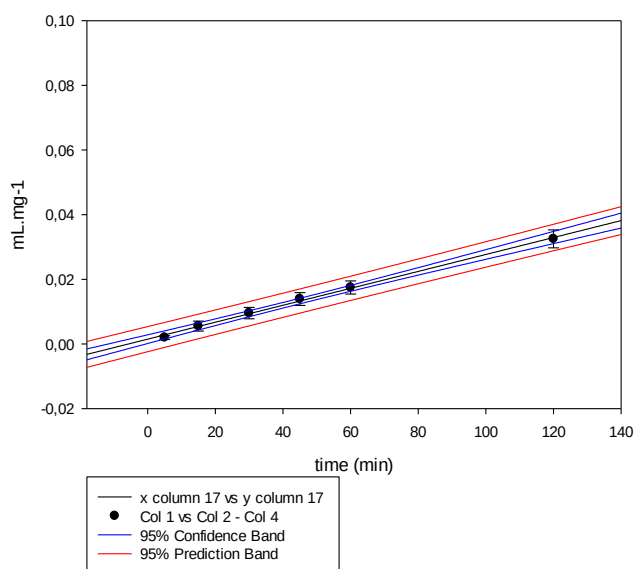
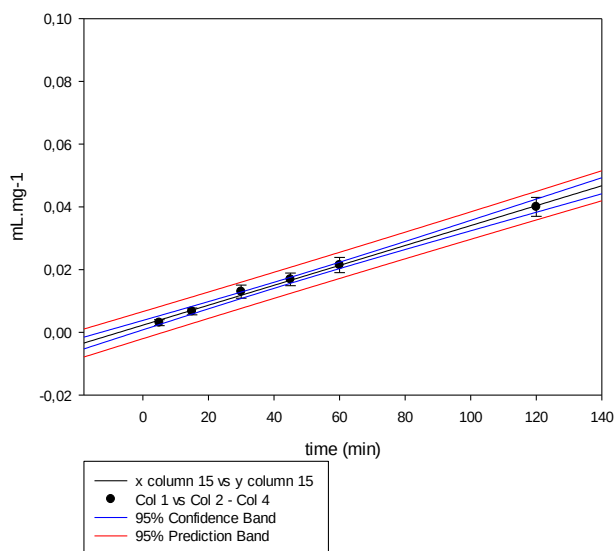
As MPs são constituídas pela quitosana e pelo HPMC, ambos solúveis no meio testado; entretanto, a quitosana necessita de uma etapa adicional de reprotonação para interagir com o solvente, já o HPMC não necessita e sua reidratação é mais rápida.

Na Figura 20 é possível visualizar o perfil de absorção de líquido de cada um dos sistemas.



A) MPs Branca sem liofilizar

B) MPs Curcumina sem liofilizar



C) MPs Branca liofilizada

D) MPs Curcumina liofilizada

FIGURA 20. PERFIL CINÉTICO E MODELO AJUSTADO PARA O ESTUDO DE ABSORÇÃO DE LÍQUIDOS DAS MPS

Os sistemas apresentam diferenças consideráveis entre os perfis de absorção de líquido. É possível verificar duas tendências de absorção de líquido, uma

sigmoide para os sistemas secos sem a liofilização e um linear para os sistemas que foram liofilizados após a secagem.

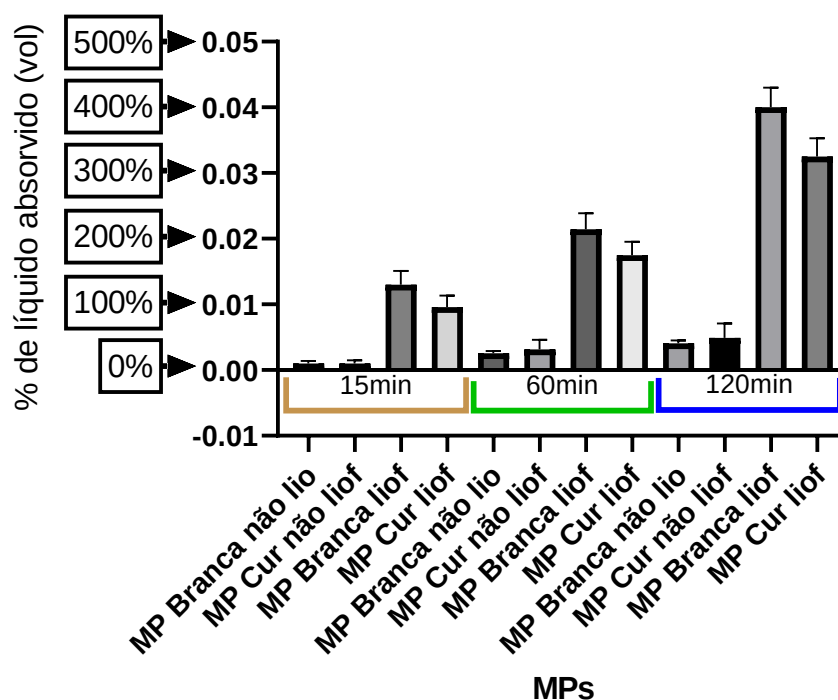


FIGURA 21. PERCENTUAL DE LÍQUIDO ABSORVIDO POR CADA TIPO DE MP EM DIFERENTES TEMPOS.

Uma das principais observações do experimento, pode ser mais adequadamente observada, ainda no gráfico da figura 20, é o fato de que as estruturas liofilizadas não apresentaram cinética de absorção diferentes entre si, indicando que neste caso o fato de estar amorfo ou não, não interferiu significativamente sobre o perfil de absorção de líquido (linear). Os modelos lineares são geralmente indicadores de processos que as suas velocidades são dependentes apenas do tempo, e consequentemente são processos com taxas mais elevadas (Siepmann & Peppas, 2012). A outra observação, que pode ser vista na Figura 21, é o fato de que as estruturas liofilizadas durante todo o experimento são capazes de absorver, aproximadamente 10 vezes mais líquido do que as estruturas não liofilizadas.

É possível observar que os sistemas não liofilizados apresentaram perfil cinético de absorção de líquido semelhantes entre si, e a MP branca liofilizada, apresentou um volume de absorção de líquido maior que os demais. Isso pode se correlacionar com as imagens observadas por MEV, que mostram muitos vacúolos

na estrutura interna da MP associada à ausência de curcumina, uma molécula lipofílica, com baixa afinidade pela água, e ainda somando-se à hipótese de que os polímeros podem estar interagindo com a curcumina e, portanto apresentando menos sítios de interação com líquido é uma hipótese razoável.

Uma outra observação é que pela técnica de DRx, as estruturas não liofilizadas mostram que ambas conservam estruturas cristalinas, com tamanhos de cristalitos sensivelmente diferentes. Materiais com cristalitos (e menos amorfos) menores tendem a ter cinética e solubilidade menor que os amorfos, pois representam menos sítios de interação com a água, entretanto cristalitos menores são mais solúveis que os materiais (mesmos materiais) que apresentam cristalitos maiores. Por isso, sistema branco sem liofilizar, com cristalitos maiores, se ajusta melhor ao modelo sigmoidal, que é caracterizado por uma etapa, inicial lenta de absorção, o que não é visto no sistema branco liofilizado, que apresenta uma cinética linear, com velocidade constante durante todo o experimento, com volume de líquido absorvido, maior do que do modelo sigmoide.

4.2.9. Estudo de liberação *in vitro* da curcumina a partir de micropartículas gastroretentivas.

Como já foi citado anteriormente, antes de se realizar os ensaios de liberação é fundamental conhecer a dose de fármaco a que se pretende testar, a eficiência de encapsulação e teor, bem como estabelecer a condição *sink* do meio de dissolução. O valor para a condição solubilidade da curcumina no meio de dissolução testado é de $0,447934 \pm 0,010619 \text{ mg.mL}^{-1}$. Assim a condição *sink* deverá ter capacidade de dissolver de 5 a 10 vezes a concentração de fármaco que será testada.

4.2.8.1. Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* da curcumina

Os sistemas de liberação modificada de fármacos são planejados com objetivo de contornar algumas limitações relacionadas ao fármaco ou ao processo de absorção, focando sempre na efetividade e segurança. Tais sistemas são capazes de melhorar a biodisponibilidade, e dirigir a entrega de fármacos para um microambiente específico, local de ação ou órgão. Adicionalmente, o adequado planejamento dos sistemas de liberação modificados pode conferir melhor adesão

do tratamento por reduzir a necessidade posológica, por serem capazes de liberar os fármacos por longos períodos. (Pandey et al., 2018).

Os ensaios de liberação/perfil de dissolução são estudos *in vitro* capazes de estabelecer boa correlação com a biodisponibilidade *in vivo*. A partir deste tipo de estudo é possível estabelecer um perfil cinético de liberação do fármaco nas condições fisiológicas desejadas, bem como a taxa com que este processo ocorre. Assim é possível classificar um sistema, de acordo com o seu perfil de liberação, como sistema de liberação rápida, média, muito rápida ou lenta/controlada (Costa & Sousa Lobo, 2001; Spagnol et al., 2018).

A liberação do fármaco a partir de matrizes poliméricas costuma ser mais lenta e sustentada que as formas farmacêuticas convencionais, e o processo é dirigido por etapas não necessariamente sequenciais, mas que tem relação direta com as características físico-químicas dos materiais utilizados. Os principais eventos envolvidos na liberação de um fármaco a partir de sistemas farmacêuticos matriciais poliméricos são: hidratação, intumescimento, difusão e erosão ou mesmo desintegração (Andréia B Meneguín et al., 2018).

Para a realização dos ensaios de liberação é preconizado o uso de equipamentos específicos munidos de aparatos adequados para cada forma farmacêutica a que se deseja investigar. As farmacopéias instituem o uso de equipamentos dissolutor, podendo ser usado diversos tipos de *aparattus*, os mais utilizados são o I (cestas) e o II (pás) (USP 26-NF 21, 2003).

Os cestos são aparatos que apresentam como principal vantagem o confinamento da amostra em um espaço reduzido, eliminando o viés da convecção de formas farmacêuticas de dimensões reduzidas e prevenindo a flutuação ou a adesão do sistema em alguma parte da cuba de dissolução ou mesmo nas pás. Entretanto, cuidado adicional deve ser tomado para que o meio esteja adequadamente degaseificado para evitar a formação de bolhas, além de que a quantidade de sistemas farmacêuticos seja adequada para o cesto escolhido, a fim de evitar que as MPs se aglomerem e mantenham-se grudadas, reduzindo a área de contato com o meio, bem como a deposição de bolhas nos poros do cesto ou da própria forma farmacêutica. Esses cuidados podem reduzir sensivelmente os problemas relacionados à reprodutibilidade do método.

Fatores relacionados às características físico-químicas do sistema também devem ser cuidadosamente avaliados antes do estudo de liberação, pois são responsáveis pela alteração do perfil de dissolução e liberação do fármaco. Os principais fatores são: a solubilidade do fármaco e dos polímeros formadores das MPs, o tamanho, densidade e esfericidade de partícula, o polimorfismo, grau de cristalinidade (tamanho do cristalito) e estado vítreo dos polímeros, dentre outros. Parâmetros críticos de processo, como o método de secagem, liofilização ou secagem por leito fluidizado, podem interferir grandemente sobre o perfil de liberação dos fármacos.

Entretanto, antes da realização do ensaio de liberação é fundamental determinar alguns parâmetros para que os resultados obtidos possam refletir com o máximo de proximidade o resultado real. Primeiramente, deve-se estabelecer o meio de dissolução adequado para o experimento. Neste estudo, como o objetivo é a entrega e liberação de fármacos no estômago, o meio deve apresentar pH na faixa de 1,2-1,4, sendo necessário realizar ajuste para que se estabeleça a condição *sink* do meio para o fármaco em questão (Costa & Sousa Lobo, 2001; Gibaldi & Feldman, 1967; Timmermans & Moës, 1994).

Então, a partir dos dados encontrados para os tempos determinados para o ensaio de liberação, é possível realizar o ajuste dos dados a modelos estatísticos já existentes ou a sugestão de modelos empíricos, em que com a devida interpretação torna-se possível hipotetizar acerca dos eventos que governam os mecanismos de liberação encontrados na Figura 22 (Costa & Sousa Lobo, 2001).

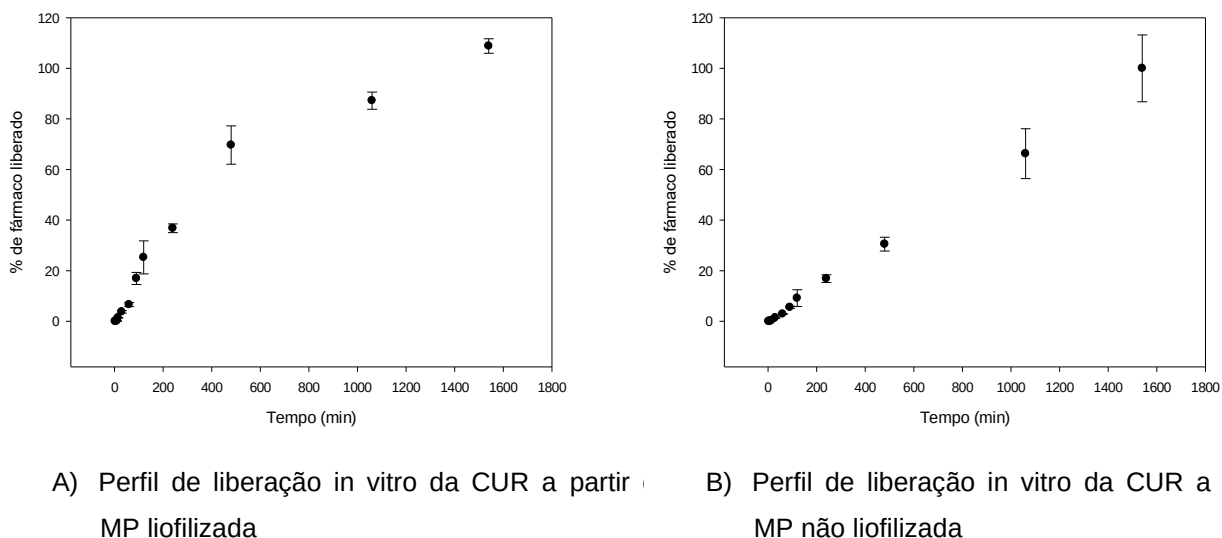


FIGURA 22. GRÁFICOS DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA PARA MP LIOFILIZADA E NÃO LIOFILIZADA

Nos gráficos da figura 22, obtidos a partir da triplicata do estudo de liberação é possível observar em A, que o processo de liberação ocorre a uma taxa mais rápida, com quase 80% do fármaco sendo liberado em 500 min. Já para o sistema não liofilizado, esse percentual de liberação só é alcançado após o dobro deste tempo. Isso mostra o quanto a liofilização foi capaz de impactar sobre o processo de liberação da curcumina, o perfil observado nos permite inferir que estamos lidando com duas formas farmacêuticas diferentes, MP liofilizada e MP. Apesar de diferentes ambos os sistemas são capazes de liberar 100% da curcumina em até 24 h e ao final observou-se a completa desintegração das MPs.

Em ambos os sistemas, também é possível perceber que nos tempos iniciais há um atraso na liberação da curcumina, não sendo possível observar efeito *burst*. Isto pode ter ocorrido como resposta ao fato de que a MP precisa inicialmente se molhar e subsequentemente reprotonar as cadeias de quitosana antes de dar início ao processo de liberação, somando-se a isso, existe o HPMC que é um polímero conhecido por diminuir as taxas de liberação e difusão de fármacos, por ser capaz de formar camadas gelatinosas, que tornam o perfil de liberação dos fármacos em meios aquosos (El Nashar et al., 2017). Este fenômeno é positivo, pois mantém a curcumina dentro da MP nos minutos iniciais, até que a quitosana esteja parcialmente protonada e capaz de aderir à mucosa gástrica, e liberar o fármaco neste local. Por ser capaz de se molhar a uma taxa mais elevada, o HPMC, desde o

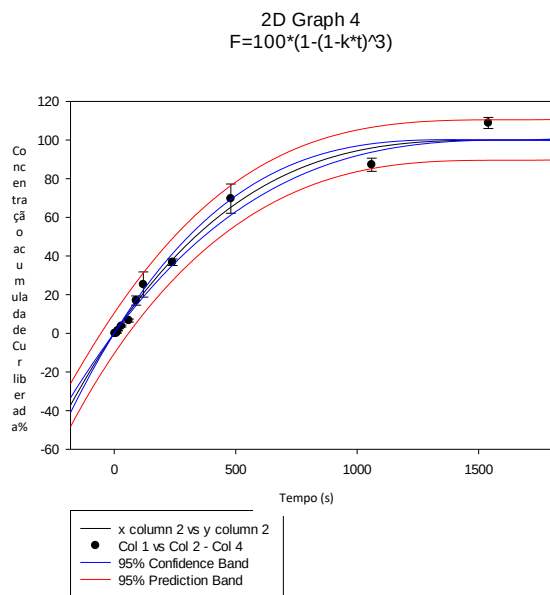
momento inicial, é responsável por formar uma barreira que auxilia na retenção da liberação do fármaco (A. Kumar et al., 2015).

Após observar os gráficos A e B, da figura 22, fica claro que os mecanismos de liberação a partir de cada um dos sistemas são diferentes ou apresentam composição de fenômenos que contribuem de maneira diferente. Tais eventos podem ser mais bem esclarecidos com o uso de modelos matemáticos adequados e bem ajustados para cada um dos processos cinéticos em questão.

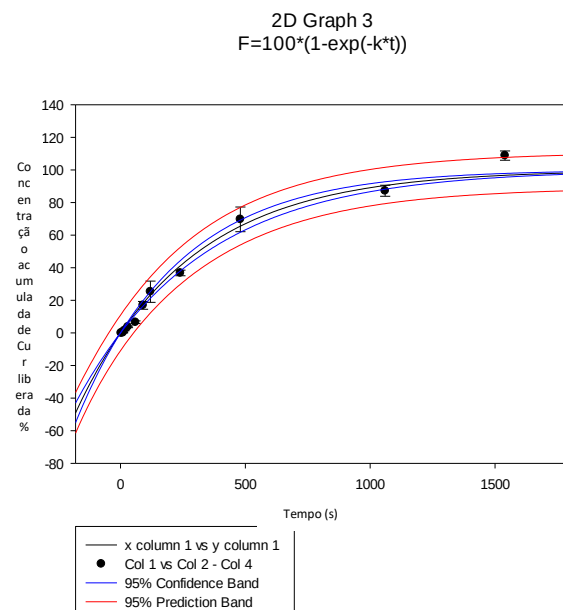
O mecanismo de liberação da curcumina a partir de cada uma das MPs de liberação foram avaliados através do ajuste dos dados aos modelos de Primeira-Ordem, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer-Peppas (Quadros 1 e 2). Os melhores ajustes para cada uma das MPs foram plotados graficamente (Figuras 23 e 24).

QUADRO 2. AJUSTE DE MODELOS PARA AS MPS LIOFILIZADAS CONTENDO CURCUMINA.

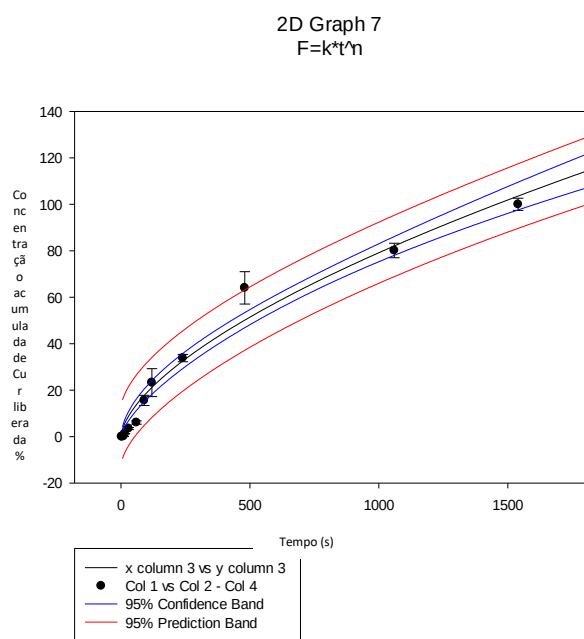
Modelo	Equação	n	K	R ²	W
Primeira ordem	$F=100*(1-\exp(-k*t))$		$0,0022 \pm 0,0001$	0,9791	0,8219
Hixon e Crowell	$F=100*(1-(1-k*t)^3)$		$0,0006 \pm 2,818E-005$	0,9808	0,8939
Higuchi	$F=k*\sqrt{t}$		$2,6614 \pm 0,0817$	0,9471	0,8983
Peppas	$F=k*t^n$	$1,1714 \pm 0,2514$	$0,6222 \pm 0,0311$	0,9682	0,7725



A) Hixon-Crowell



B) Primeira ordem



C) Korsmeyer-Peppas

FIGURA 23. MODELOS CINÉTICOS MELHOR AJUSTADOS PARA O ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DAS MPS LIOFILIZADAS

Os dados obtidos para o perfil de liberação de curcumina, a partir das micropartículas liofilizadas, podem ser vistos na Figura 23, e é possível observar no quadro 2 que se ajustaram, estatisticamente, melhor aos modelos cinéticos de Hixon-Crowell e de primeira ordem, determinado pelo valor de R2 em comparação com os outros modelos. Ainda que o modelo de Peppas não tenha sido o mais

adequado para as MPs supracitadas, o ajuste e uso do modelo de Korsmeyer-Peppas ajuda a compreender e categorizar o mecanismo de liberação do fármaco na difusão Fickiana, não Fickiana, transporte caso II e transporte Super Caso II (Dash et al., 2010).

Para a MP liofilizada o elevado valor de n (1,17), indica que a cinética de liberação da curcumina é um super caso II não Fickiana (Liechty et al., 2010; Peppas & Sahlin, 1996; Ritger & Peppas, 1987). O valor de $n > 0,85$ indicativo de uma geometria esférica é corroborado pelo aspecto visual das micropartículas, observados pela análise microscopia.

O mecanismo de liberação do tipo Super Caso II envolve uma relação entre a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros ou sistema polimérico e a temperatura de meio. A T_g do sistema estudado é maior que a temperatura em que foi realizado o experimento ($37,5^\circ\text{C}$), assim quando a temperatura do meio de liberação é menor que a T_g (por exemplo, polímeros vítreos), um mecanismo não-Fickiano é observado. A velocidade de penetração do solvente é a diferença mais importante entre os mecanismos não Fickianos de transporte do Caso II, Caso Anômalo e Super Caso II. No Caso II, a velocidade de penetração do solvente é menor que a relaxação polimérica. No caso de transferência anômala, a velocidade de relaxamento polimérico e difusão de solvente é igual. Finalmente, no transporte Super Caso II, a velocidade de penetração do solvente é alta, o que melhora o transporte do solvente (Garg & Gupta, 2008; Ritger & Peppas, 1987; Siepmann & Peppas, 2012).

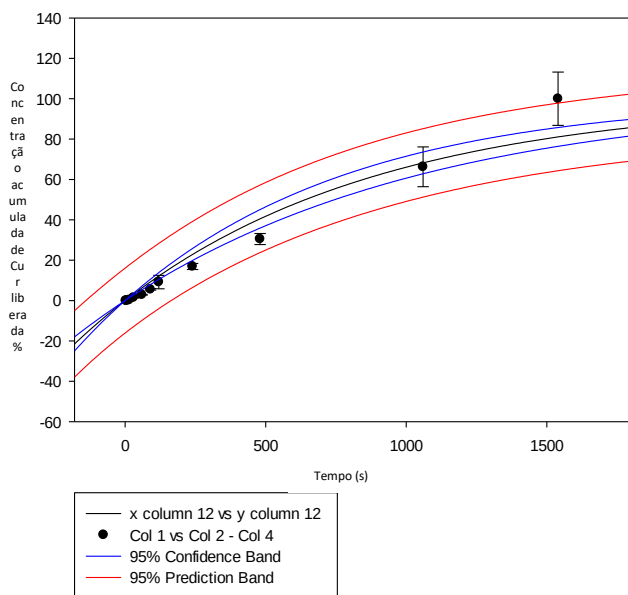
O resultado da modelagem cinética sugere que o mecanismo de liberação da curcumina foi devido à difusão através da matriz intumescida e, em certa medida, à porosidade da estrutura da matriz que é preenchida com água em vez de erosão. O modelo de primeira ordem diz muito a respeito do processo de transferência de curcumina para o meio, mostrando que a transferência da curcumina na matriz foi a etapa limitante.

Além da formação de uma rede gelatinosa, ainda que fraca, que em primeira instância, funciona como barreira física à difusão da curcumina para o meio, os dados de FTIR indicam que ocorrem interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre a curcumina e a MP, podendo indicar a existência de uma barreira química com papel importante sobre a liberação da curcumina no meio.

QUADRO 3. AJUSTE DE MODELOS PARA AS MP NÃO LIOFILIZADAS CONTENDO CURCUMINA.

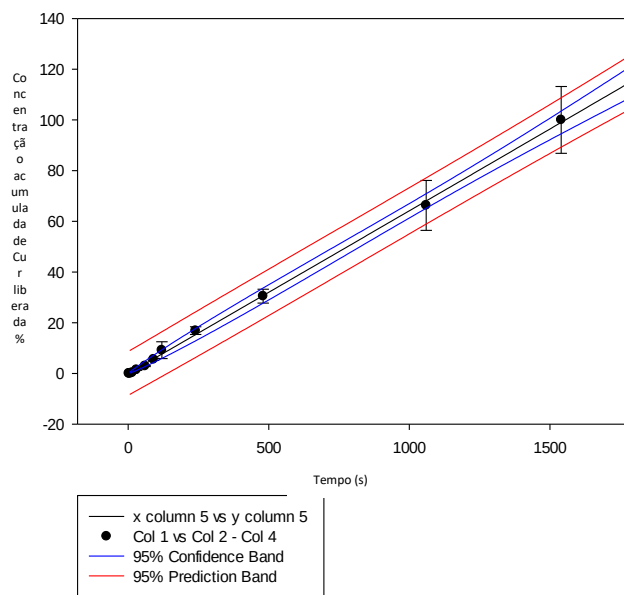
Modelo	Equação	n	K	R2	W
Primeira ordem	$F=100*(1-\exp(-k*t))$		0,0019 $\pm 7,4566*10^{-5}$	0,9846	0,8788
Hixon e Crowell	$F=100*(1-(1-k*t)^n)$		0,0003 $\pm 1,6521E-005$	0,9556	0,6960
Higuchi	$F=k*\sqrt{t}$		1,9703 $\pm 0,1169$	0,8467	0,7220
Peppas*	$F=k*t^n$	1,0044 $\pm 0,0464$	0,0622 $\pm 0,0206$	0,9820	0,7204

2D Graph 28
 $F=100*(1-\exp(-k*t))$



A) Primeira ordem

2D Graph 10
 $F=k*t^n$



B) Korsmeyer-Peppas

FIGURA 24. MODELOS CINÉTICOS MELHOR AJUSTADOS PARA O ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DAS MPS NÃO LIOFILIZADAS

Para as MP não liofilizadas, os modelos de primeira ordem e Peppas foram os que os dados melhores se ajustaram, respectivamente.

Este sistema parece reter mais a liberação da curcumina, apresentando taxas menores, quando comparado às MPs liofilizadas, que apresentam um perfil de liberação mais rápido, tendo liberado 60% da curcumina em 500min, enquanto o sistema não liofilizado apresenta este mesmo percentual de liberação, somente após 1000 min. Entretanto, em ambos os sistemas foi possível observar um perfil global, bastante semelhante.

Diferentemente das MPs liofilizadas, os sistemas não liofilizados apresentam uma liberação bastante linear e uma taxa mais lenta, indicando que apresentam um maior controle da liberação do fármaco. O que pode ser explicado pelo fato de que a não liofilização permite a formação de uma estrutura menos porosa e, talvez com mais ligações de hidrogênio inter- e intramolecular. As ligações de hidrogênio atuam como estabilizadores da estrutura da MP, dificultando a sua desintegração.

O modelo de primeira ordem foi inicialmente aplicado por Gibaldi & Feldman, em 1967, com base na lei da difusão de Fick. A taxa de liberação de um modelo de liberação de primeira ordem depende da concentração liberada. Em outras palavras, a força motriz em tais processos de liberação é a diferença entre a concentração de fármaco dentro e fora do revestimento do material encapsulado. A concentração do fármaco dentro das MPs (reservatório) diminui ao longo do processo de liberação, liberando o fármaco através da camada intumescida das MPs. O fato de o modelo de primeira ordem ser linear é comum e provável que ocorram desvios entre o modelo predito e o modelo obtido. (Gibaldi & Feldman, 1967).

Em ambos os casos foi possível observar que a liberação foi prolongada por 24 horas, podendo os dois sistemas serem considerados como sistema de liberação sustentada de fármacos, o que implica na liberação lenta e gradual do fármaco e no favorecimento da manutenção da concentração plasmática dentro da janela terapêutica. Esses sistemas apresentam a vantagem de propiciarem menor frequência de administração do medicamento, associado à reduzida incidência de efeitos colaterais e, conseqüentemente, uma maior adesão do paciente ao tratamento (Natarajan et al., 2014).

Os perfis de liberação de curcumina no meio gástrico simulado são próximos dos observados em outros trabalhos que desenvolveram micropartículas utilizando quitosana reticulada com TPP, ou quitosana complexada com alginato (Akolade et al., 2018). Porém, em nosso estudo foi possível liberar toda a curcumina no período de 24h o que não foi observado no estudo citado. Essa informação é um forte indicador que grande parte do perfil e do processo de liberação da curcumina a partir das MPs obtidas é regido majoritariamente pela quitosana; entretanto, existe uma participação importante do HPMC, que permite a completa desintegração da partícula.

4.2.10. Estudo de Mucoadesão in vitro.

A força mucoadesiva indica a força necessária para destacar o disco de mucina da amostra após o contato, enquanto o trabalho de adesão considera a força de desprendimento versus o perfil de deslocamento (Popeski-Dimovski, 2015; Rossi et al., 2014). Na Figura 25 e tabela 6 é possível visualizar os dados e comparar numericamente essas informações.

Trabalho e força de mucoadesão para as MPs

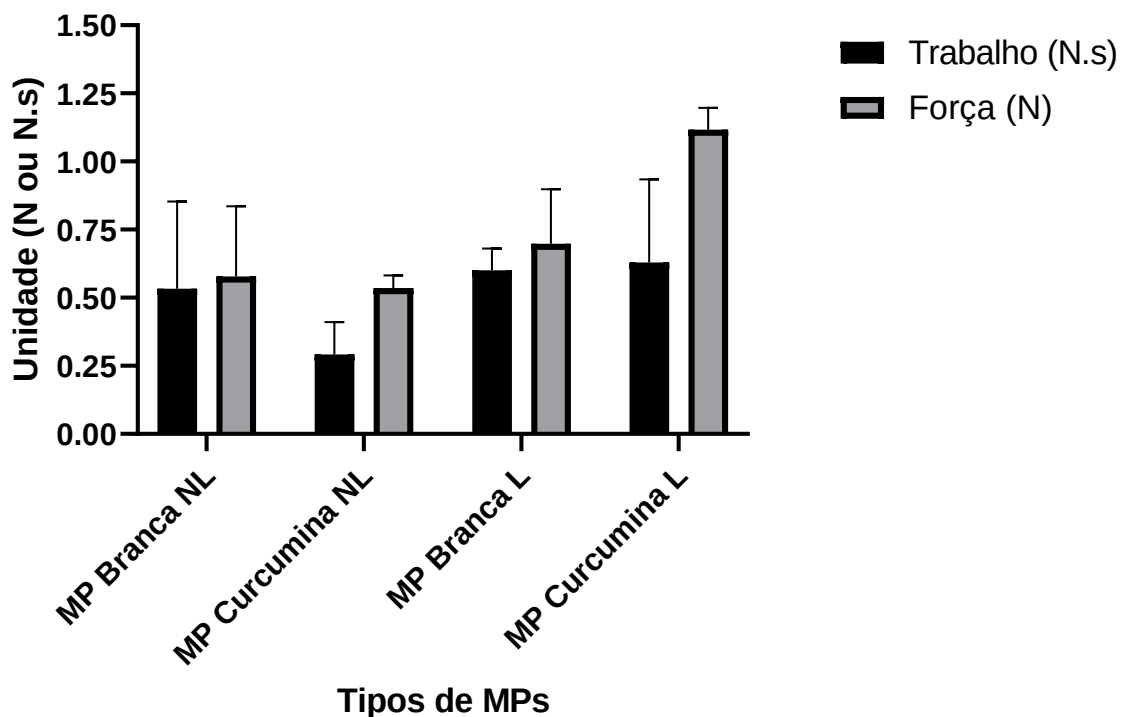


FIGURA 25. GRÁFICO DOS DADOS COMPARATIVOS PARA TRABALHO DE ADESÃO (ESQUERDA) E FORÇA MUCOADESIVA (DIREITA), PARA AS MPS. B NL- BRANCA NÃO LIOFILIZADA; CUR NL-NÃO LIOFILIZADA CONTENDO CURCUMINA; B L- BRANCA LIOFILIZADA; CUR L-LIOFILIZADA CONTENDO CURCUMINA.

TABELA 6. TRABALHO DE MUCOADESÃO E FORÇA DE MUCOADESÃO E AVALIADOS COM DISCO DE MUCINA DAS MICROPARTÍCULAS FORMADAS.

Amostra	Trabalho (N.s)	Força (N)
MP Branca NL	0,533 ± 0,320	0,578 ± 0,257
MP Curcumina NL	0,292 ± 0,118	0,536 ± 0,046
MP Branca L	0,601 ± 0,080	0,698 ± 0,200
MP Curcumina L	0,629 ± 0,305	1,117 ± 0,080

Ambos os parâmetros não demonstraram diferença estatística entre as amostras analisadas ($p < 0,05$), indicando que o processo de liofilização bem como a inserção de curcumina não impactou nas propriedades mucoadesivas da micropartícula. Entretanto, é possível observar que para ambos os parâmetros, elevados valores de desvio padrão foram encontrados. Isso já foi reportado em diversos outros estudos envolvendo análise de mucoadesão pelo método em questão e valores elevados tanto para DP quanto pra coeficiente de variação já foram reportados por trabalhos semelhantes (Jones et al., 1997; Marques et al., 2017). Adicionalmente, os valores obtidos de trabalho de mucoadesão e de força mucoadesiva contemplam o que é encontrado na literatura para o tipo de sistema desenvolvido, demonstrando o potencial mucadesivo das micropartículas produzidas no presente trabalho (Boni et al., 2021; Moreno et al., 2018).

O mecanismo de mucoadesão não pode ser explicado através de uma única teoria, sendo este fenômeno resultado de interações mecânicas e físico-

químicas entre os materiais que estão interagindo (Boddupalli et al., 2010). Atualmente, o processo de mucoadesão entre sistemas contendo polímeros carregados eletricamente como a quitosana pode ser, parcialmente, explicado, majoritariamente pela interação de cargas positiva do polímero e negativas do ácido siálico presente no muco, bem como o estabelecimento de ligações de hidrogênio e força hidrofóbicas com os componentes do muco (Sogias et al., 2008). No caso do HPMC, que não possui carga, a explicação mais provável é o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre os componentes do muco e este polímero (Zhang et al., 2021). É importante que fique claro que este é um processo dinâmico, que envolve e utiliza conceitos das teorias da molhabilidade, elétrica, adsorção e interpenetração (Carvalho et al., 2010; Khutoryanskiy, 2014; M Ways et al., 2018; Peppas & Sahlin, 1996), para explicar satisfatoriamente adesão das MPs. Deste modo, as interfaces devidamente hidratadas podem estabelecer interações iniciais entre as interfaces, seguindo-se do desenovelamento e a interpenetração das cadeias poliméricas, com a interação dos polímeros com componentes do muco por diversos tipos de interações intermoleculares e formação de regiões de forte atração intermolecular, atuando como uma espécie de “engate mecânico e molecular” que mantém as MPs aderidas à região.

O fato de que as MPs apresentaram resultados muito semelhantes, indicando que nem o processo de liofilização, nem a inclusão de curcumina impactaram sobre esta propriedade, deve ser encarado como um ponto positivo e vantajoso para este tipo de sistema, indicando que as MPs obtidas são sistemas farmacêuticos bastante robustos quanto à esta propriedade, podendo veicular outras moléculas, a priori, sem perder a sua mucoadesividade.

4.2.11. Ensaio do efeito gastroprotetor *in-vivo*

A ação anti-úlcer/gastroprotetora medida no presente estudo reflete o efeito gastroprotetor dos tratamentos testados. Os tratamentos foram confrontados com os dados de controle (animais que não receberam nenhum tratamento e foram expostos à indometacina) e com os animais tratados com omeprazol. Os animais pertencentes ao controle negativo, iogurte, não apresentaram indícios de úlcera.

As análises estatísticas de controle mostram a presença de valores discrepantes da população testada. A tabela 7 mostra o teste de Grubbs para todos os tratamentos e a tabela 8 mostra os valores removidos. A remoção destes valores foi importante para evitar que possíveis erros sistemáticos capazes interferir nas inferências estatísticas e poder dos testes utilizados.

TABELA 7. SUMÁRIO DE DADOS PARA TESTE DE GRUBBS.

Variável	N	Média	DesvPad	Mín	Máx	G	P
CP	7	29,8	27,5	12,1	79,0	1,79	0,241
OMP	8	3,306	1,253	1,150	5,560	1,80	0,330
LB	7	21,65	12,64	12,26	43,66	1,74	0,027
NLB	8	14,24	12,11	2,18	36,76	1,86	0,253
LCur	8	8,70	4,66	4,34	19,32	2,28	0,009
NLCur	8	7,06	5,34	0,00	17,15	1,89	0,218
C2Cur	6	5,23	2,63	1,40	8,66	1,46	0,669
FC2	6	12,06	5,51	6,82	21,34	1,69	0,257

TABELA 8. DADOS REMOVIDOS POR SEREM CONSIDERADOS OUTLIERS PELE TESTE DE GRUBBS.

Variável	Linha	Outlier
LB	5	43,6573
LCur	2	19,3221

Os valores de gastroproteção ajustados e sem os outliers, são mostrados nos gráficos da figura 26 e no infográfico da figura 27, é possível analisar a comparação das médias, para apar de grupos.

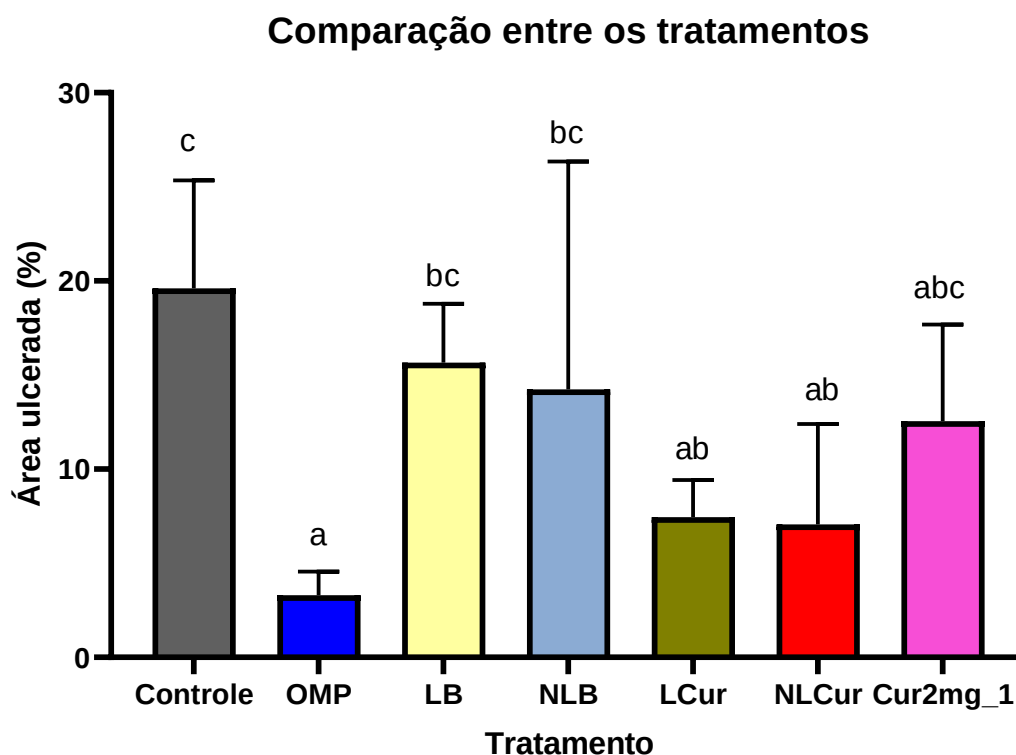


FIGURA 26. GRÁFICOS DE BARRAS E DESVIOS PARA CADA GRUPO DE ANIMAIS E SEUS TRATAMENTOS.

É possível observar, nos gráficos 1 e 2 (Figuras 26 e 27), que os índices de lesão dos animais tratados com omeprazol (OMP) e não tratados (controle) são estatisticamente diferentes, isso era previsível, já que o omeprazol é um tratamento reconhecidamente utilizado para casos de ulcera gástrica (Brunton et al., 2012).

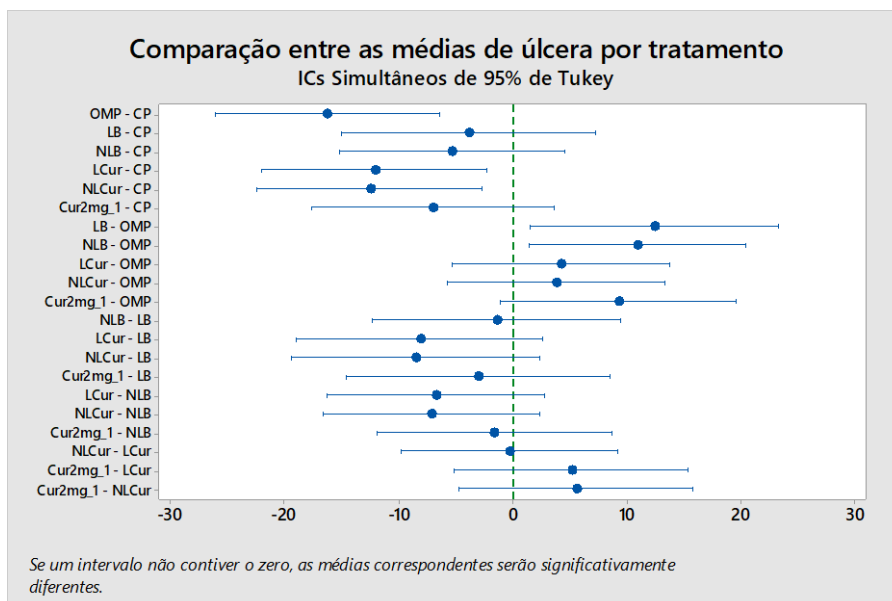


FIGURA 27. INFOGRÁFICO DE COMPARAÇÕES ENTRE DIFERENTES TRATAMENTOS MÉDIA A MÉDIA.

Entretanto, as informações mais importantes do presente estudo estão apresentadas no infográfico da Figura 27, de comparação de médias entre os grupos de MPs com e sem curcumina. Nos grupos contendo curcumina, liofilizada ou não (LCur e NLCur), são observados índices de gastroproteção próximos dos observados no grupo OMP. Isso não é verificado nas MPs sem curcumina, levando à conclusão de que os componentes das MPs isoladamente não apresentam efeito gastroprotetor pronunciado quanto à curcumina livre, que mesmo isoladamente apresentou um efeito gastroprotetor. Deste modo a presença de curcumina na MPs é responsável pelo seu efeito gastroprotetor. Apesar de a curcumina isoladamente também exercer efeito, é possível notar que as médias encontradas para os sistemas (MPs) são mais baixas que as médias encontradas para a curcumina livre. E que por se tratar de um experimento in vivo era de se esperar desvios relativamente grandes, devido às idiossincrasias inerentes aos diferentes animais.

Os resultados encontrados no presente estudo encontram fundamento em outros estudos, como é o caso do trabalho realizado por (Diaz-Triste et al. 2014), que avaliou o efeito gastroprotetor da curcumina comparando com o omeprazol em úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos. Os resultados encontrados, apesar de não poderem ser comparados numericamente, pois os autores, naquele trabalho escolheram representar os resultados como úlcera

total em mm e aqui representamos como percentual de área ulcerada, é possível verificar a mesma tendência.

No trabalho supracitado, a curcumina não foi administrada como um sistema de liberação controlada, e uma das observações foi a de que não foi possível observar diferenças estatísticas entre a curcumina 3mg.kg^{-1} e os animais não tratados; entretanto, doses de 30mg.kg^{-1} apresentaram resultados semelhantes às doses de omeprazol. Se compararmos com os dados que encontramos neste trabalho, é possível inferir que as MPs contendo curcumina numa dose baixa (2mg.kg^{-1}) apresentaram uma performance comparável ao tratamento padrão OMP. Isso confirma o potencial gastroprotetor das MPs acrescidas de curcumina, sendo liofilizadas ou não.

Uma possível explicação para o efeito gastroprotetor da curcumina foi dada por (Mahattanadul et al., 2009), que estudou o efeito dos curcuminoídes e a contribuição de cada um para a ação antiúlcera deste composto. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado à interação com a complexa cascata inflamatória, podendo atuar na inibição da liberação de ácido nítrico e fluido ácido gástrico na região lesionada, melhorando a cicatrização do local.

Resultados bastante interessantes, valem ser aqui mencionados, que são frutos de um estudo realizado por Rao e colaboradores (1997), que comparou o efeito da bisdetoxicurcumina com os da curcumina. Os resultados mostraram que a bisdetoxicurcumina pode ser tão ativa quanto a curcumina na eliminação direta da geração de óxido nítrico (mas foi menos potente do que a curcumina na supressão de iNOS (Gafner et al., 2004) e expressão do gene TNF- α (Lantz et al., 2005) em macrófagos de camundongo. Além disso, a bisdetoxicurcumina exerce atividade inibitória potente na expressão de iNOS no nível transcricional, mas não TNF- α . A curcumina, por outro lado, resulta em maior grau inibição na expressão de iNOS e TNF- α no nível transcricional e pós-transcricional, respectivamente. Além disso, a bisdetoxicurcumina, em doses de $40\text{--}160\text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal, acelera diretamente a cicatrização da úlcera gástrica por mecanismos que envolvem sua atividade inibitória na secreção de ácido gástrico e na produção de iNOS. A potência antiúlcera da bisdetoxicurcumina é igual à curcumina, com potência inibitória mais forte na

secreção de ácido gástrico; entretanto, tem potência supressora mais fraca na indução de iNOS. Assim, o grupo metoxi não foi essencial para a atividade de eliminação do óxido nítrico, mas os grupos de substituição na porção aromática podem ser especialmente cruciais para a inibição da expressão do gene iNOS e TNF- α .

Descobriu-se que o TNF- α está relacionado a atrasos na cicatrização da úlcera pela inibição da proliferação celular, angiogênese e microcirculação gástrica. Comparativamente, observações realizadas em diferentes estudos com a cimetidina, um antagonista do receptor H₂ da histamina (Okabe et al., 1977) , e a aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS (Griffiths et al., 1993), mostraram que ambas possuem um efeito significativo de promoção da cura na úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético, sugerindo um papel da superprodução de óxido nítrico por iNOS de macrófagos ativados no desenvolvimento de úlcera e o envolvimento do ácido gástrico no agravamento das úlceras gástricas (Mahattanadul et al., 2009). Foi observado que, após a indução da úlcera, a atividade da cNOS diminuiu enquanto a atividade da iNOS aumentou 6 h após a indução da úlcera nas células inflamatórias na base da úlcera e na margem da úlcera, com o nível máximo de expressão no dia 3 e diminuindo no dia 6. A nível significativo de expressão permaneceu no dia 10 após a indução da úlcera (Akiba et al., 1998)

Além disso, células inflamatórias ativadas e acumuladas nas lesões foram destruídas por apoptose para promover a resolução da inflamação aguda e durante o processo de cicatrização (Savill, 1997). A apoptose também desempenha um papel importante na remodelação do local inflamado pela destruição dos miofibroblastos.

Verificou-se que a administração de aminoguanidina reduziu significativamente o tamanho da úlcera três dias após a indução da úlcera, mas sem redução adicional uma semana após a indução, devido à inibição reversível da atividade de iNOS sem qualquer efeito na expressão de iNOS (Akiba et al., 1998). Além disso, este tratamento aumenta as células inflamatórias positivas para iNOS e as células epiteliais na fase de cicatrização da ulceração. Consequentemente, o NO gerado a partir de iNOS em células inflamatórias

participa não apenas do processo inflamatório e da formação da úlcera, mas também da cicatrização da úlcera, produzindo apoptose em células inflamatórias na mucosa em regeneração, eliminando assim as células inflamatórias positivas para iNOS durante a cicatrização da úlcera (Akiba et al., 1998). Assim, uma quantidade de NO gerado a partir de iNOS é necessária para produzir um efeito benéfico na cicatrização da úlcera. Além disso, descobriu-se que a superprodução de óxido nítrico por leucócitos através da indução da atividade de iNOS desempenha um papel importante na redução da secreção de ácido gástrico e na indução de lesões gástricas na isquemia-reperfusão em ratos ligados ao piloro (Rastogi et al., 1998; Tanaka et al., 2001). Também foi descoberto que o pré-tratamento com aminoguanidina evita a formação de lesões em ratos, embora aumente a produção de ácido gástrico que é reduzida pela isquemia-reperfusão (Tanaka et al., 2001). Assim a potência antiulcero, ou gastroprotetora de um composto reside basicamente na sua capacidade de estimular a síntese de iNOS em quantidade ideal para a manutenção dos seus efeitos cicatrizantes, sem que a sua produção exacerbe a lesão ou inflamação, bem como induza a produção de ácido gástrico.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a curcumina protegeu significativamente a mucosa gástrica com uma potência igual à do omeprazol. Esses achados sugerem que a curcumina, quando veiculada em nossas MPs de liberação lenta, em doses de 2 mg.kg^{-1} de peso corporal, atenua parcialmente o efeito, já reconhecidamente (Brunton et al., 2012; Mahattanadul et al., 2009) ulcerogênico dos AINES.

O fato de as MPs serem capazes de liberar a curcumina, em um estado mais solúvel (amorfo), por longos períodos, por um mecanismo lento e controlado, associado à sua mucoadesividade, permite que o sistema atue como um depósito de curcumina que mantém continuamente o meio gástrico em presença deste composto, sendo necessárias doses mais baixas para alcançar o efeito gastroprotetor. Essa se mostrou uma estratégia eficiente e de para a prevenção de gastrites e úlceras gástricas induzidas por indometacina (AINES).

Uma das principais justificativas para a baixa dosagem ser efetiva para o tratamento proposto reside no fato de que as MPs contendo curcumina,

apresentam perfil semelhante a uma dispersão sólida. Estes sistemas de entrega são capazes de alcançar e manter uma supersaturação sustentada de fármaco que permite a melhoria da sua biodisponibilidade (Christopher Vimalson et al., 2016; A. Singh & Mooter, 2015).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de MP de quitosana e HPMC reticuladas com TPP, veiculando curcumina, utilizando metodologia de Quality by design e planejamento estatístico, se mostrou bastante eficiente, pois reduziu o desperdício de materiais, excesso de experimentos, além de direcionar os esforços para o desenvolvimento racional e sistemático de uma formulação farmacêutica até o momento promissora.

Um aspecto importante do uso dessas ferramentas foi o fato de se determinar um modelo matemático e uma formulação ótima para redução de tamanho das partículas.

A liofilização também se mostrou como um parâmetro de processo importante para a o processo de liberação e absorção de líquido, interferindo diretamente sobre a biodisponibilidade da curcumina. Pode-se verificar que a adição de uma etapa relativamente simples a um produto já pronto, foi capaz de originar outro produto, com perfil cinético de liberação diferente, ambos podem ser considerados sistemas de liberação controlada, representando uma estratégia promissora para a administração oral liberação gástrica de curcumina por longos períodos.

O processo de obtenção das MP através do processo de geleificação ionotrópica com o TPP e biopolímeros, oriundos de fontes renováveis e limpas, permitiu a obtenção de MP esféricas, com dimensões micrométricas e aceitável teor de encapsulação (aproximadamente 60%).

Um resultado inesperado observado neste estudo foi o efeito amorfizador da curcumina, quando adicionado aos polímeros, sem necessariamente demandar a liofilização. Tal achado abre precedentes para pesquisas na área de dispersões sólidas e torna-se necessária a investigação mais rigorosa e com metodologias e métodos mais acurados.

As partículas mostraram-se mucoadesivas, de maneira que essa propriedade pode proporcionar a maior permanência da formulação no estômago, liberando continuamente o fármaco.

O método de produção das MPs, originou sistemas com boa estabilidade térmica e permitiu a liberação da curcumina em meio ácido pelo período de 24h.

Por fim as MPs de curcumina liofilizadas ou não mostraram potencial gastroprotetor, diante das lesões gástricas causadas pela indometacina (AINE), deste modo pode constituir uma estratégia eficaz e inovadora para a coadministração de AINEs em pacientes que necessitam fazer uso constante destes medicamentos, reduzindo assim a incidência de lesões, com a mesma efetividade do omeprazol.

Um grande desafio que este trabalho esbarra quando se pensa em ampliação dos testes clínicos e a possibilidade de avanço destes sistemas é a limitação operacional de escalonamento para uma produção em escala industrial. Para que este tipo de tecnologia alcance o mercado é importante que trabalhos subsequentes abranjam desde a sua concepção um planejamento focado em adequabilidade a infraestrutura existente nas indústrias.

O desenvolvimento de uma nação moderna e competitiva, passa pelo acesso da população aos bens e conhecimentos técnicos-científicos desenvolvidos nas universidades e centros de pesquisa. Isso se torna premente, quando este desenvolvimento é financiado com recursos públicos devendo, desta forma, chegar à sociedade e fornecer a essas pessoas alívio às suas questões e males, bem como em última instância, mas não menos importante, dividendos oriundos do trabalho intelectual desenvolvido exaustivamente pelos seus membros.

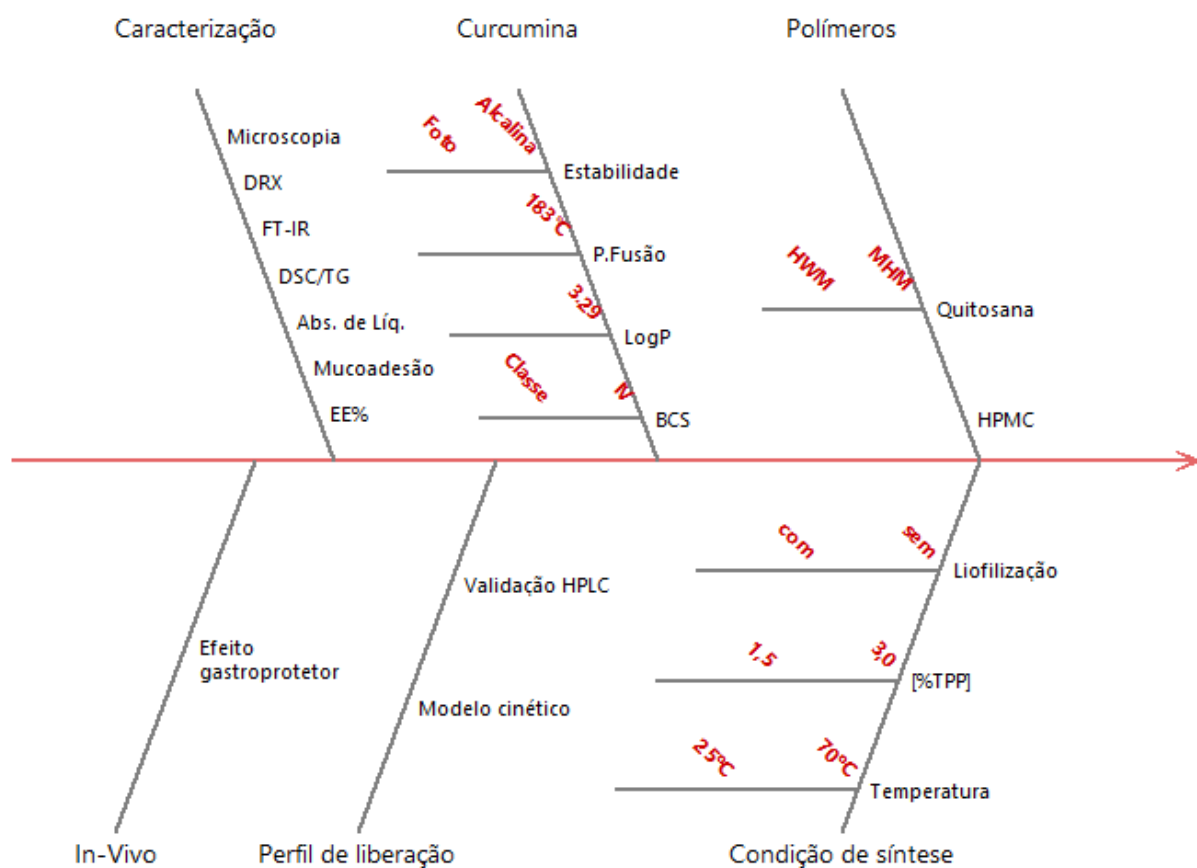
ANEXOS e MATERIAL SUPLEMENTAR

MATERIAL SUPLEMENTAR 1. PLANEJAMENTO FATORIAL COM RESULTADOS DE TAMANHO DAS MPS. AS LACUNAS PREENCHIDAS COM *, INDICAM QUE NÃO OCORREU FORMAÇÃO DE MPS.

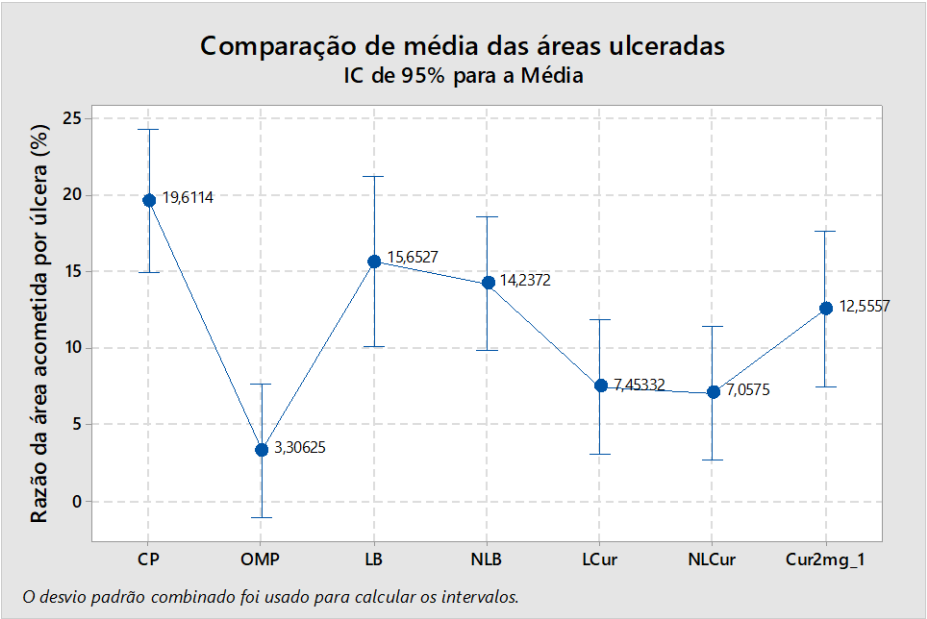
TEMP	TPP	MW	cht	Tamanho em mm
25	1,5	160	*	
70	1,5	160	*	
25	3,0	160	1,052	
70	3,0	160	1,604	
25	1,5	220	1,262	
70	1,5	220	1,278	
25	3,0	220	0,884	
70	3,0	220	0,787	
25	1,5	160	*	
70	1,5	160	*	
25	3,0	160	1,108	
70	3,0	160	1,644	
25	1,5	220	1,165	
70	1,5	220	1,294	
25	3,0	220	0,994	
70	3,0	220	0,712	
25	1,5	160	*	
70	1,5	160	*	
25	3,0	160	1,138	
70	3,0	160	1,688	
25	1,5	220	1,240	

70	1,5	220	1,252
25	3,0	220	1,026
70	3,0	220	0,796

Atributos críticos de qualidade para obtenção de MPs



MATERIAL SUPLEMENTAR 2. REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS COM DESVIO PADRÃO DO EFEITO GASTROPORTETOR EM CADA GRUPO DE ANIMAIS.



ANEXO 2. DADOS DE POROSIDADE DAS MPS CONTENDO CURCUMINA (NÃO UTILIZADO).

Porosidade

MP Não liofilizada + Cur

Total Intrusion Volume = 0.3460 mL/g

Total Pore Area = 64.140 m²/g

Median Pore Diameter (Volume) = 103.3762 µm

Median Pore Diameter (Area) = 0.0054 µm

Average Pore Diameter (4V/A) = 0.0216 µm

Bulk Density = 1.1054 g/mL

Apparent (skeletal) Density = 1.7899 g/mL

Porosity = 38.2439 %

MP Liofilizada + Curcumina

Total Intrusion Volume = 0.2594 mL/g

Total Pore Area = 68.207 m²/g

Median Pore Diameter (Volume) = 0.0396 µm

Median Pore Diameter (Area) = 0.0056 µm

Average Pore Diameter (4V/A) = 0.0152 µm

Bulk Density = 1.4226 g/mL

Apparent (skeletal) Density = 2.2546 g/mL

Porosity = 36.9031 %

Stem Volume Used = 6 %

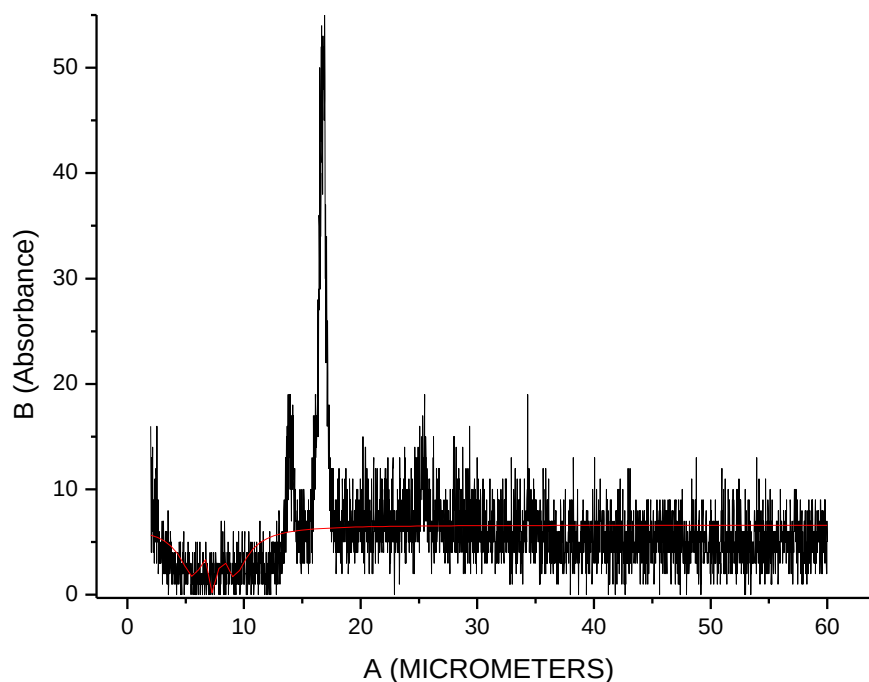


FIGURA 28 DIFRATOGRAMA DAS MPS BRANCAS SEM LIOFILIZAÇÃO ANTES DO PROCESSO DE SUAVIZAÇÃO DIGITAL (DADO NÃO TRATADO)

MATERIAL SUPLEMENTAR 3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO MATEMÁTICO PROPOSTO PARA O DISINVOLVIMENTO DAS MPS.

Coeficientes Codificados

Termo	Efeito	Coef	EP de Coe	IC de 95%	ValorT	ValorP
Constante		1,310	0,0141	(1,2796; 1,3412)	92,72	0,000
TEMP	0,2992	0,1496	0,0141	(0,1188; 0,1804)	10,58	0,000
TPP	-0,3820	-0,1910	0,0141	(-0,2218; -0,1602)	-13,51	0,000
MW cht	-0,5058	-0,2529	0,0141	(-0,2837; -0,2221)	-17,90	0,000
TEMP*TPP	-0,1277	-0,0638	0,0141	(-0,0946; -0,0330)	-4,52	0,001
TEMP*MW	-0,3745	-0,1873	0,0141	(-0,2180; -0,1565)	-13,25	0,000

One Way Repeated Measures Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,423)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CP	7	0	19,611	5,738	2,169
OMP	8	0	3,306	1,253	0,443
LB	5	0	15,653	3,135	1,402
NLB	8	0	14,237	12,112	4,282
LCur	8	0	7,453	1,969	0,696
NLCur	8	0	7,057	5,336	1,887
Cur2mg_1	6	0	12,556	5,123	2,092

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Subjects	7	425,168	60,738		
Between Treatments	6	1622,160	270,360	8,062	<0,001
Residual	36	1207,293	33,536		
Total	49	3056,536	62,378		



CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Desenvolvimento de micropartículas gastrorretentivas de curcumina constituídas por hidroxipropilmetilcelulose e quitosana aplicadas ao tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*.”** registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 30/2020, sob a responsabilidade do pesquisador Marlus Chorilli, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado “ad-referendum” pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 03 de fevereiro de 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	104
Peso/Idade	150-220 g 07 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do Câmpus de Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 03 de fevereiro de 2021.


Prof. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
Coordenadora da CEUA

REFERÊNCIAS

- Aihara, T., Nakamura, E., Amagase, K., Tomita, K., Fujishita, T., Furutani, K., & Okabe, S. (2003). Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacology & Therapeutics*, 98(1), 109–127.
- Akiba, Y., Nakamura, M., Mori, M., Suzuki, H., Oda, M., Kimura, H., Miura, S., Tsuchiya, M., & Ishii, H. (1998). Inhibition of inducible nitric oxide synthase delays gastric ulcer healing in the rat. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 27, S64--S73.
- Akinosho, H., Hawkins, S., & Wicker, L. (2013). Hydroxypropyl methylcellulose substituent analysis and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 276–281.
- Akolade, J. O., Oloyede, H. O. B., Salawu, M. O., Amuzat, A. O., Ganiyu, A. I., & Onyenekwe, P. C. (2018). Influence of formulation parameters on encapsulation and release characteristics of curcumin loaded in chitosan-based drug delivery carriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45, 11–19.
- Al-Ani, E., Martin, C., Britland, S. T., Doudin, K., & Hill, D. J. (2019). The effect of the source and the concentration of polymers on the release of chlorhexidine from mucoadhesive buccal tablets. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(6), 756–766.
- Aulton, M. E., & Taylor, K. M. G. (2017). *Aulton's Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*. Elsevier Health Sciences.
- Auriemma, G., Cerciello, A., Sansone, F., Pinto, A., Morello, S., & Aquino, R. P. (2018). Polysaccharides based gastroretentive system to sustain piroxicam release: Development and in vivo prolonged anti-inflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.08.140>
- Benamer, W. (2013). *Development of Preparative Methods for Chitosan Microparticles*. University of Manchester.

- Benita, S. (2005). *Microencapsulation: methods and industrial applications*. Crc Press.
- Bettini, R. (1994). *Pharmaceutical dissolution testing: Umesh V. Banakar, Ed.,(1992) Marcel Dekker, Inc., New York, 437 p., price not given*. Elsevier.
- Boddupalli, B. M., Mohammed, Z. N. K., Nath, R. A., & Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4), 381–387.
<https://doi.org/10.4103/0110-5558.76436>
- Boni, F. I., Cury, B. S. F., Ferreira, N. N., & Gremião, M. P. D. (2021). Ionic cross-linking as a strategy to modulate the properties of oral mucoadhesive microparticles based on polysaccharide blends. *Pharmaceutics*, 13(3).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030407>
- Boruah, B., Saikia, P. M., & Dutta, R. K. (2012). Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan--surfactant systems: A spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 245, 18–27.
- Bozkir, A., & Saka, O. M. (2004). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Delivery*, 11(2), 107–112.
- Brunton, L. L., Chabner, B. A., & Knollmann, B. C. (2012). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12*. AMGH Editora.
- Calvo, N. L., Svetaz, L. A., Alvarez, V. A., Quiroga, A. D., Lamas, M. C., & Leonardi, D. (2019). Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 181–191.
- Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., Palmira, M., & Gremião, D. (2010). *Mucoadhesive drug delivery systems*. 46(2008), 1–18.
- Cespi, M., Bonacucina, G., Mencarelli, G., Casettari, L., & Palmieri, G. F. (2011). Dynamic mechanical thermal analysis of hypromellose 2910 free films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(2), 458–463.
- Chadha, R., & Bhandari, S. (2014). Drug–excipient compatibility screening—Role

- of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 82–97.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.016>
- Chatelet, C. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3), 261–268.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00183-6)
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., & Banerjee, R. K. (2004). Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science*, 44–53.
- Christopher Vimalson, D., Parimalakrishnan, S., Jeganathan, N. S., & Anbazhagan, S. (2016). Techniques to enhance solubility of hydrophobic drugs: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(2), S67–S75.
- Chugh, C., & Nanda, A. (2017). Gastroretentive drug delivery systems-A review. *Int J Pharma Bio Sci*, 8(1), 62–68.
- COSTA, A. N. A. C. D. A. S. (n.d.). *NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM SANIDADE DE TAMBAQUIS AMAZÔNICOS (Colossoma macropomum)*.
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123–133.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Csaba, N., Köping-Höggård, M., & Alonso, M. J. (2009). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 205–214.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.028>
- D'Íaz-Triste, N. E., González-García, M. P., Jiménez-Andrade, J. M., Castañeda-Hernández, G., & Chávez-Piña, A. E. (2014). Pharmacological evidence for the participation of NO--cGMP--KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 730, 102–106.
- D GRANGER, N., KVIETYS, P. R., & PERRY, M. A. (1993). Leukocyte:

- endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion: Gastrointestinal inflammation: focus on the vascular endothelium. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71(1), 67–75.
- Das, S. K. (2013). Solid Dispersions : An Approach to Enhance the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*, 1, 37–46.
<https://doi.org/10.47893/ijppt.2013.1006>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P., & others. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217–223.
- de Almeida Barbosa, L. C. (2007). *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV.
- De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G. B., & Mukhopadhyay, A. K. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1592–1597.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01242-08>
- de Souza, M. P. C., Sábio, R. M., de Cássia Ribeiro, T., dos Santos, A. M., Meneguim, A. B., & Chorilli, M. (2020). Highlighting the impact of chitosan on the development of gastroretentive drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- de Souza Soares, L., Perim, R. B., de Alvarenga, E. S., de Moura Guimarães, L., de Carvalho Teixeira, A. V. N., dos Reis Coimbra, J. S., & de Oliveira, E. B. (2019). Insights on physicochemical aspects of chitosan dispersion in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 140–148.
- den Hoed, C. M., & Kuipers, E. J. (2020). Helicobacter pylori infection. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 476–480). Elsevier.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Preparation of cross-linked chitosan

- microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 22(4), 377–395.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L., & Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. *Pharmaceutical Research*, 13(12), 1838–1845.
<https://doi.org/10.1023/A:1016085108889>
- Douthwaite, A. H., & Lintott, G. A. M. (1938). Gastroscopic observation of the effect of aspirin and certain other substances on the stomach. *The Lancet*, 232(6013), 1222–1225.
- El Nashar, N. F., Donia, A. A., Mady, O. Y., & El Maghraby, G. M. (2017). Formulation of clarithromycin floating microspheres for eradication of *Helicobacter pylori*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.016>
- 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., & others. (2020). Design of chitosan-based particle systems: a review of the physicochemical foundations for tailored properties. *Carbohydrate Polymers*, 116968.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861720311413?via%3Dihub>
- Fonseca-Santos, B., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. (2017). A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(7), 1029–1037.
- Ford, J. L. (1999). Thermal analysis of hydroxypropylmethylcellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 179(2), 209–228.
- Forrest, J. H., Finlayson, N. D. C., & Shearman, D. J. C. (1974). Endoscopy in gastrointestinal bleeding. *The Lancet*, 304(7877), 394–397.
- Fromm, D. (1987). How do non-steroidal anti-inflammatory drugs affect gastric

- mucosal defenses? *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique et Experimentale*, 10(3), 251–258.
- Fugita, R. A., Gálico, D. A., Guerra, R. B., Perpétuo, G. L., Treu-Filho, O., Galhiane, M. S., Mendes, R. A., & Bannach, G. (2012). Thermal behaviour of curcumin. *Braz J Therm Anal*, 1(1), 19–23.
- Gafner, S., Lee, S.-K., Cuendet, M., Barthélémy, S., Vergnes, L., Labidalle, S., Mehta, R. G., Boone, C. W., & Pezzuto, J. M. (2004). Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. *Phytochemistry*, 65(21), 2849–2859.
- Garg, R., & Gupta, G. D. (2008). *Progress in Controlled Gastroretentive Delivery Systems*. 7(September), 1055–1066.
- Ghadi, R., & Dand, N. (2017). Review article BCS class IV drugs : Highly notorious candidates for formulation development. *Journal of Controlled Release*, 248, 71–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.014>
- Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967). Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56(10), 1238–1242.
- Gisbert, J. P., Molina-Infante, J., Amador, J., Bermejo, F., Bujanda, L., Calvet, X., Castro-Fernández, M., Cuadrado-Lavín, A., Elizalde, J. I., Gomollón, F., & others. (2016). IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y Hepatología*, 39(10), 697–721.
- Goddard, P. J., Hills, B. A., & Lichtenberger, L. M. (1987). Does aspirin damage canine gastric mucosa by reducing its surface hydrophobicity? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 252(3), G421--G430.
- Griffiths, M. J. D., Messent, M., MacAllister, R. J., & Evans, T. W. (1993). Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*, 110(3), 963–968.

- Guideline, I. C. H. H. T., & others. (2009). Pharmaceutical development. Q8 (2R). *As Revised in August*.
- Gupta, M. K., Prakash, D., & Mishra, B. (2012). Biodegradable microparticulate drug delivery system of diltiazem HCl. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 699–709.
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40–50.
- Hou, J. Y., Gao, L. N., Meng, F. Y., & Cui, Y. L. (2014). Mucoadhesive microparticles for gastroretentive delivery: Preparation, biodistribution and targeting evaluation. *Marine Drugs*, 12(12), 5764–5787.
<https://doi.org/10.3390/md12125764>
- Huichao, W., Shouying, D., Yang, L., Li, Y., & Di, W. (2014). The application of biomedical polymer material hydroxy propyl methyl cellulose(HPMC) in pharmaceutical preparations. Available Online *Www.Jocpr.Com Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 155–160. www.jocpr.com
- Hwang, S. W., & Shin, J. S. (2018). Pectin-coated curcumin-chitosan microparticles crosslinked with Mg²⁺ for delayed drug release in the digestive system. *International Journal of Polymer Science*, 2018.
- Ironside, N., Chen, C.-J., Dreyer, V., Ding, D., Buell, T. J., & Connolly, E. S. (2021). History of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Functional Outcomes After Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Neurocritical Care*, 34(2), 566–580.
- Ito, M., Ban, A., & Ishihara, M. (2000). Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 82(3), 218–225.
- JAWETZ, E., & LEVINSON, W. (2005). Microbiologia médica e imunologia. *Porto Alegre*.
- Jennings, T. A. (1999). *Lyophilization: introduction and basic principles*. CRC press.

- John, M. K., Xie, H., Bell, E. C., & Liang, D. (2013). Development and pharmacokinetic evaluation of a curcumin co-solvent formulation. *Anticancer Research*, 33(10), 4285–4291.
- Jones, D. S., Woolfson, A. D., & Brown, A. F. (1997). Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 450–457.
- Joshi, S. C. (2011). Sol-gel behavior of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in ionic media including drug release. *Materials*, 4(10), 1861–1905.
<https://doi.org/10.3390/ma4101861>
- Khutoryanskiy, V. V. (2014). *Mucoadhesive materials and drug delivery systems*. John Wiley & Sons.
- Kiilll, C. P., Barud, H. da S., Santagneli, S. H., Ribeiro, S. J. L., Silva, A. M., Tercjak, A., Gutierrez, J., Pironi, A. M., & Gremião, M. P. D. (2017). Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1695–1702.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.053>
- Kim, S. Y. (2015). Antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* : Is the end coming? *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 6(4), 183.
<https://doi.org/10.4292/wjgpt.v6.i4.183>
- Knopp, M. M., Chourak, N., Khan, F., Wendelboe, J., Langguth, P., Rades, T., & Holm, R. (2016). Effect of polymer type and drug dose on the in vitro and in vivo behavior of amorphous solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 105, 106–114.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.017>
- Kshitij, R. M., & others. (2016). SLNs can Serve as the New Brachytherapy Seed: Determining Influence of Surfactants on Particle Size of Solid Lipid Microparticles and Development of Hydrophobised Copper Nanoparticles for Potential Insertion. *Journal of Chemical Engineering Process Technology*, 7, 302–308.

- Kumar, A., Jadupati, N., & Sen, K. K. (2015). *Gastroretentive drug delivery technologies : Current approaches and future*. January 2010.
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Kumari, S., & Kishor, R. (2020). Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties*.
- Langkilde, F. W., & Svantesson, A. (1995). Identification of celluloses with Fourier-transform (FT) mid-infrared, FT-Raman and near-infrared spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(4–5), 409–414.
- Lantz, R. C., Chen, G. J., Solyom, A. M., Jolad, S. D., & Timmermann, B. N. (2005). The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*, 12(6–7), 445–452.
- Larsen, C., Larsen, S. W., Jensen, H., Yaghmur, A., & Østergaard, J. (2009). Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(12), 1283–1295.
- Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2002). Thermophysical properties of chitosan, chitosan--starch and chitosan--pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*, 48(2), 179–190.
- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 20.
- Lichtenberger, L M. (1995). The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 565–583.
- Lichtenberger, L M, Romero, J. J., & Ulloa, C. (1995). NSAIDs complexed to phosphatidylcholine (PC) have reduced GI toxicity and enhanced bioavailability. *Gastroenterology*, 108(4), A149.
- Lichtenberger, Lenard M, Wang, Z.-M., Romero, J. J., Ulloa, C., Perez, J. C.,

- Giraud, M.-N., & Barreto, J. C. (1995). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nature Medicine*, 1(2), 154–158.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 149–173.
- Liu, Y., Tan, J., Thomas, A., Ou-Yang, D., & Muzykantov, V. R. (2012). The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 3(2), 181–194.
- M Ways, T. M., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2018). Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*, 10(3), 267.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.
- Mahattanadul, S., Nakamura, T., Panichayupakaranant, P., Phdoongsombut, N., Tungsinmunkong, K., & Bouking, P. (2009). Comparative antiulcer effect of bisdemethoxycurcumin and curcumin in a gastric ulcer model system. *Phytomedicine*, 16(4), 342–351.
- Mahmud, T., Wrigglesworth, J. M., Scott, D. L., & Bjarnason, I. (1997). Mitochondrial function and modification of NSAID carboxyl moiety. In *Side Effects of Anti-Inflammatory Drugs IV* (pp. 243–248). Springer.
- Majekodunmi, S. O., & Uzoaganobi, C. C. (2017a). Formulation of domperidone microspheres using a combination of locally extracted chitosan and Hpmc as polymers. *J Chem Chem Eng*, 11, 65–74.
- Majekodunmi, S. O., & Uzoaganobi, C. C. (2017b). *Formulation of Domperidone Microspheres Using a Combination of Locally Extracted Chitosan and Hpmc as Polymers*. 11, 65–74. <https://doi.org/10.17265/1934-7375/2017.02.005>
- Marques, A. C., Rocha, A. I., Leal, P., Estanqueiro, M., & Lobo, J. M. S. (2017). Development and characterization of mucoadhesive buccal gels containing

- lipid nanoparticles of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(2), 455–462.
- Martins, A. F., de Oliveira, D. M., Pereira, A. G. B., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2012). Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1127–1133.
- McClements, D. J. (2018). Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnology Advances*, July, 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.004>
- Meneguim, Andréia B, Beyssac, E., Garrait, G., Hsein, H., & Cury, B. S. F. (2018). 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 and Biopharmaceutics*, 123, 84–94.
- Meneguim, Andreia Bagliotti. (2016). *Micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina como estratégia para administração oral de insulina*.
- Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., Fresta, M., Sandulovici, R., & Mircioiu, I. (2019). Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(3), 140.
- Moreno, J. A. S., Mendes, A. C., Stephansen, K., Engwer, C., Goycoolea, F. M., Boisen, A., Nielsen, L. H., & Chronakis, I. S. (2018). Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles. *Carbohydrate Polymers*, 190(January), 240–247.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.062>
- Moura, F. C. S., Perioli, L., Pagano, C., Vivani, R., Ambrogi, V., Bresolin, T. M., & Ricci, M. (2019). Chitosan composite microparticles : A promising gastroadhesive system for taxifolin. *Carbohydrate Polymers*, 218(January), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.075>

- Muzzarelli, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 995–1012.
- Nadzir, M. M., Fen, T. W., Mohamed, A. R., & Hisham, S. F. (2017). Size and stability of curcumin niosomes from combinations of Tween 80 and Span 80. *Sains Malaysiana*, 46(12), 2455–2460.
- Natarajan, J. V, Nugraha, C., Ng, X. W., & Venkatraman, S. (2014). Sustained-release from nanocarriers: a review. *Journal of Controlled Release*, 193, 122–138.
- Nayak, A.K.; Maji, R.; Das, B. (2010). Gastroretentive drug delivery systems: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), 2–10. <https://doi.org/10.5897/AJPP2015.4307>
- Nayak, A. K., Maji, R., & Das, B. (2010). Gastroretentive drug delivery systems: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), 2–10. <https://doi.org/10.5897/AJPP2015.4307>
- Neto, C. G. da T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62(2), 97–103.
- Ng, S. W., Selvarajah, G. T., Hussein, M. Z., Yeap, S. K., & Omar, A. R. (2020). In vitro evaluation of curcumin-encapsulated chitosan nanoparticles against feline infectious peritonitis virus and pharmacokinetics study in cats. *BioMed Research International*, 2020.
- Okabe, S., Takeuchi, K., Urushidani, T., & Takagi, K. (1977). Effects of cimetidine, a histamine H₂-receptor antagonist, on various experimental gastric and duodenal ulcers. *The American Journal of Digestive Diseases*, 22(8), 677–684.
- Osorio, F. A., Molina, P., Matiacevich, S., Enrione, J., & Skurtys, O. (2011). Characteristics of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) based edible film

- developed for blueberry coatings. *Procedia Food Science*, 1, 287–293.
- Pan, C. J., Tang, J. J., Weng, Y. J., Wang, J., & Huang, N. (2006). Preparation, characterization and anticoagulation of curcumin-eluting controlled biodegradable coating stents. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 42–49.
- Pandey, S. P., Shukla, T., Dhote, V. K., Mishra, D. K., Maheshwari, R., & Tekade, R. K. (2018). Use of polymers in controlled release of active agents. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 113–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00004-2>
- Parize, A. L., Stulzer, H. K., Laranjeira, M. C. M., Brighente, I. M. da C., & Souza, T. C. R. de. (2012). Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Química Nova*, 35(6), 1127–1132. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000600011>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2016). *Introduction to Spectroscopy*.
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1996). Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*, 17(16), 1553–1561.
- Popeski-Dimovski, R. (2015). Work of adhesion between mucin macromolecule and calcium-alginate gels on molecular level. *Carbohydrate Polymers*, 123, 146–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.033>
- Porfirio, L. de O., Costa, A. A., Conceição, R. R., Matos, T. de O., Almeida, E. D. P., Sarmiento, V. H. V, Araújo, A. A. S., Nunes, R. de S., & Lira, A. A. M. (2015). Compatibility study of hydroxypropylmethylcellulose films containing zidovudine and lamivudine using thermal analysis and infrared spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120(1), 817–828.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112.
- Rainsford, K. D. (1983). Microvascular injury during gastric mucosal damage by anti-inflammatory drugs in pigs and rats. *Agents and Actions*, 13(5), 457–460.

- Rajasekar, A., & others. (2015). Facile synthesis of curcumin nanocrystals and validation of its antioxidant activity against circulatory toxicity in Wistar rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(6), 4119–4125.
- Rao, M. N. A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(1), 105–107.
- Rapier, C. E., Shea, K. J., & Lee, A. P. (2021). Investigating PLGA microparticle swelling behavior reveals an interplay of expansive intermolecular forces. *Scientific Reports*, 11(1), 14512. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93785-6>
- Rastogi, L., Patnaik, G. K., & Dikshit, M. (1998). Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research*, 38(2), 125–132.
- Revathi, M., Saravanan, R., & Shanmugam, A. (2012). Production and characterization of chitinase from *Vibrio* species, a head waste of shrimp *Metapenaeus dobsonii* (Miers, 1878) and chitin of *Sepiella inermis* Orbigny, 1848. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(04), 392–397. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34056>
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*, 27(5), 771–780.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37–42.
- Robert, M. E., Eric, J. B., & others. (1992). *Chitin Chemistry, The*.
- Robinson, D. I. (2010). Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: a review and perspective. *Organic Process Research & Development*, 14(4), 946–959.
- Rosen, Y., Gurman, P., & Elman, N. (2017). *Drug Delivery: An Integrated Clinical*

and Engineering Approach.

- Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., Sandri, G., Faccendini, A., Puccio, A., & Caramella, C. (2014). Comparison of poloxamer-and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(3), 352–360.
- Salvador, M. (2017). Preparation of Chitosan Hydrogels and Its Pharmaceutical Drug Delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4), 703–714. <https://doi.org/10.20959/wjpps20174-8931>
- Santos, A. M. dos. (2019). *Sistemas multifuncionalizados empregando nanopartículas de quitosana ancoradas com metotrexato e incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina como estratégia para liberação cólon-específica do 5-fluorouracil como pot.*
- Saralkar, P., & Dash, A. K. (2017). Alginate nanoparticles containing curcumin and resveratrol: preparation, characterization, and in vitro evaluation against DU145 prostate cancer cell line. *AAPS Pharmscitech*, 18(7), 2814–2823.
- Saranya, T. S., Rajan, V. K., Biswas, R., Jayakumar, R., & Sathianarayanan, S. (2018). Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.044>
- Sarode, A. L., Sandhu, H., Shah, N., Malick, W., & Zia, H. (2013). Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: Predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.012>
- Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(4), 375–380.
- Schindwein, W. S., & Gibson, M. (2018). *Pharmaceutical Quality by Design: a practical approach*. John Wiley & Sons.
- Schwegman, J. J., Hardwick, L. M., & Akers, M. J. (2005). *Practical Formulation*

- and Process Development of Freeze-Dried Products. *Pharmaceutical Development and Technology*, 10(2), 151–173. <https://doi.org/10.1081/pdt-56308>
- Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 131–194. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shaw, D. J. (1975). *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. E. Blücher.
- Siepmann, J., Kranz, H., Bodmeier, R., & Peppas, N. A. (1999). HPMC-matrices for controlled drug delivery: a new model combining diffusion, swelling, and dissolution mechanisms and predicting the release kinetics. *Pharmaceutical Research*, 16(11), 1748–1756.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2000). Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 67–78.
- Singh, A., & Mooter, G. Van Den. (2015). *Spray drying formulation of amorphous solid dispersions*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>
- Singh, B., Dahiya, M., Saharan, V., & Ahuja, N. (2005). Optimizing drug delivery systems using systematic" design of experiments." Part II: retrospect and prospects. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22(3).
- Singh, B., Kapil, R., Nandi, M., & Ahuja, N. (2011). Developing oral drug delivery systems using formulation by design: vital precepts, retrospect and prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(10), 1341–1360.

- Sogias, I. A., Williams, A. C., & Khutoryanskiy, V. V. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9(7), 1837–1842.
- Somashekarappa, H., Prakash, Y., Hemalatha, K., Demappa, T., & Somashekar, R. (2013). Preparation and characterization of HPMC/PVP blend films plasticized with sorbitol. *Indian Journal of Materials Science*, 2013.
- Somasundaram, S., Hayllar, H., Rafi, S., Wrigglesworth, J. M., Macpherson, A. J., & Bjarnason, I. (1995). The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol*, 30, 289–299.
- Soni, G., Yadav, K. S., & Gupta, M. K. (2020). QbD based approach for formulation development of spray dried microparticles of erlotinib hydrochloride for sustained release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101684.
- Spagnol, C. M., Zaera, A. M., Isaac, V. L. B., Corrêa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2018). Release and permeation profiles of spray-dried chitosan microparticles containing caffeic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(3), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.021>
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R. (2018a). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 4695. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23064-4>
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R. (2018b). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 4695.
- Streubel, A., Siepmann, J., & Bodmeier, R. (2006). Gastroretentive drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3(2), 217–233.
- Tanaka, J., Yuda, Y., Inouye, S., & Yamakawa, T. (2001). The role of nitric oxide in the gastric acid secretion induced by ischemia--reperfusion in the pylorus-ligated rat. *European Journal of Pharmacology*, 424(1), 69–74.
- Teegarden, D. M. (2004). *Polymer chemistry: introduction to an indispensable*

science. NSTA Press.

- Teng, D. (2011). From chitin to chitosan. In *Chitosan-based hydrogels: Functions and application* (pp. 2–33). CRC Press Boca Raton, Florida.
- Timmermans, J., & Moës, A. J. (1994). Factors controlling the buoyancy and gastric retention capabilities of floating matrix capsules: New data for reconsidering the controversy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(1), 18–24. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830106>
- Togkalidou, T., Braatz, R. D., Johnson, B. K., Davidson, O., & Andrews, A. (2001). Experimental design and inferential modeling in pharmaceutical crystallization. *AIChE Journal*, 47(1), 160–168.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 180(5), 402–404.
- Vareed, S. K., Kakarala, M., Ruffin, M. T., Crowell, J. A., Normolle, D. P., Djuric, Z., & Brenner, D. E. (2008). Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(6), 1411–1417.
- Varum, F. O., Basit, A. W., Sousa, J., & Veiga, F. (2008). Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(4), 535–548. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400002>
- Verma, R. K., & Garg, S. (2004). Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(3), 449–458.
- Vyazovkin, S., Koga, N., & Schick, C. (2018). *Handbook of thermal analysis and Calorimetry: Recent Advances, techniques and applications*.
- Wallace, John L. (2000). How do NSAIDs cause ulcer disease? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 14(1), 147–159.
- Wallace, JOHN L, Keenan, C. M., & Granger, D. N. (1990). Gastric ulceration

- induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259(3), G462--G467.
- Wang, K., Bai, F., Zhou, X., Wang, J., Li, Y., Xu, H., Gao, R., Wu, H., Liu, K., & Zhao, Y. (2021). Characterization of chondroitin sulfates isolated from large hybrid sturgeon cartilage and their gastroprotective activity against ethanol-induced gastric ulcers. *Food Chemistry*, 363, 130436.
- Wang, L., Dong, W., & Xu, Y. (2007). Synthesis and characterization of hydroxypropyl methylcellulose and ethyl acrylate graft copolymers. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 626–636.
- Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., & Rojsitthisak, P. (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical Analysis*, 20(4), 314–319. <https://doi.org/10.1002/pca.1129>
- Wilson, C. G., Washington, N., Greaves, J. L., Kamali, F., Rees, J. A., Sempik, A. K., & Lampard, J. F. (1989). Bimodal release of ibuprofen in a sustained-release formulation: a scintigraphic and pharmacokinetic open study in healthy volunteers under different conditions of food intake. *International Journal of Pharmaceutics*, 50(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90140-3)
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2018). Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 537(1–2), 223–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.036>
- Wypych, G. (2012). *Handbok of Polymers*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-47-8.50001-1>
- Zagari, R. M., Rabitti, S., Eusebi, L. H., & Bazzoli, F. (2018). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: A clinical practice update. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/eci.12857>
- Zhang, Q., Li, X., & Jasti, B. R. (2021). Role of Physicochemical Properties of

Some Grades of Hydroxypropyl Methylcellulose on In Vitro Mucoadhesion.
International Journal of Pharmaceutics, 121218.

Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H.,
Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and
antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/186864>