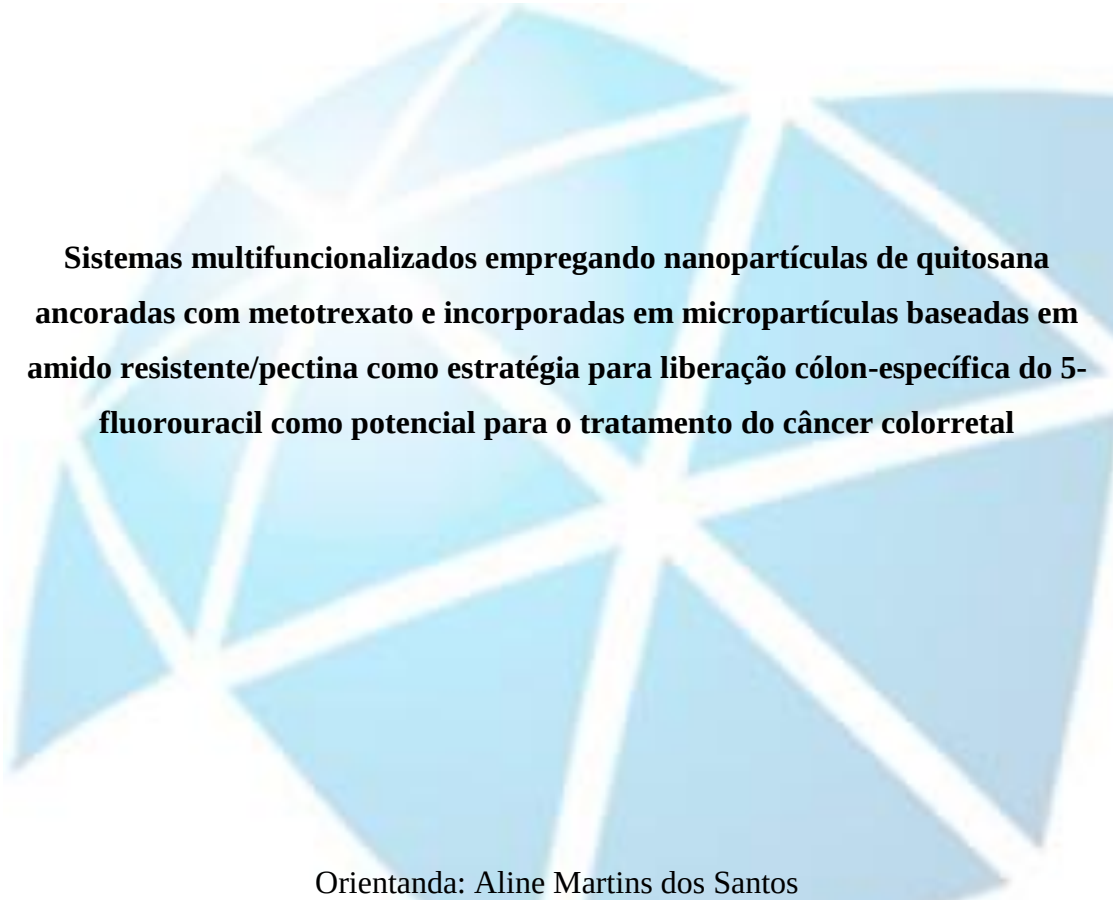


RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 30/07/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



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 potencial para o tratamento do câncer colorretal

Orientanda: Aline Martins dos Santos
Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientador: Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

Araraquara/SP
2019

Aline Martins dos Santos

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 potencial para o tratamento do câncer colorretal

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

Araraquara/SP

2019

S237s

Santos, Aline Martins dos.

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 potencial para o tratamento do câncer colorretal / Aline Martins dos Santos. – Araraquara: [S.n.], 2019. 142 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.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.

Coorientador: Leonardo Miziara Barboza Ferreira.

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3. 5-fluorouracil. 4. Metotrexato. 5. Micropartículas. 6. Amido resistente. 7. Pectina. 8. Liberação cólon-específica. 9. Biodistribuição *in vivo*. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Ferreira, Leonardo Miziara Barboza, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: 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 potencial para o tratamento do câncer colorretal

AUTORA: ALINE MARTINS DOS SANTOS

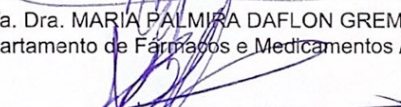
ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLOM GREMIÃO

COORDENADOR: LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



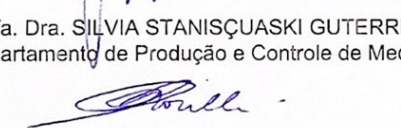
Prof. Dra. MARIA PALMIRA DAFLOM GREMIÃO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF do Câmpus de Araraquara - UNESP



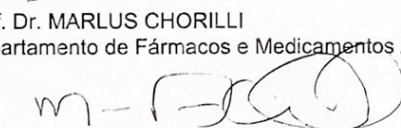
Prof. Dr. MARCELO BISPO DE JESUS
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / Instituto de Biologia da UNICAMP



Prof. Dra. SILVIA STANISQUASKI GUTERRES
Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia / UFRGS



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MARCO VINICIUS CHAUD
Departamento de Farmácia / Universidade de Sorocaba

Araraquara, 30 de julho de 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, por me guiar e me dar força quando pensei em desistir;

À minha mãe, por me apoiar incondicionalmente nos estudos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o maior responsável por essa conquista.

Aos meus pais, **Ivaldo** e **Leonice**, pelos valores transmitidos e por sempre me apoiar e incentivar, e especialmente à minha mãe, por vibrar comigo a cada conquista.

Ao meu noivo **Evandro**, por todo o suporte afetivo, paciência e companheirismo durante esses longos anos.

À minha irmã **Andréia**, por cada palavra de carinho e apoio, sempre acreditando em mim.

Aos meus sogros **Francisco** e **Marisa**, por todo apoio e carinho.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, pela amizade e por confiar sempre em mim, compartilhando seus conhecimentos com muito carinho e paciência.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela amizade, apoio, colaboração e ensinamentos transmitidos.

À **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury**, pela amizade, contribuição e ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Kristofer Thurecht**, por me receber e orientar durante o estágio sanduíche e, acima de tudo, pelos ensinamentos que sem dúvida me engrandeceram profissionalmente.

À **Andréia Bagliotti Meneguín**, pela amizade, companheirismo, contribuição e por toda ajuda para a realização de experimentos e discussões para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os **amigos do laboratório de Farmacotécnica**, pela amizade e companheirismo, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente às técnicas de Laboratório **Natália** e **Margarete**, pela amizade e pela ajuda prestada para a realização de meus experimentos.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, pela realização de algumas análises.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus** e ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)**, pela colaboração e ajuda com as análises celulares e, em especial, à

doutoranda **Raquel Liszbinski** por toda ajuda e amizade durante a realizações dos experimentos.

À equipe da **Seção de Pós-graduação**, em especial à **Cláudia, Aniele e Daniela**, pela atenção, apoio e serviços prestados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado no País (Processo 2016/01464-9) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo 2017/25846-0).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** (Código 001) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros anos do curso de doutorado.

EPÍGRAFE

"A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável"

[Mahatma Gandhi]

RESUMO

5-fluorouracil (5-FLU) e metotrexato (MTX) são utilizados no tratamento do câncer colorretal (CC), no entanto, sua eficácia clínica é limitada devido à falta de especificidade, levando a efeitos colaterais graves. Neste sentido, nanopartículas (NPs) baseadas em quitosana (QS), encapsuladas com 5-FLU e funcionalizadas com MTX, bem como a incorporação dessas NPs em micropartículas (MPs) de amido resistente e pectina (AR/P) para administração oral foram delineadas visando alcançar a liberação direcionada, e aumentar a concentração local do fármaco no cólon e/ou região tumoral. O método de geleificação ionotrópica utilizando tripolifosfato (TPP) como reticulante foi eficiente na obtenção de NPs de QS/TPP/5-FLU, as quais apresentaram diâmetro médio entre 122,2 a 155,0 nm, com índice de polidispersão (PDI) entre 0,24 e 0,35, valor de potencial zeta (acima de +21 mV) e forma esférica. A eficiência de encapsulação (EE) do 5-FLU nestas NPs variou entre 12,24 a 23,58%, demonstrando que a amostra com maior proporção de QS (4:1:1 QS/TPP/5-FLU) promoveu maior EE. A QS foi conjugada com sucesso ao MTX, e o teor do MTX obtido para as amostras QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3 foi de 16,92, 27,52 e 30,89%, respectivamente. As NPs funcionalizadas com MTX apresentaram diâmetro médio entre 376,4 e 407,8 nm, com valores de PDI entre 0,38 e 0,41 e potencial zeta entre +31,6 e +26,3 mV, demonstrando uma redução na EE do 5-FLU (15,71-18,23%). Ensaios de mucoadesão demonstraram que as NPs de QS/TPP sem e com adição de 5-FLU apresentaram maior capacidade mucoadesiva comparadas as NPs funcionalizadas com MTX, as quais promoveram uma redução nos valores de potencial zeta, indicando uma menor adsorção de mucina à superfície dessas NPs. As NPs de QS/TPP com e sem 5-FLU foram encapsuladas em MPs de AR/P usando o método de geleificação ionotrópica por gotejamento manual e/ou aerossolização, e as MPs carregadas com NPs apresentaram diâmetro médio acima de 800 µm e 10 µm, respectivamente. A forma esférica das MPs e a eficiência de incorporação das NPs nas MPs foram confirmadas em ambos os métodos. Os estudos de liberação *in vitro* do 5-FLU demonstraram que a encapsulação das NPs em MPs de AR/P promoveu um maior controle das taxas de liberação do 5-FLU, com redução significativa em meio ácido (53%). NPs de QS foram marcadas com sucesso usando o fluoróforo Cy5 para sua monitorização usando imagens ópticas multiespectrais em camundongos. Nos ensaios de biodistribuição *in vivo*, as NPs QS-Cy5 apresentaram uma distribuição mais rápida ao longo do trato gastrointestinal (TGI), ou seja, um tempo de trânsito mais curto em comparação com as MPs carregadas com NPs. Além disso, as NPs QS-Cy5 mostraram absorção não específica na corrente sanguínea com acúmulo no rim, enquanto que para as MPs carregadas com NPs não foi observado acúmulo significativo no sangue ou nos principais órgãos, indicando que a encapsulação das NPs em MPs de AR/P resultou em uma maior proteção das NPs ao longo do TGI após a administração oral. Portanto, o conjunto de resultados sugere que as MPs de AR/P são potenciais carreadores para a liberação de NPs carregadas de fármaco ao cólon e este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de sistemas orais para o tratamento do CC.

Palavras-chave: Nanopartículas; quitosana; 5-fluorouracil; metotrexato; micropartículas; amido resistente; pectina; liberação cólon-específica; biodistribuição *in vivo*.

ABSTRACT

5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) has been widely used in the treatment of colorectal cancer (CRC), however, its clinical efficacy is limited due to its lack of specificity, leading to severe side effects. In this sense, chitosan (CS) nanoparticles (NPs) encapsulated with 5-FU and functionalized with MTX, as well as the incorporation of these NPs into resistant starch and pectin (RS/P) microparticles (MPs) for oral administration were designed to achieve targeted release, and to increase local drug concentration in the colon and/or tumor region. Iontropic gelation method using tripolyphosphate (TPP) as a crosslinker was efficient in obtaining CS/TPP/5-FU NPs, with a mean diameter between 122.2 and 155.0 nm, with a polydispersity index (PDI) between 0.24 and 0.35, zeta potential value (above +21 mV) and spherical shape. 5-FU encapsulation efficiency (EE) in these NPs ranged from 12.24 to 23.58%, showing that the sample with a higher proportion of CS (4:1:1 CS/TPP/5-FU) which presented higher EE. CS was successfully labelled to the MTX and MTX content obtained for CS-MTX-1; CS-MTX-2 and CS-MTX-3 samples were 16.92, 27.52 and 30.89%, respectively. NPs functionalized with MTX presented mean diameter between 376.4 and 407.8 nm, with PDI values between 0.38 and 0.41 and zeta potential between +31.6 and +26.3 mV, with a small reduction in the EE of 5-FU (15.71-18.23%). Mucosadhesion studies demonstrated that the CS/TPP NPs with and without 5-FU, presented higher mucoadhesive capacity compared to the NPs functionalized with MTX, which led to the reduction in the zeta potential values, indicating lower adsorption of mucin on the surface of these NPs. CS/TPP NPs with and without 5-FU were encapsulated into RS/P MPs using ionotropic gelation method by manual dripping and/or aerosolization, and MPs loaded with NPs had average diameter above 800 μm , and diameter of 10 μm , respectively. Spherical shape of the MPs and nanoparticle encapsulation efficiency into microparticles were confirmed in both methods. *In vitro* release studies demonstrated that the encapsulation of NPs into RS/P MPs promoted greater control of 5-FU release rates, with a significant reduction in acid media (53%). CS NPs were successfully labelled using Cy5 fluorophore and were monitored using multispectral optical imaging in mouse. *In vivo* biodistribution studies, CS-Cy5 NPs showed a faster clearance in the distribution pattern along the gastrointestinal tract (GIT), i.e., a shorter transit time compared to CS NPs-loaded RS/P microparticles. In addition, CS-Cy5 NPs showed non-specific absorption into the blood-stream with associated kidney accumulation, while for the CS NPs-loaded RS/P microparticles no significant accumulation was observed in blood or major organs, indicating that the encapsulation of NPs into RS/P MPs resulted in higher protection of the NPs along the GIT after oral administration. Therefore, the set of results suggests that RS/P MPs are potential carriers for delivering drug-loaded nanoparticles to the colon and this work will contribute to the development of oral-systems for the treatment of CRC.

Keywords: Nanoparticles; chitosan; 5-fluorouracil; methotrexate; resistant starch; pectin; microparticles; colon specific delivery; *in vivo* biodistribution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.	25
Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil.	27
Figura 3. Estrutura química do MTX (A) e do ácido fólico (B).	29
Figura 4. Representação esquemática da nanocápsula e nanoesfera.	31
Figura 5. Representação esquemática dos diferentes tipos de ligantes utilizados na funcionalização de nanopartículas.	32
Figura 6. Estrutura molecular da quitosana.	33
Figura 7. Estrutura linear da amilose (a) e ramificada da amilopectina (b).	34
Figura 8. Estrutura da pectina.	36
Figura 9. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas pelo método de geleificação ionotrópica.	46
Figura 10. Representação esquemática do processo de funcionalização da QS com MTX: a) síntese do MTX ativado; b) síntese do acoplamento da QS com MTX.	50
Figura 11. Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P.	56
Figura 12. Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da quitosana com Cy5.	59
Figura 13. Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da blenda de AR/P com o corante Rodamina-NH ₂	60
Figura 14. Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P usando o método de aerossolização.	62
Figura 15. Espectro de absorção do 5-FLU em meio aquoso.	65
Figura 16. Curva analítica do 5-FLU obtido por espectrofotometria UV-vis.	66
Figura 17. Espectros de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU.	68
Figura 18. Cromatogramas do MTX, 5-FLU e MTX+5-FLU (25 µg.mL ⁻¹) obtidos em fase móvel tampão acetato de amônio e metanol (70:30).	69
Figura 19. Curva analítica do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE.	71
Figura 20. Cromatograma do sobrenadante das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP).	74
Figura 21. Cromatogramas das soluções de 5-FLU em: (A) HCl/KCl pH 1,2, (B) tampão fosfato pH 6,8 e (C) tampão fosfato pH 7,4.	74
Figura 22. Gráfico de Debye.	75

Figura 23. Influência do potencial zeta em função do pH do 5-fluorouracil, quitosana e tripolifosfato de sódio.....	77
Figura 24. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas sem fármaco na proporção 4:1 QS/TPP (aumento de 50.000x).	90
Figura 25. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas com fármaco na proporção 4:1:1 QS/TPP/5-FLU (aumento de 60.000x).	90
Figura 26. Distribuição de tamanho das nanopartículas sem e com adição de 5-FLU...	91
Figura 27. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do MTX, QS e QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3).	95
Figura 28. Espectros ampliados na região de 1800 a 850 cm^{-1} do infravermelho da QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3).	96
Figura 29. Espectro de RMN ^1H das amostras (a) QS, (b) QS-MTX-1, (c) QS-MTX-2, (d) QS-MTX-3 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$) e (e) MTX (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).....	97
Figura 30. Curvas de DSC do MTX (a), QS-MTX-1 (b), QS-MTX-2 (c), QS-MTX-3 (d) e da QS (e).	99
Figura 31. Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS (A) e MTX (B).	100
Figura 32. Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS-MTX conjugados, QS-MTX-1 (C), QS-MTX-2 (D) e QS-MTX-3 (E).....	101
Figura 33. Nanopartículas obtidas usando QS funcionalizada com MTX (A) e nanopartículas obtidas usando mistura de QS não funcionalizada e QS funcionalizada com MTX (B).	102
Figura 34. Influência da adição de dispersões de mucina, em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) no potencial zeta das nanopartículas (média $\pm$ DP, n = 3).	104
Figura 35. Fotomicrografias representativa obtidas por MEV-FEG da superfície e corte transversal das micropartículas sem nanopartículas (a), micropartículas carregadas com nanopartículas nas proporções NP:AR/P 1:1 (b), 1:2 (c) e 1:4 (d).....	109
Figura 36. Perfis de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU) em comparação com o fármaco livre em meios ácido HCl/KCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 7,4.....	111
Figura 37. Espectro de absorção da quitosana e quitosana marcada com Cy5 na região do UV.	116

Figura 38. Espectro de absorção do amido resistente/pectina e do amido resistente/pectina marcado com rodamina na região do UV.	117
Figura 39. Espectro de absorção do amido resistente/pectina e amido resistente/pectina marcado com o corante BDP na região do UV.	118
Figura 40. Distribuição de tamanho das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) preparadas usando o método de aerossolização.	119
Figura 41. Os corantes BDP-NH ₂ e Rodamina-NH ₂ no sobrenadante da solução de cloreto de alumínio e cloreto de cálcio, respectivamente, após a formação das micropartículas de AR/P.....	120
Figura 42. Imagem confocal: (A) micropartícula de AR/P; (B) micropartícula de AR/P carregada com nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha); (C) nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha).	121
Figura 43. Imagem representativa da posição dos principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e do TGI mostrado na Figura 44 e 45.	123
Figura 44. Biodistribuição <i>in vivo</i> das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após a administração oral e os animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa).	124
Figura 45. Biodistribuição <i>in vivo</i> das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após administração oral e animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa).....	126
Figura 46. Intensidade de fluorescência das nanopartículas QS/TPP e das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas QS/TPP (sinal Cy5) em vários tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) nos principais órgãos (sangue, rim, fígado, baço, pulmão e coração), determinada usando análise de ROI (p <0,05).....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos empregados na metodologia analítica.....	43
Tabela 2. Síntese do acoplamento da quitosana com metotrexato ativado em diferentes graus de funcionalização.	51
Tabela 3. Dados de precisão intracorrida e intercorrida do 5-FLU.	66
Tabela 4. Resultados obtidos para a exatidão.....	67
Tabela 5. Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do MTX.....	70
Tabela 6. Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do 5-FLU.....	70
Tabela 7. Dados das curvas analíticas obtidas por CLAE.....	71
Tabela 8. Dados de precisão intracorrida e intercorrida do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE.	72
Tabela 9. Resultados obtidos para a exatidão do método analítico para quantificação do MTX e 5-FLU.....	73
Tabela 10. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do MTX e 5-FLU por CLAE.	73
Tabela 11. Avaliação da influência da variação de massa de quitosana no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco.	78
Tabela 12. Avaliação da influência da variação de massa de TPP no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco.	79
Tabela 13. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).	81
Tabela 14. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 5,5 (média $\pm$ DP, n = 3).	83
Tabela 15. Avaliação da eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 e 5,5, utilizando os métodos de ultracentrifugação e filtração-centrifugação (média $\pm$ DP, n = 3).	85
Tabela 16. Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas usando NaCl 0,1 M em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).	86

Tabela 17. Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....	87
Tabela 18. Efeito do aumento do tempo de interação do 5-FLU com a quitosana na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....	88
Tabela 19. Efeito do pH da solução 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....	89
Tabela 20. Potencial zeta do MTX, QS, QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) (média $\pm$ DP).....	93
Tabela 21. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EE% das nanopartículas preparadas utilizando QS-MTX conjugados.....	103
Tabela 22. Rendimento (%) do processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas com diferentes proporções de AR/P.....	106
Tabela 23. Eficiência de encapsulação das nanopartículas nas micropartículas preparadas com diferentes proporções de AR/P.....	107
Tabela 24. Percentual de 5-FLU liberado em meio ácido pH 1,2 (15 e 120 min) e tampão fosfato pH 7,4 (30 e 240 min).....	111
Tabela 25. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU).....	113

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

CC: Câncer colorretal

QS: Quitosana

5-FLU: 5-fluorouracil

MTX: Metotrexato

TPP: Tripolifosfato

AA: Alta amilose

AR: Amido resistente 3

P: Pectina

TGI: Trato gastrointestinal

NPs: Nanopartículas poliméricas

MPs: Micropartículas poliméricas

IV: Infravermelho

A2: Segundo coeficiente virial

PDI: Índice de polidispersão

EE%: Porcentagem de eficiência de encapsulação

tR: Tempo de retenção

LQ: Limite de quantificação

LD: Limite de detecção

DPR%: Desvio padrão relativo em porcentagem

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DLS: Espalhamento de luz dinâmica (*dynamic light scattering*)

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

DSC: Calorimetria exploratória diferencial (*differential scanning calorimeter*)

DTG: Termogravimetria Derivada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1	Câncer colorretal	24
2.2	5-fluorouracil	27
2.3	Metotrexato	28
2.4	Nanopartículas poliméricas.....	30
2.5	Polímeros naturais.....	32
2.5.1	Quitosana	32
2.5.2	Amido resistente	34
2.5.3	Pectina	35
3	OBJETIVO.....	39
3.1	Etapas para alcançar o objetivo proposto	39
4	MATERIAL E MÉTODO.....	40
4.1	Materiais	40
4.2	Principais equipamentos	40
5	MÉTODOS.....	40
5.1	Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta	40
5.1.1	Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis ..	41
5.1.2	Linearidade	41
5.1.3	Precisão.....	41
5.1.4	Exatidão	41
5.1.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	42
5.2	Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
5.2.1	Conformidade do sistema cromatográfico.....	43
5.2.2	Linearidade	44
5.2.3	Precisão.....	44
5.2.4	Exatidão	44
5.2.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	44
5.2.6	Especificidade/Seletividade.....	44
5.3	Caracterização do polímero Quitosana	45
5.3.1	Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial (A_2).....	45

5.4	Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas	45
5.4.1	Análise do potencial zeta em função do pH	45
5.5	Preparo das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	46
5.6	Caracterização físico-química das nanopartículas QS/TPP/5-FLU	47
5.6.1	Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI)	47
5.6.2	Análise do potencial zeta	47
5.6.3	Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	47
5.6.3.1	Estudos para otimizar a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	48
5.6.4	Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	49
5.7	Síntese da quitosana funcionalizada com metotrexato	49
5.7.1	Síntese do MTX com N-hidroxisuccinimida (NHS) e N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)	50
5.7.2	Síntese de acoplamento da QS com MTX ativado	51
5.8	Caracterização da síntese quitosana funcionalizada com metotrexato	51
5.8.1	Determinação do rendimento bruto da síntese de acoplamento QS-MTX	52
5.8.2	Determinação da faixa de fusão	52
5.8.3	Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX	52
5.8.4	Análise do potencial zeta QS-MTX conjugados	52
5.8.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	53
5.8.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	53
5.8.7	DSC	53
5.8.8	TG/DTG	53
5.9	Desenvolvimento das nanopartículas funcionalizadas com MTX	54
5.10	Caracterização físico-química das nanopartículas funcionalizadas com MTX	54
5.10.1	Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI)	54
5.10.2	Análise do potencial zeta	54
5.10.3	Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%)	54
5.11	Estudo das propriedades mucoadesivas	55
5.11.1	Estudo in vitro de interação entre mucina e nanopartículas	55
5.12	Desenvolvimento das nanopartículas incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina	55
5.12.1	Preparo da dispersão de amido resistente e pectina para obtenção das micropartículas	55

5.12.2	Desenvolvimento das micropartículas carregadas com nanopartículas ...	56
5.12.3	Rendimento (%).....	56
5.12.4	Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas.....	57
5.12.5	Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (FEG-MEV)	57
5.13	Estudo de dissolução do 5-FLU	57
5.13.1	Estudo de solubilidade do 5-FLU	57
5.13.2	Determinação do perfil de liberação in vitro do 5-FLU	58
5.13.3	Análise dos mecanismos de liberação in vitro do 5-FLU.....	58
5.14	Estudos de biodistribuição <i>in vivo</i> por imagem óptica de pequenos animais..	58
5.15	Síntese de marcação da quitosana com Cy5	59
5.16	Síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH ₂	60
5.17	Síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH ₂	61
5.18	Preparo das nanopartículas	61
5.19	Preparo das micropartículas carregadas com nanopartículas.....	61
5.19.1	Determinação do tamanho das micropartículas.....	62
5.19.2	Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas.....	62
5.19.3	Imagem confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas....	62
5.19.4	Avaliação da biodistribuição in vivo das nanopartículas e das micropartículas carregadas com nanopartículas através de imagem óptica de pequenos animais	63
5.19.5	Protocolo de aquisição de imagem	63
5.20	Análise estatística	64
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.1	Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta	65
6.1.1	Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis .	65
6.1.2	Linearidade	65
6.1.3	Precisão.....	66
6.1.4	Exatidão.....	66
6.1.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	67
6.2	Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	67

6.2.1	Determinação do espectro de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU em fase móvel.....	67
6.2.2	Conformidade do sistema cromatográfico.....	68
6.2.3	Linearidade	70
6.2.4	Precisão.....	71
6.2.5	Exatidão	72
6.2.6	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	73
6.2.7	Especificidade/Seletividade.....	73
6.3	Caracterização do polímero Quitosana	74
6.3.1	Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial (A_2).....	75
6.4	Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas	76
6.4.1	Análise do potencial zeta em função do pH	76
6.5	Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	78
6.6	Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	84
6.6.1	Otimização da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU.....	85
6.6.1.1	1. Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU.....	86
6.6.1.2	2. Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação.....	87
6.6.1.3	3. Efeito do aumento do tempo de interação entre o fármaco e a quitosana na eficiência de encapsulação do 5-FLU.....	88
6.6.1.4	4. Efeito do pH da solução de 5-FLU na eficiência de encapsulação...	88
6.7	Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU	90
6.8	Caracterização da síntese da quitosana funcionalizada com MTX.....	92
6.8.1	Determinação do rendimento bruto da síntese de conjugação QS-MTX .	92
6.8.2	Determinação da faixa de fusão.....	92
6.8.3	Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX	92
6.8.4	Análise do potencial zeta da QS-MTX conjugados.....	93
6.8.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	93
6.8.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	96
6.8.7	DSC	98
6.8.8	TG/DTG	99

6.9	Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas funcionalizadas com MTX.....	101
6.10	Estudo das propriedades mucoadesivas	103
6.10.1	Estudo <i>in vitro</i> de interação entre mucina e nanopartículas	103
6.11	Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas	106
6.11.1	Rendimento (%).....	106
6.11.2	Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas	106
6.11.3	Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (MEV-FEG)	107
6.12	Estudos de dissolução do 5-FLU	109
6.12.1	Estudo de solubilidade do 5-FLU	110
6.12.2	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU	110
6.12.3	Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU.....	112
6.13	Estudos de biodistribuição <i>in vivo</i> por imagem óptica de pequenos animais	115
6.13.1	Caracterização da síntese de marcação da quitosana com Cy5	115
6.13.2	Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH ₂	116
6.13.3	Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH ₂	117
6.13.4	Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas usando o método de aerossolização	118
6.13.5	Microscopia confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas.....	121
6.13.6	Avaliação da biodistribuição <i>in vivo</i> de nanopartículas e micropartículas carregadas com nanopartículas por imagem óptica de pequenos animais	122
7	CONCLUSÕES.....	129
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CC) é a terceira maior incidência mundial e a quarta principal causa de mortalidade relacionada ao câncer entre homens e mulheres, sendo que está previsto mais de 2,2 milhões de novos casos até 2030, destacando a necessidade de novas alternativas para o tratamento desta patologia (SADREDDINI et al., 2017; SOCIETY, 2018).

O tratamento do CC depende principalmente do estágio de desenvolvimento da doença, bem como da localização do tumor. Várias abordagens têm sido utilizadas, incluindo ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia; além disso, as combinações de dois ou mais tratamentos são frequentemente utilizados (CHANDRAN et al., 2017; ESTANQUEIRO et al., 2015).

Apesar de eficiente na inibição do crescimento celular, a quimioterapia intravenosa é frequentemente ineficaz na prevenção da recorrência e progressão do câncer em pacientes. Isso se deve principalmente à falta de especificidade/seletividade de fármacos quimioterápicos em células tumorais, no qual na maioria das vezes esses fármacos não conseguem atingir os locais alvo (especialmente os tumores na região colorretal) em concentrações terapêuticas adequadas. Desta forma, apenas uma pequena fração do fármaco administrado atinge o local de ação, enquanto o restante é distribuído em órgãos e tecidos saudáveis. Esta liberação não direcionada dos fármacos citotóxicos resulta no agravamento da toxicidade e o surgimento de efeitos colaterais graves (ESTANQUEIRO et al., 2015; SADREDDINI et al., 2017). Além disso, outro grande problema da quimioterapia convencional é a predisposição das células tumorais a se tornarem resistentes aos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos (MATOS et al., 2019).

A via oral representa uma alternativa promissora no tratamento do CC, já que entre as vias de administração de fármacos, ela é considerada segura, não invasiva, que possibilita a auto-administração e flexibilidade na dosagem, fatores que contribuem para uma maior aceitação e adesão do paciente (ISHA et al., 2012; ALEXANDER, 2009; PINTO, 2010). No entanto, a vetorização de fármacos através da via oral representa um grande desafio, uma vez que existem diversas barreiras ao longo do trato gastrointestinal (TGI) a serem superadas para que o fármaco alcance o local desejado. Neste sentido, a liberação sítio específica de fármacos representa uma alternativa racional para a vetorização desses agentes terapêuticos para os sítios alvos.

Tendo em vista as limitações da terapia convencional do CC, a nanotecnologia farmacêutica é uma importante ferramenta tecnológica para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos visando a vetorização desses agentes antineoplásicos para os sítios alvos.

As nanopartículas permitem o encapsulamento de fármacos com baixa estabilidade, protegendo-os contra a degradação, promovendo a modulação das taxas de liberação do fármaco e/ou o seu direcionamento para órgãos ou tecidos específicos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; HUA et al., 2015). Estudos demonstraram a atividade antitumoral de nanopartículas no tratamento do CC, bem como sua seletividade para as células tumorais (CHENG et al., 2019; GU et al., 2019).

Adicionalmente, o tamanho reduzido das nanopartículas e a possibilidade de associação de fármacos/moléculas à sua superfície são importantes propriedades que contribuem para seu uso na terapia do CC. Assim, a utilização de ligantes na superfície de sistemas nanoestruturados representa uma estratégia promissora, que possibilitará o direcionamento de partículas para as células tumorais, maximizando sua interação celular, bem como levando à uma maior seletividade e consequentemente redução dos efeitos adversos/tóxicos (ASHWANIKUMAR et al., 2014; WANG et al., 2015). Estudos recentes têm demonstrado a capacidade do metotrexato (MTX) direcionar/vetorizar nanoestruturas através dos receptores de folato (KAR et al., 2019; SARGAZI et al., 2018).

Outra importante propriedade que as nanopartículas poliméricas podem apresentar é a mucoadesão, pois essa característica pode prolongar o tempo de permanência do sistema no local alvo, favorecendo a interação com a membrana biológica e, conseqüentemente, promovendo um aumento da concentração do fármaco no local de ação (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; ENSIGN; CONE; HANES, 2012). Entre os inúmeros polímeros utilizados para essa finalidade, a quitosana (QS) têm-se destacado por ser um polissacarídeo catiônico biocompatível e biodegradável, que oferece notáveis propriedades biológicas aos sistemas de liberação de fármacos.

Devido à presença de cargas superficiais positivas, a QS favorece a adesão à camada de muco do intestino através de interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina, melhorando a interação biológica do sistema (RINAUDO, 2011; WOODLEY, 2001). A habilidade da QS se reticular inter e intramolecularmente quando em contato com poliânions têm sido explorada para a obtenção de NPs através do

processo de geleificação ionotrópica, o qual é um processo quimicamente verde e livre de solvente orgânico (CALVO et al., 1997; FAN et al., 2012).

A performance das nanopartículas pode ser ainda melhorada, através da encapsulação das nanopartículas em sistemas de liberação específicos ao cólon por administração oral, o que deve permitir a vetorização direcionada de quimioterápicos ao cólon, favorecendo o aumento do efeito terapêutico, e minimizando a dose administrada e os efeitos colaterais associados (MA et al., 2015).

O desenvolvimento de sistemas orais visando a liberação cólon-específica de fármacos pode ser baseado em materiais que são especificamente degradados por enzimas produzidas por bactérias colônicas. O amido resistente (AR) é uma fração de amido hidrotermicamente modificada que resiste à digestão no estômago e no intestino delgado, devido à sua estrutura tridimensional mais organizada e empacotada o que dificulta o acesso das enzimas proteolíticas às ligações glicosídicas (MENEGUIN et al., 2018; YOON; LEE; LIM, 2009). Da mesma forma, a pectina (P) é outro polissacarídeo adequado para direcionar fármacos ao cólon, uma vez que é resistente à digestão de amilases e proteases, permanecendo como agregados macromoleculares nas porções superiores do TGI (LIU et al., 2003; MENEGUIN et al., 2018).

Dentre os antineoplásicos utilizados para o tratamento do CC, os mais utilizados na terapia isolada ou combinada com cirurgia e/ou radioterapia são leucovorina, irinotecano, 5-fluorouracil (5-FLU) e MTX (SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004). O 5-FLU é um análogo da pirimidina pertencente à classe dos antimetabólitos, sendo considerado um dos quimioterápicos de primeira linha no tratamento do CC. No entanto, o rápido catabolismo (cerca de 80%) pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) limita a eficácia terapêutica do 5-FLU. Além disso, o 5-FLU é caracterizado por ação não seletiva contra o epitélio do trato gastrointestinal, meia-vida curta na circulação plasmática (10-15 min) e distúrbios da medula óssea (ASHWANIKUMAR et al., 2014; BLANCO et al., 2011).

Diante do comportamento agressivo do CC, está cada vez mais evidente que a terapia combinada pode proporcionar efeitos mais significativos do que o uso dos agentes antineoplásicos individualizados, resultando na melhoria das taxas de resposta e na sobrevida dos pacientes (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LI et al., 2011). A eficácia do 5-FLU na terapia de CC pode ser consideravelmente aumentada quando utilizado em combinação com o MTX, sendo bem reconhecido na quimioterapia contra

o câncer utilizando agentes antineoplásicos sinérgicos (ASHWANIKUMAR et al., 2014).

O MTX é um antagonista do ácido fólico, amplamente utilizado no tratamento de vários tumores sólidos, incluindo câncer de mama e colorretal. Além da sua eficiência na terapia do CC, o MTX apresenta semelhança estrutural com o ácido fólico, o que permite se ligar ao transportador de folato e ser internalizado pelas células cancerígenas devido à alta expressão de receptores de folato na superfície das células cancerosas (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LI et al., 2014; WANG et al., 2015). Contudo, sua elevada citotoxicidade e baixa seletividade são responsáveis por uma série de efeitos adversos (ASHWANIKUMAR et al., 2014).

Com base nos fatos expostos, o desenvolvimento de nanopartículas de QS carregadas com 5-FLU, funcionalizadas com MTX e incorporadas em micropartículas de AR/P para administração oral, representa uma potencial estratégia para a vetorização direcionada ao cólon, levando ao aumento da atividade antitumoral e, consequentemente, o aumento da eficácia terapêutica no tratamento do CC.

minimizar a liberação indesejada de fármacos na corrente sanguínea, bem como seus efeitos citotóxicos durante a terapia do câncer colorretal.

Esses dados evidenciam que as micropartículas de AR/P foram capazes de proteger as nanopartículas, prevenindo sua absorção indesejada no sangue e nos principais órgãos após a administração oral.

7 CONCLUSÕES

A otimização e adequação dos parâmetros para a obtenção de nanopartículas de QS/TPP/5-FLU, tais como proporções de massa polimérica, ordem de adição dos componentes no sistema, e valores de pH da solução de QS, estavam diretamente relacionados à formação, bem como às propriedades físico-químicas das nanopartículas (tamanho, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação), constituindo uma etapa fundamental do presente estudo.

O desenvolvimento das nanopartículas baseadas em QS/TPP/5-FLU através do processo de geleificação ionotrópica permitiu a obtenção de partículas com forma esférica, diâmetro nanométrico, com distribuição homogênea de tamanho e elevado valor de potencial zeta, apresentando características favoráveis para a interação com a superfície celular, bem como a estabilidade do sistema. A eficiência de encapsulação do 5-FLU nestas nanopartículas foi de 23,58%.

A QS foi conjugada com sucesso com MTX através da formação de ligação amida, e diferentes graus de conjugação de MTX foram obtidos. Após a conjugação com MTX, as propriedades dessas nanopartículas como tamanho, PDI e potencial zeta permaneceram favoráveis, com uma pequena redução no teor de encapsulação do 5-FLU (15,71-18,23%). Essas nanopartículas funcionalizadas com MTX podem ser exploradas como uma estratégia para o direcionamento ativo para as células tumorais mediado por receptores de folato, a fim de aumentar o acúmulo no tumor e alcançar uma terapia mais seletiva no tratamento do câncer colorretal.

Da mesma maneira, essas nanopartículas foram conjugadas com sucesso usando o corante Cy5 e a quitosana marcada com Cy5 foi usada para avaliar a biodistribuição *in vivo* de nanopartículas e micropartículas carregadas de nanopartículas ao longo do TGI após administração oral por imagem animal multiespectral.

A capacidade mucoadesiva das nanopartículas foi demonstrada, de modo que a mucoadesão foi favorecida em pH 6,8 (região colônica) e reduzida em ambiente ácido.

As nanopartículas de quitosana foram encapsuladas com sucesso em micropartículas de amido resistente/pectina através do método de geleificação ionotrópica usando gotejamento manual e aerossolização, apresentando forma esférica e superfície homogênea. Além disso, o processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas usando o método de aerossolização permitiu a formação de micropartículas menores (10 μ m), usadas nos ensaios de biodistribuição *in vivo*.

A eficiência da encapsulação das nanopartículas em micropartículas de amido resistente/pectina foi evidenciada através da redução das taxas de liberação do 5-FLU em meio ácido, bem como o prolongamento das taxas de liberação do fármaco, evitando a liberação prematura das nanopartículas.

Os estudos de biodistribuição *in vivo* demonstraram liberação mínima das nanopartículas a partir das micropartículas ao longo do TGI, em comparação com as nanopartículas administradas sozinhas, que foram rapidamente liberadas durante seu trânsito no TGI. Além disso, os resultados revelaram que apenas as nanopartículas de quitosana foram absorvidas pela corrente sanguínea com subsequente eliminação pelo rim. Assim, o encapsulamento das nanopartículas nas micropartículas de amido resistente/pectina poderia não apenas ajudar as nanopartículas a escapar e/ou resistir ao ambiente gástrico do trato digestivo, mas também evitar potenciais efeitos colaterais sistêmicos pela via oral.

Baseado no conjunto de dados, as micropartículas de amido resistente/pectina são promissoras para a vetorização de nanopartículas carregadas de fármaco ao cólon pela via oral e os resultados deste trabalho devem contribuir para os avanços no tratamento do câncer colorretal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLMAALI, S. S. et al. Chemically crosslinked nanogels of PEGylated poly ethyleneimine (l-histidine substituted) synthesized via metal ion coordinated self-assembly for delivery of methotrexate: Cytocompatibility, cellular delivery and antitumor activity in resistant cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 897–907, 2016.

AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. J.; NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 42–58, 2010.

AJMAL, M. et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of methotrexate conjugated fluorescent carbon nanoparticles as drug delivery system for human lung cancer targeting. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 111–120, 2015.

ALEXANDER, K. Dosage Forms and Their Routes of Administration. In: HACKER, M.; MESSER, W.; BACHMANN, K. **Pharmacology: principles and practice**. Burlington, MA: Academic Press; Elsevier, 2009. Chapter 2, p. 9-29.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

ASHWANIKUMAR, N. et al. Dual drug delivery of 5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) through random copolymeric nanomicelles of PLGA and polyethylenimine demonstrating enhanced cell uptake and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 520–528, 2014.

ASLAN, B. et al. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 904–913, 2013.

BANERJEE, D. et al. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2–3, p. 164–173, 2002.

BHARVADA, E.; SHAH, V.; MISRA, M. Exploring mixing uniformity of a pharmaceutical blend in a high shear mixture granulator using enthalpy values obtained from DSC. **Powder Technology**, v. 276, p. 103–111, 2015.

BHAVSAR, M. D.; AMIJI, M. M. Gastrointestinal distribution and in vivo gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS). **Journal**

of Controlled Release, v. 119, n. 3, p. 339–348, 2007.

BHUMKAR, R. D.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. 2–7, 2006.

BLANCO, M. D. et al. In vitro and in vivo evaluation of a folate-targeted copolymeric submicrohydrogel based on N-isopropylacrylamide as 5-fluorouracil delivery system. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1107–1125, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Validação de métodos analíticos. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 2017.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 24–36, 2012.

CALVO, P. et al. **Calvo1997_Article_ChitosanAndChitosanEthyleneOxi.pdf**, 1997.
CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CHADHA, R. et al. Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical and other techniques. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 3, p. 245–257, 2009.

CHAKRABORTY, J. et al. Mg-Al layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid drug delivery system: Evaluation of efficacy. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 2168–2174, 2013.

CHANDRAN, S. P. et al. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2, p. 45–48, 2017.

CHENG, G. et al. Anticancer activity of polymeric nanoparticles containing linoleic acid-SN38 (LA-SN38) conjugate in a murine model of colorectal cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. April, p. 822–829, 2019.

COIMBRA, P.M.A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2010.

COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 235–246, 2012.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profile. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p.123–133, 2001.

DA SILVA BARBI, M. et al. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865–874, 2015.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, 2010.

DE CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, n. October 2018, 2019.

DE LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.

DIMANTOV, A. et al. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93–100, 2004.

DIMANTOV, A.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Surface characterization and dissolution properties of high amylose com starch-pectin coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 29–37, 2004.

DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 243–251, 2010.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557–570, 2012.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.

FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan

nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136–151, 2011.

FERNANDEZ-MEGIA, E. et al. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ¹H-NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 2, p. 155–161, 2005.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 2004.

FERREIRA, L. M. B. et al. Supramolecular design of hydrophobic and hydrophilic polymeric nanoparticles. **Design and Development of New Nanocarriers**, p. 181–221, 2018.

FUCHS, ADRIAN V.; GEMMELL, ANNA C.; THURECHT, K. J. Utilising polymers to understand diseases: advanced molecular imaging agents. **Polymer Chemistry**, n. 6, p. 868–880, 2015.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 139–151, 2003.

GU, X. et al. cRGD-decorated biodegradable polytyrosine nanoparticles for robust encapsulation and targeted delivery of doxorubicin to colorectal cancer in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 301, n. March, p. 110–118, 2019.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HASSANI, S. et al. Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes - Effect of parameters and encapsulation of tacrine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 34–43, 2015.

HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SCHOENMAKERS, P. J.; KOK, W. T. Determination of the amylose-amylopectin ratio of starches by iodine-affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1053, n. 1–2, p. 227–234, 2004.

HTOON, A. et al. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236–245, 2009.

HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1117–1132, 2015.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. O que é o câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20%C3%A9%20um%20termo%20que,adjacentes%20ou%20%C3%B3rg%C3%A3os%20a%20dist%C3%A2ncia>.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. p.25-27.

ING, L. Y. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, Article ID 632698, 2012.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JAIN, A. et al. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 179–190, 2010.

Jl, J. et al. Preparation, characterization, and in vitro release of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles loaded with methotrexate for targeted delivery. **Polymer Bulletin**, v. 68, n. 6, p. 1707–1720, 2012.

KAR, S. et al. Curcumin ameliorates the targeted delivery of methotrexate intercalated montmorillonite clay to cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 135, n. October 2018, p. 91–102, 2019.

KARAMI, F. et al. Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 6, p. 373–391, 2019.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4,

p. 801–810, 2010.

KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 216–225, 2006.

KOZOVSKA, Z.; GABRISOVA, V.; KUCEROVA, L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 911–916, 2014.

KUTSCHER, M. et al. Influence of salt type and ionic strength on self-assembly of dextran sulfate-ciprofloxacin nanoplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 21–29, 2015.

LI, C.; HEIN, S.; WANG, K. Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complex for the Delivery of Protein Drugs. **ISRN Biomaterials**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

LI, H. L. et al. Folate-polyethylene glycol conjugated carboxymethyl chitosan for tumor-targeted delivery of 5-fluorouracil. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p. 786–792, 2014.

LI, P. et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 698–704, 2011.

LIU, L. S. et al. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333–3343, 2003.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LU, Y.; LOW, P. S. Y. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 675–693, 2002.

LUO, F. et al. Validation of a Janus role of methotrexate-based PEGylated chitosan nanoparticles in vitro. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2014.

MA, Y. et al. The in vivo fate of nanoparticles and nanoparticle-loaded microcapsules after oral administration in mice: Evaluation of their potential for colon-specific delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, n. June, p. 393–403, 2015.

MATOS, A. I. et al. Nanotechnology is an important strategy for combinational innovative chemo-immunotherapies against colorectal cancer. **Journal of Controlled**

Release, v. 307, n. June, p. 108–138, 2019.

MENEGUIN, A. B. et al. 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**, v. 123, n. October 2017, p. 84–94, 2018.

MENEGUIN, A. B. **micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina como estratégia para administração oral de insulina**. 2016. 212f Tese (Doutorado). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". 2016.

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

MISHRA, J. et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 86, n. 3, p. 232–250, 2013.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B. R.; VOSLOO, H. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 136, n. 1, p. 16–23, 2004.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: What can we learn? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 1997.

NASKAR, S.; SHARMA, S.; KUOTSU, K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, n. June 2018, p. 66–81, 2019.

NOGUEIRA, D. R. et al. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2758–2772, 2013.

NUNES, R; SARMENTO, B; SALETTE, R; FONTE, P. Oral nanotechnological approaches for colon-specific drug delivery. In: **Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine**, p. 133–168, 2018.

PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis

of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. **Cancer Nanotechnology**, v. 1, n. 1–6, p. 47–62, 2010.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4^a. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

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

PERICÀS, J.; CORREDOIRA, J.; MIRÓ MEDA, J. Colorectal Adenomas. p. 1065–1075, 2016.

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

PRABAHARAN, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1313–1322, 2015.

PRASAD, R. et al. Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, n. 1–2, p. 70–78, 2007.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 785–796, 2004.

RÁZGA, F. et al. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 488–499, 2016.

RINAUDO, M. New amphiphilic grafted copolymers based on polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1338–1344, 2011.

RODEMBUSCH, F. **Espalhamento de luz estático e dinâmico em polímeros do tipo polimetacrilato, fluorescentes por transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (TPIEE)**. 2001. 91 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**,

v. 764, n. 1–2, p. 217–254, 2001.

SÁBIO, R. M. et al. New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, n. April, p. 379–409, 2019.

SADANANDAM, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 619–625, 2013.

SADREDDINI, S. et al. Chitosan nanoparticles as a dual drug/siRNA delivery system for treatment of colorectal cancer. **Immunology Letters**, v. 181, p. 79–86, 2017.

SARGAZI, A. et al. Evaluation of supramolecule conjugated magnetic nanoparticles as a simultaneous carrier for methotrexate and tamoxifen. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, n. February 2017, p. 115–122, 2018.

SARMENTO, B. et al. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2006.

SCHLEH, C. et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 36–46, 2012.

SCHRODER, O. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future directions. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 530–537, 2003.

SCHWARTZ, R. N.; BLANKE, C. D.; PESKO, L. J. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. **Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP**, v. 10, n. 5, Supl. B, p. S2-S13, 2004.

SHANMUGANATHAN, R. et al. Chitosan nanopolymers: An overview of drug delivery against cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 727–736, 2019.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 163–174, 2012.

SINHA, R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: Bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909–1917, 2006.

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

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 2005.

SOCIETY, A. C. . **Cancer Facts & Figures 2018**. Atlanta: American Cancer Society; 2018.<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.

SONAJE, K. et al. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-Responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, n. 26, p. 6849–6858, 2010.

SREEKUMAR, S. et al. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

STEIN, G. S.; PARDEE, A. B. **Cell cycle and growth control: Biomolecular regulation and Cancer**. 2nd. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; Springer, 2004. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471656437>.

TAJIRI, T. et al. Developing dissolution testing methodologies for extended-release oral dosage forms with supersaturating properties. Case example: Solid dispersion matrix of indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 368–374, 2015.

THAPA, R. K. et al. Silver nanoparticle-embedded graphene oxide-methotrexate for targeted cancer treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 153, p. 95–103, 2017.

THURECHT, K. J. et al. Functional hyperbranched polymers: Toward targeted in vivo ¹⁹F magnetic resonance imaging using designed macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 15, p. 5336–5337, 2010.

TIĞLI AYDIN, R. S.; PULAT, M. 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

TUMMALA, S.; SATISH KUMAR, M. N.; PRAKASH, A. Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 308–314, 2015.

URBANSKA, A. M. et al. Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer. **Biomaterials**, v. 33, n. 18, p. 4752–4761, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011.

UPRETI, M.; JYOTI, A.; SETHI, P. Tumor microenvironment and nanotherapeutics. **Translational Cancer Research**, v. 2, p. 309–319, 2013.

VALENTE, J. et al. Colloidal Behavior of Proteins: Effects of the Second Virial Coefficient on Solubility, Crystallization and Aggregation of Proteins in Aqueous Solution. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 427–436, 2006.

VARUM, F. O. et al. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 535–548, 2008.

WANG, C. F. et al. Dual-drug delivery by porous silicon nanoparticles for improved cellular uptake, sustained release, and combination therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 16, n. 1, p. 206–214, 2015.

WANG, Y. et al. Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: Preparation, characterization and drug release behavior in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1665–1670, 2011.

WEHLAND, M. et al. Biomarkers for anti-angiogenic therapy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9338–9364, 2013.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77–84, 2001.

WU, Y. et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1–2, p. 235–245, 2005.

YOON, H. S.; LEE, J. H.; LIM, S. T. Utilization of retrograded waxy maize starch gels as tablet matrix for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 449–453, 2009.

ZAVAREZE, E. D. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 317–328,

2011.

ZHANG, X. B. et al. Prediction of the onset of flooding in an inclined tube at cryogenic temperatures. **Cryogenics**, v. 61, p. 98–106, 2014.