



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
Pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos



Amélia Aparecida Rocca Pereira

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS BASEADOS EM NANOSUSPENSÃO DE
MESALAZINA E COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA COLITE ULCERATIVA

Araraquara

2022

AMÉLIA APARECIDA ROCCA PEREIRA

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS BASEADOS EM NANOSUSPENSÕES DE
MESALAZINA E COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA COLITE ULCERATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientador: Dr^o Leonardo Miziara Barbosa Ferreira

Araraquara

2022

P436s

Pereira, Amélia Aparecida Rocca.

Sistemas de liberação de fármacos baseados em nanosuspensões de mesalazina e complexos polieletrólíticos para potencial aplicação na colite ulcerativa /Amélia aparecida Rocca Pereira. – Araraquara: [S.n.], 2022.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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 Barbosa Ferreira.

1. Quitosana. 2. Alginato. 3. HPMC. 4. Mucoadesão. 5. Complexos polieletrólíticos. 6. Nanopartículas poliméricas. 7. Mesalazina. 8. Nanosuspensões. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Ferreira, Leonardo Miziara Barbosa, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS BASEADOS EM
NANOSSUSPENSÃO DE MESALAZINA E COMPLEXOS
POLIELETROLÍTICOS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COLITE
ULCERATIVA

AUTORA: AMÉLIA APARECIDA ROCCA PEREIRA

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

COORIENTADOR: LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA

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

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Participação Virtual)
Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais / Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas UNESP Araraquara

Araraquara, 20 de janeiro de 2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e nossa senhora Aparecida, ao meu esposo Eliandro, à minha orientadora Prof^a Dra^a Maria Palmira Daflon Gremião, ao meu co-orientador Leonardo Miziara e aos colegas de laboratório que contribuíram em meus conhecimentos e aprendizagem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida por essa oportunidade única, por me auxiliarem em todos os momentos difíceis e a todos que estiveram em meu caminho de alguma forma.

Aos meus pais Maria e Oswaldo pelo apoio. Ao meu esposo Eliandro, pelo companheirismo, incentivo, apoio e amor.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, à secretaria após graduação e funcionários desta faculdade.

À minha orientadora Prof^a Dra^a Maria Palmira Daflon Gremião e ao meu coorientador Leonardo Miziara Barabosa Ferreira, pela paciência, confiança, incentivo, dedicação e oportunidade.

À todos os colegas do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, pela contribuição em meu trabalho, em especial Jonatas Lobato, Leonardo Di Filippo, Natália Noronha Ferreira Naddeo, Taís Ribeiro, Bruno Fonseca Santos, Fernanda Boni.

Ao Instituto de Química de Araraquara (UNESP), pela oportunidade de realizar as análises de microscopia.

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (Cnpq), pelos meses de auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

O tempo muito me ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer na derrota, renunciar as palavras e pensamentos negativos, acreditar nos valores humanos, e ser otimista. Apreendi que mais vale tentar do que recuar...

Antes acreditar no que duvidar, que o que vale na vida, não é seu ponto de partida e sim a nossa caminhada.

Cora Coralina

RESUMO

A retocolite ulcerativa (RU) é uma das doenças inflamatórias intestinais (DII) que afetam parte da população mundial por causarem intensa inflamação do TGI (trato gastrointestinal). A terapia consiste em manter a remissão da doença inibindo a ativação da cascata inflamatória, sendo a MSZ (mesalazina) eficaz em casos leves e moderados, no entanto, é um desafio no tratamento manter uma concentração adequada do fármaco na mucosa do cólon, uma vez que o fármaco requer várias administrações diárias (>2g/dia) por apresentar rápida absorção no estômago e intestino delgado e consequentemente dispende de uma concentração insuficiente no cólon. Atualmente, o avanço da tecnologia farmacêutica tem proporcionado diversos sistemas promissores para vetorização de fármacos direcionados a sítios específicos, buscando superar as limitações das formulações convencionais. Neste trabalho, desenvolveu-se nanosuspensões (NS) incorporadas em complexos polieletrólíticos (PECs) como potencial estratégia para vetorização da MSZ ao cólon. Os PECs foram compostos por quitosana (QS), alginato (ALG) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP), polímeros naturais e mucoadesivos, propriedades que contribuem em manter uma maior permanência do fármaco na mucosa inflamada. Para obtenção dos sistemas nanoestruturados foi utilizado o método de complexação polieletrólítica, a qual se incorporou o fármaco em sua forma solubilizada e em nanosuspensões (obtida pelo método de Bottom-up). As nanosuspensões consistem em dispersões coloidais submicrométricas com intuito de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, como a MSZ, aumentando suas taxas de dissolução, viabilizando a transposição às barreiras biológicas e retenção a tecidos específicos. Foi avaliado a influência do pH em diferentes proporções de polícatión (QS) e poliânions (ALG/HP) para obtenção das nanoestruturas. As amostras apresentaram resultados favoráveis (427nm/0,5/+30,5mV-pH4) (227nm/0,5/+24,8mV-pH6) e verificou-se que a concentração de 1,66mg/ml foi a mais adequada para a incorporação do fármaco. Além disso, as nanosuspensões foram comparadas com o fármaco disperso molecularmente e o percentual de eficiência de associação apresentou resultados significativos (59 e 61%). A microscopia de varredura ilustrou a forma esférica das partículas com uma distribuição uniforme. Avaliando a estabilidade dos sistemas, houve redução significativa no diâmetro com menor proporção de CS em pH 4, no PDI a adição de HPMC e maiores proporções de CS proporcionou obtenção de partículas monodispersas e no potencial zeta, houve um aumento significativo na densidade de carga com maior proporção de CS. Assim, a utilização de nanosuspensões pode ser uma estratégia promissora para aumentar o teor de encapsulação de fármacos pouco lipofílicos.

Palavras chave: quitosana, alginato, HPMC, mucoadesão, complexos polieletrólíticos, nanopartículas poliméricas, mesalazina, nanosuspensões.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is one of the inflammatory bowel diseases (IBD) that affect part of the world population by causing intense inflammation of the GI tract (gastrointestinal tract). The therapy consists of maintaining the remission of the disease by inhibiting the activation of the inflammatory cascade, being MSZ (mesalazine) effective in mild and moderate cases, however, it is a challenge in the treatment to maintain an adequate concentration of the drug in the colon mucosa, since that this drug requires several daily administrations ($>2\text{g/day}$) as it is rapidly absorbed in the stomach and small intestine and consequently has an insufficient concentration in the colon. Currently, the advancement of pharmaceutical technology has provided several promising systems for targeting drugs to specific sites, seeking to overcome the limitations of conventional formulations. In this work, we developed nanosuspensions (NS) incorporated in polyelectrolyte complexes (PECs) as a potential strategy for vectoring MSZ to the colon. The PECs were composed of chitosan (QS), alginate (ALG) and hydroxypropylmethylcellulose (HP) phthalate, natural polymers and mucoadhesives, properties that contribute to maintain a longer permanence of the drug in the inflamed mucosa. To obtain the nanostructured systems, the polyelectrolytic complexation method was used, in which the drug was incorporated in its solubilized form and in nanosuspensions (obtained by the Bottom-up method). Nanosuspensions consist of submicron colloidal dispersions in order to increase the solubility of poorly water-soluble drugs, such as MSZ, increasing their dissolution rates, enabling the transposition of biological barriers and retention to specific tissues. The influence of pH on different proportions of polycation (CS) and polyanions (ALG/HP) was evaluated to obtain the nanostructures. The samples showed favorable results ($427\text{nm}/0.5/+30.5\text{mV-pH4}$) ($227\text{nm}/0.5/+24.8\text{mV-pH6}$) and it was found that the concentration of 1.66mg/ml was the most appropriate for drug incorporation. Furthermore, the nanosuspensions were compared with the molecularly dispersed drug and the percentage of association efficiency showed significant results (59 and 61%). Scanning microscopy illustrated the spherical shape of the particles with a uniform distribution. Evaluating the stability of the systems, there was a significant reduction in the diameter with a lower proportion of CS at pH 4, in the PDI the addition of HPMC and higher proportions of CS provided obtaining monodisperse particles and in the zeta potential, there was a significant increase in the charge density with higher proportion of CS. Thus, the use of nanosuspensions may be a promising strategy to increase the encapsulation content of low lipophilic drugs.

Key words: chitosan, alginate, HPMC, mucoadhesion, polyelectrolyte complexes, polymeric nanoparticles, mesalazine, nanosuspensions.

SIGLAS E ABREVIATURAS

DC= doença de Crohn

RU= retocolite ulcerativa

DII= doenças inflamatórias intestinais

MSZ= mesalazina

QS= quitosana

HP= ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

ALG= alginato

COX= cicloxigenase

TGI= trato gastrintestinal

PEC= complexo polieletrólítico

NP= nanopartículas

NS= nanossuspensões

VO= via oral

DPR %= desvio padrão relativo

RPM= rotação por minuto

PDI= índice de polidispersão

DLS= espalhamento de luz dinâmico

UV= ultravioleta

VIS= visível

EA%= eficiência de associação

LD= limite de detecção

LQ= limite de quantificação

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Alterações da mucosa gástrica em DII causadas pelo processo inflamatório.....	19
Figura 2: inflamação da mucosa intestinal marcada pela presença de pólipos.	20
Figura 3: Estrutura química da Mesalazina (MSZ).	21
Figura 4: Representação anatômica do sistema gastrointestinal.	22
Figura 5: Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas.	24
Figura 6: Esquema da absorção de partículas através da mucosa intestinal inflamada	26
Figura 7 Estrutura química da quitosana	26
Figura 8: Estrutura química do alginato	27
Figura 9: Estrutura química do HP	28
Figura 10: Esquema dos métodos de produção de nanopartículas, por top down (redução de tamanho até nanoescala) e botton-up (montagem a partir de átomos e moléculas)	29
Figura 11 Representação do preparo de nanossuspensões utilizando a técnica de Botton-up por precipitação das partículas pelo método de reações ácido -base	30
Figura 12:Preparo das nanossuspensões de MSZ pelo método de Bottom-up (precipitação ácido-base).	35
Figura 13:Preparo da MSZ solubilizada a 0,8mg/ml	36
Figura 14 Espectro de absorção da MSZ e HP	40
Figura 15: Espectro de absorção da MSZ na concentração de 7µg/ml na presença dos polímeros (- -) e ausência de MSZ (- -)	40
Figura 16: Espectro de absorção da MSZ	41
Figura 17: Curva analítica da MSZ em espectrofotômetro UV-VIS	42
Figura 18: Avaliação da redispersabilidade das nanossuspensões de MSZ.....	45
Figura 19:. Classificação do aspecto macroscópico do desenvolvimento das nanopartículas poliméricas sem adição do fármaco	47
Figura 20: Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas compostas por QS/ALG sem adição do fármaco	49
Figura 21: Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas compostas por QS/ALG/HP sem adição do fármaco.....	50
Figura 22: Avaliação do diâmetro médio na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.....	51

Figura 23: Avaliação do índice de polidispersão na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6	52
Figura 24: Avaliação do potencial zeta na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.....	52
Figura 25: Avaliação do diâmetro médio na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.....	53
Figura 26: Avaliação do índice de polidispersão na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6	53
Figura 27: Avaliação do potencial zeta das partículas na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6	54
Figura 28: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – Diâmetro médio.	55
Figura 29: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – PDI	56
Figura 30: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – Potencial zeta.	56
Figura 31: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada ao sistema polimérico binário (QS/ALG) – Diâmetro médio	57
Figura 32: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – PDI.....	58
Figura 33: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas polimérico binário (QS/ALG) e ternário – Potencial zeta	58
Figura 34: Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta na estabilidade física das nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) incorporadas ao sistema polimérico binário (QS/ALG) em pH 4 e 6, após 30 dias do preparo	59
Figura 35: Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta na estabilidade física das partículas de nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) incorporadas ao sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) em pH 4 e 6, após 30 dias de preparo	60
Figura 36: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) matéria-prima MSZ; (B) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH4; (C) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH6; (D) nanossuspensões de MSZ (5mg/ml) em pH4 (E) nanossuspensões de MSZ (5mg/ml) em pH6	62
Figura 37: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) sistema polimérico binário (QS/ALG) sem o fármaco em pH4 (B) sistema polimérico binário (QS/ALG) sem o fármaco em pH6 (C) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4 (D) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6.	62
Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) sem o fármaco em pH4; (B) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) sem o fármaco em pH6; (C) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP)	

com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (D) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6.....63

Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH4; (B) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH6; (C) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (D) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6; (E) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (F) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6;(G) sistema binário (QS/ALG) com o fármaco solubilizado (0,8mg/ml) em pH4; (H) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco solubilizado em pH4 63

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Validação do Método para a quantificação da MSZ por espectrofotometria na região do UV:Vis: Teste de precisão intra-corrida	42
Tabela2: Validação do Método para a quantificação da MSZ por espectrofotometria na região do UV:Vis: Teste de precisão inter-corrida	43
Tabela 3: Validação do Método para a quantificação da MSZ por espectrofotometria na região do UV:Vis: Teste de exatidão	43
Tabela 4: Validação do Método para a quantificação da MSZ por espectrofotometria na região do UV:Vis: Teste de robustez.....	44
Tabela 5: Determinação da solubilidade da MSZ em espectrofotômetro UV-VIS.....	44
Tabela 6: Quantificação da MSZ solubilizada	45
Tabela 7: Caracterização das nanossuspensões de MSZ.....	46
Tabela 8: Avaliação macroscópica das dispersões poliméricas pela associação dos polímeros QS/ALG.	47
Tabela 9: Avaliação macroscópica da variação de concentração e proporção das dispersões poliméricas obtidas pela associação dos polímeros QS/ALG/HP	48
Tabela 10: Eficiência de associação da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas poliméricos.....	61
Tabela11: Eficiência de associação das nanossuspensões de MSZ incorporada aos sistemas poliméricos.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	19
2.1.1 RETOCOLITE ULCERATIVA.....	20
2.1.2 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS.....	21
2.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	24
2.2.1.1 SISTEMAS PARTICULADOS BASEADOS EM COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS.....	25
2.3 POLÍMEROS.....	26
2.3.1 QUITOSANA	26
2.3.2 ALGINATO.....	27
2.3.3 FTALATO DE HIDROXIPROPILMETILCELOULOSE	28
2.4 NANOSSUSPENSÕES	28
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAIS	33
4.1.2 MATÉRIAS PRIMAS	33
4.1.3 EQUIPAMENTOS.....	33
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA MSZ POR ESPECTROFOTÔMETROUV-VIS.....	33
4.2.1.2 SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE	33
4.2.1.3 LINEARIDADE	33
4.2.1.4 PRECISÃO.....	33
4.2.1.5 EXATIDÃO	34
4.2.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	34
4.2.1.7 ROBUSTEZ	34
4.3 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA MSZ EM DIFERENTES VALORES DE pH	34
4.3.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA MSZ EM DIFERENTES MEIOS	34
4.3.2 PREPARO DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ	35
4.3.3 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE PARTÍCULAS PRECIPITADAS	35
4.3.4 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ	36
4.3.5 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOSSUSPENSÕES.....	36
4.3.6 AVALIAÇÃO DA REDISPERSABILIDADE DAS NANOSSUSPENSÕES	36

4.3.7 PREPARO DA MSZ SOLUBILIZADA	36
4.4 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO SEM O FÁRMACO	37
4.4.1 PREPARO DAS DISPERSÕES POLIMÉRICAS	37
4.4.2 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO SEM O FÁRMACO	37
4.4.3 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS SEM O FÁRMACO	37
4.4.4 ESTABILIDADE FÍSICA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO SEM O FÁRMACO	38
4.5 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO COM O FÁRMACO SOLUBILIZADO E EM NANOSSUSPENSÃO.....	38
4.5.1 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO COM O FÁRMACO	38
4.5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO	39
4.5.3 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO	39
4.5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DA MSZ SOLUBILIZADA E NANOSSUSPENSÕES NOS SISTEMAS POLIMÉRICOS	39
4.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DE MSZ E DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA MSZ POR ESPECTROSCOPIA	
UV-VIS	39
5.1.1 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE.....	40
5.1.2 LINEARIDADE.....	41
5.1.3 PRECISÃO	42
5.1.4 PRECISÃO INTERCORRIDA.....	43
5.1.5 EXATIDÃO.....	43
5.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	43
5.1.7 ROBUSTEZ	44
5.2 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA MSZ EM DIFERENTES MEIOS.....	44
5.2.1 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ	45
5.2.3 AVALIAÇÃO DA REDISPERSABILIDADE DAS NANOSSUSPENSÕES	45
5.2.4 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE PARTÍCULAS PRECIPITADAS	46
5.3 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIOS E TERNÁRIOS SEM O FÁRMACO	46
5.3.1 AVALIAÇÃO DAS PROPORÇÕES POLIMÉRICAS.....	48
5.4 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO SEM O FÁRMACO.....	48
5.4.1 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS SEM O FÁRMACO.....	48

5.4.2 ESTABILIDADE FÍSICA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO SEM O FÁRMACO	51
5.5 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO COM O FÁRMACO SOLUBILIZADO E EM NANOSSUSPENSÃO	54
5.5.1 PREPARO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO E TERNÁRIO COM O FÁRMACO	55
5.5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO CONTENDO FÁRMACO INCORPORADO EM NANOSSUSPENSÃO	55
5.5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO CONTENDO MSZ SOLUBILIZADA	57
5.5.4 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO EM NANOSSUSPENSÕES	58
5.5.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DA MSZ SOLUBILIZADA E NANOSSUSPENSÕES NOS SISTEMAS POLIMÉRICOS	60
5.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DA MSZ E DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS	61
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças autoimunes caracterizadas por inflamação crônica, ulcerações da mucosa e hemorragia do trato gastrointestinal (TGI). Dentre as doenças inflamatórias intestinais, a doença de Crohn (DC) pode acometer qualquer região do TGI, como cólon e íleoterminal (HUA, 2015), enquanto a retocolite ulcerativa (RU) consiste em uma inflamação que envolve a mucosa do cólon e do reto, podendo ser limitada ao reto, retossigmóide ou podendo atingir todo o cólon (SIMÕES, 2003). A causa não é totalmente elucidada, podendo ocorrer por diversos fatores, como genéticos, estresse ambiental, microbioma e disfunção imunológica (HUA, 2015). Os principais sintomas são: diarreia, enterorragia, tenesmo, eliminação de muco, dores abdominais (SIMÕES, 2003), anemia e perda de peso (BARANI, 2021).

Algumas estratégias terapêuticas são destinadas a manter a remissão da doença, como o uso de imunomoduladores, corticosteróides, anticorpos monoclonais, antibióticos de amplo espectro (BARANI, 2021) e os aminossalicilatos como a mesalazina (MSZ). A MSZ é fármaco de escolha na terapia da RU, e tem como alvo o processo inflamatório, interferindo em um conjunto de fatores e vias de sinalização, tais como COX, lipoxigenase e TNF- α (TRAVIS, 2011). Entretanto, a MSZ apresenta rápida e extensa absorção nas partes superiores do trato gastrointestinal quando administrada por via oral (VO), requerindo doses acima de 2g/dia, o que leva a efeitos colaterais, tais como dores abdominais, diarreia, náuseas e vômitos. Consequentemente, uma pequena concentração de MSZ chega no cólon reduzindo sua eficácia terapêutica.

Nos últimos anos, a pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos trouxe uma grande e instigante perspectiva para melhorar a eficiência terapêutica de fármacos. Quando o fármaco é incorporado em sistemas de liberação, as propriedades que governam sua liberação, interação com o meio biológico e estabilidade não são mais determinadas apenas pelas características físico-químicas do fármaco, podendo ser modificada pelo sistema. A incorporação de fármacos nos sistemas pode melhorar a estabilidade, reduzir o metabolismo pré-sistêmico, aumentar o tempo de permanência do fármaco no local de ação ou de absorção e possibilitar o direcionamento do fármaco para sítios específicos, permitindo a redução da dose, a obtenção de regimes posológicos mais adequados, menores efeitos adversos e maior adesão do paciente à terapia (GREMIÃO, 2012). Dentre eles, os complexos polieletrólíticos (PECs) baseados em polissacarídeos e as nanossuspensões são estratégias promissoras para o tratamento da retocolite ulcerativa.



Nos sistemas de liberação de fármacos, o tipo de polímero ou material utilizado, bem como sua massa molecular e grau de reticulação, influenciarão na sua capacidade de adesão ao muco, dentre esses sistemas de liberação as nanosuspensões (NS) são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, otimizando sua taxas de dissolução, e os complexos polieletrólíticos, podem carrear fármacos com pH dependente, compostos por polímeros naturais, atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis com diversos materiais. A estrutura química do polímero determina algumas propriedades importantes neste processo, como a presença de grupos hidroxila, carboxila ou amina podem contribuir para o estabelecimento de ligações de hidrogênio. Polímeros com grupos ionizáveis podem interagir por interação eletrostática com o muco carregado negativamente e essa interação é dependente do pH do meio (VARUM, 2008).

Neste trabalho, buscou-se desenvolver e caracterizar sistemas baseados em nanossuspensão de mesalazina e complexos polieletrólíticos para potencial aplicação na colite ulcerativa. Os complexos polieletrólíticos foram baseados em quitosana (QS), um polímero catiônico, e os poliânions alginato (ALG) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP). A QS e ALG são polímeros amplamente utilizados em sistemas de liberação de fármacos, uma vez que apresentam características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e apresentam uma importante capacidade mucoadesiva (BONI, 2017), o que contribui para melhor retenção do fármaco ao local de ação ou absorção (KONUS, 2017), bem como, o HPMC além de possuir tais propriedades, pode contribuir para modulação da permeação celular e gastroresistência (BONI, 2017).



2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Apesar de muito utilizada, a via oral apresenta características e propriedades que impõe muitas barreiras à veiculação de fármacos e, muitas vezes, limitam o seu uso como o metabolismo pré-sistêmico, a baixa solubilidade em água e a biodisponibilidade baixa e errática (ENSIGN, 2012). Por outro lado, as propriedades fisiológicas e biológicas ao longo do trato gastrintestinal podem ser explorados no delineamento racional de sistemas de liberação de fármacos. Por exemplo, aumentar o tempo de residência do fármaco explorando capacidade do sistema de ficar aderido ao muco, que recobre todo o tecido epitelial do trato gastrintestinal (TGI), pode aumentar a ação no local ou a absorção do fármaco (CARVALHO, 2010). O desenvolvimento de sistemas de liberação sítio-específico de fármacos, a partir da vetorização do fármaco para o cólon e reto, pode favorecer sua ação farmacológica no local de ação, reduzir a toxicidade sistêmica e consequente melhorar a qualidade de vida do paciente (PEDREIRO, 2016).

O avanço do conhecimento em tecnologia farmacêutica, particularmente na pesquisa de novos materiais e sistemas de liberação, tem permitido o desenvolvimento de sistemas inovadores com ampla gama de propriedades físico-químicas e estruturais, as quais podem racionalmente delineadas para se alcançar objetivos específicos.

A compartimentalização de fármacos em sistemas carreadores micro ou nanoestruturados é uma estratégia racional e promissora para a modulação das propriedades biofarmacêuticas dos fármacos, as quais passam a ser fortemente influenciadas pelas propriedades do sistema, de modo que atributos críticos como proteção contra degradação nas porções superiores do TGI, propriedades de intumescimento, liberação e mucoadesão possam ser modulados para atingir as necessidades terapêuticas específicas. Sistema de liberação colônica consiste em uma liberação local no tratamento de doenças inflamatórias, com pH específico do cólon, tendo em vista o tempo de trânsito intestinal e bactérias residentes do cólon capazes de degradar os materiais da matriz que permitirão a liberação do fármaco (AULTON, 2005). Neste capítulo serão abordados os principais fundamentos envolvidos no trabalho.

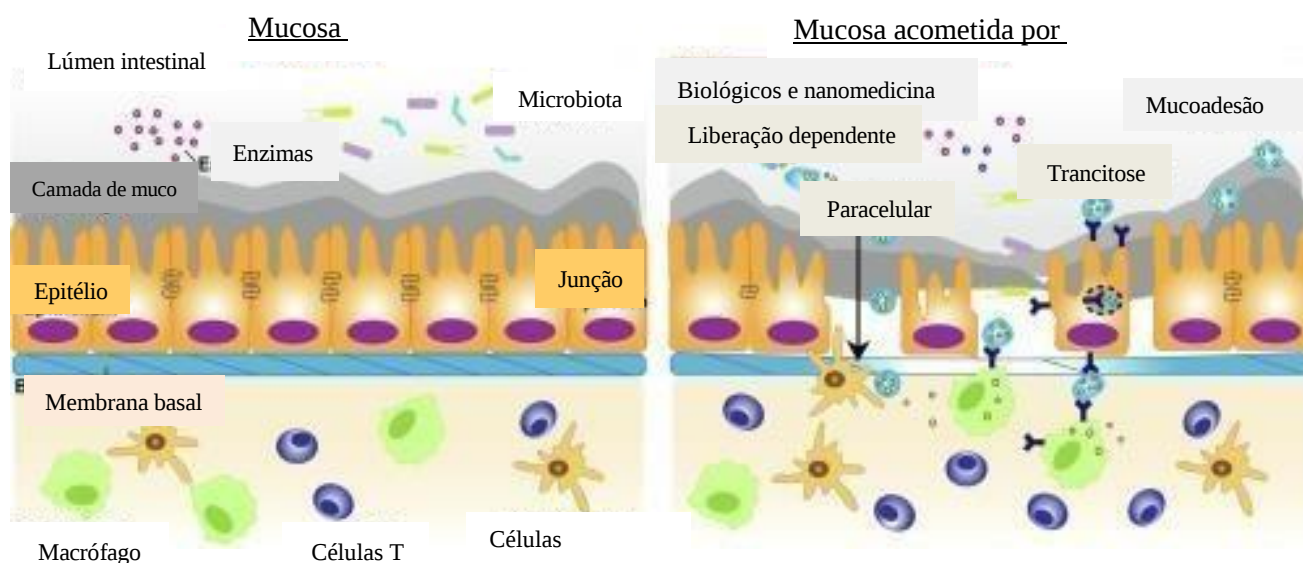


2.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças autoimunes caracterizadas por inflamação crônica, ulcerações da mucosa e hemorragia do trato gastrointestinal. Atualmente, não apresentam cura, no entanto, algumas terapias são adotadas para alcançar a remissão do quadro inflamatório, com uso de imunossupressores, corticosteróides, aminossalicilatos, porém, as formulações convencionais são limitadas, uma vez que a distribuição sistêmica acarreta em efeitos adversos e toxicidade após distribuição do fármaco pelo organismo (HUA, 2015).

Diversos fatores podem contribuir para o aumento da incidência e prevalência das DII, como fatores ambientais, estilo de vida e genética, sendo maior na Europa e América do Norte, no entanto, pode abranger todos os continentes e atingir principalmente a faixa etária entre 30 e 40 anos de idade (ROBUSTI, 2021). A inflamação altera a integridade e metabolismo da mucosa intestinal, ocorrendo perda da camada externa devido a translocação de bactérias, o que leva a ativação de vias de sinalização endógena aumentando a expressão de mucinas e outros fatores que promovem o recrutamento de células imunes para o tecido e outros receptores inflamatórios (HUA, 2015). A figura 1 ilustra o tecido do cólon saudável, com a mucosa protegida pela camada externa e amucosa inflamada exposta a diversos microrganismos.

Figura 1: Alterações da mucosa gástrica em DII causadas pelo processo inflamatório.



Fonte: Adaptado de Zhang, 2020



Além disso, as DII promovem alterações na fisiologia do TGI, podendo levar a redução nos valores de pH do cólon (2,3-5,5), alterações no meio enzimático, com redução de espécies bacteróides, bifidobactérias e *Escherichia coli*, bem como aceleração do tempo de trânsito colônico (SANTOS, 2021).

2.1.2.RETOCOLITE ULCERATIVA

A (RU) é uma das doenças inflamatórias intestinais, que pode ser causada por fatores ambientais, alteração da função e composição do muco, desregulação imunológica da mucosa por transdução de sinal que levam à inflamação do cólon (REMBACKEN, 1999), além do estresse, infecções bacterianas, dieta e tabagismo (LACERDA, 2018). O muco e seus produtos antimicrobianos secretados pelas células epiteliais, impedem o contato de microrganismos nocivos com a superfície celular. Assim, MARTINI e col. (2017), sugeriram que a inflamação causada na retocolite está associada a diminuição de MUC-2, principal mucina formadora de gel secretada no intestino (MARTINI, 2017).

O diagnóstico é realizado através da história clínica do paciente, exame de fezes, exame endoscópico e histopatologia (BRASIL, 2002). Na RU, 55% dos pacientes tem proctite, 30% apresentam colite do lado esquerdo e 15% apresentam colite extensa. A gravidade é classificada como leve, moderado, grave ou fulminante. Aproximadamente 71% dos pacientes apresentam RU moderadamente ativa. O objetivo do tratamento medicamentoso é induzir a manutenção da remissão da doença, alcançando a cicatrização da mucosa, dessa forma, é possível evitar intervenção cirúrgica e a probabilidade de desenvolvimento de câncer colorretal (IACUCCI; SILVA; GHOSH, 2010). A figura 2 mostra colonoscopia em mucosa inflamada com presença de pólipos, condição a qual apresenta risco de desenvolvimento de câncer de colorretal.

Figura 2: inflamação da mucosa intestinal marcada pela presença de pólipos



Fonte: Adaptado de Teixeira, 2008.



Algumas classes de fármacos podem ser utilizados no tratamento da RU, são eles: aminossalicilatos, glicocorticóides e imunomoduladores (KATZUNG, 2007). A Sulfassalazina foi o primeiro aminosalicilato a ser utilizado no tratamento nos sintomas e manutenção da remissão da RU (IACUCCI; SILVA; GHOSH, 2010). A Sulfassalazina é um pró-fármaco formado pela sulfapiridina e 5-AZA por uma ligação AZO, utilizado no tratamento da artrite, no entanto, mostrou-se eficaz no tratamento gastrointestinal. Porém, devido os efeitos colaterais, como distúrbios gastrintestinais (RANG; DALE, 2007), houve a necessidade de desenvolver fármacos de 2ª geração, a qual substitui-se a sulfapiridina por olsalazina e balsalazina, um composto inerte. A MSZ é um antiinflamatório não-esteroidal da classe dos salicilatos (MENEQUIN, 2021), é fármaco de escolha para o tratamento da RU leve e moderada, no entanto, o tratamento é realizado através de várias doses diárias, (PEDREIRO, 2016, MENEQUIN, 2021) por via oral (VO).

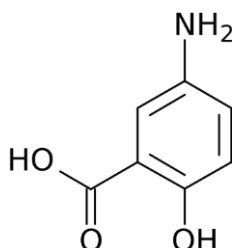
A MSZ promove a manutenção da remissão da RU, a qual diversos mecanismos de ação são propostos, podendo estar relacionado com a inibição de prostaglandinas e leucotrienos e/ou diminuição da quimiotaxia de neutrófilos e geração de superóxidos, dessa forma, reduz a inflamação (RANG; DALE, 2007). Outros mecanismos de ação são pressupostos como a inibição de lipoxigenase e cicloxigenase (COX), interleucinas I e II e TNF. Pode controlar o processo inflamatório no cólon através de transdução de sinal e ativadores de transcrição por ativar receptor nuclear, dessa forma, haverá proliferação celular, apoptose, produção de citocinas, bem como, ativação de macrófagos (IACUCCI; SILVA; GHOSH, 2010). Dentre os efeitos indesejáveis, tem-se diarreia, hipersensibilidade aos salicilatos e nefrite intersticial (RANG; DALE, 2007).

A MSZ é instável na presença de água e luz, ocorre oxidação, que pode, em menor grau ser catalisada por luz do fármaco. Possui grupos cromóforos que absorvem em comprimentos de onda >290nm e pode ser considerada susceptível à fotólise direta pela luz solar. Os valores estimados de pKa são de 2,09, 5,26, 13,64 e solubilidade dependente do pH do meio (PUBCHEM, 2020) e Pka devido seus grupos amino e carboxil (ROBUSTI, 2021), apresenta coloração branca, cinza e rosado, um ponto de fusão de 280°C (BRITISH PHARMACOPÉIA, 2005), possui baixa solubilidade em água e álcool, é solúvel em água quente e ácido (ROBUSTI, 2021).



A MSZ é acetilada a N-acetil-5-ASA quando absorvida, e é excretada pela urina e fezes, o mesmo não ocorre com a Sulfassalazina, uma vez que a ligação AZO é clivada pela ação de bactérias presentes no intestino grosso (DEO, 2009). É uma amina aromática, com grupo amino na posição 5 do anel (PUBCHEM, 2020). A figura 3 representa a estrutura química da MSZ.

Figura 3: Estrutura química da Mesalazina (MSZ)



Fonte: LACERDA, 2018.

A MSZ é classificada como fármacos de classe IV no sistema de classificação biofarmacêutica (baixa solubilidade e baixa permeabilidade), propriedades limitantes para sua eficácia terapêutica. Além disso, ela apresenta rápida absorção nas partes superiores do TGI por VO, levando a redução da sua concentração no local de ação, além de induzir a vários efeitos colaterais. Tais limitações tornam necessário a busca por novos sistemas de liberação de fármacos, principalmente empregando estratégias que vetorizem a MSZ para a região colônica.

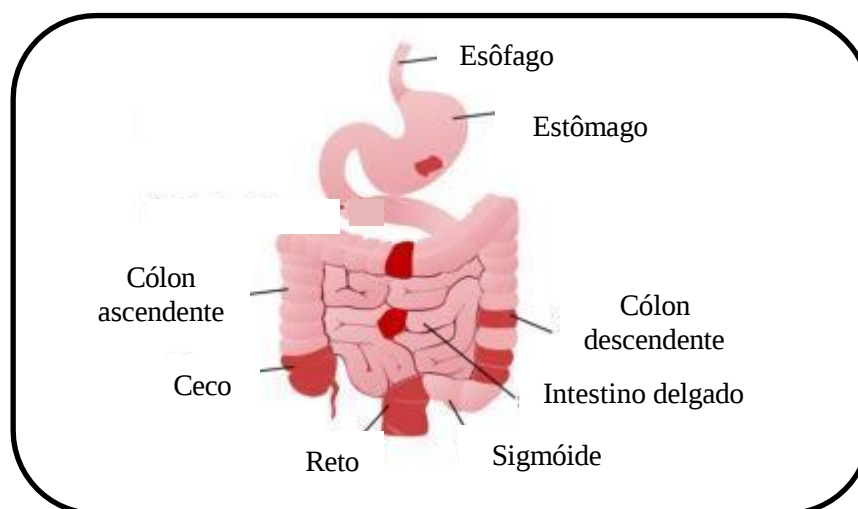
2.1.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS

O trato gastrointestinal é formado por tubo muscular de comprimento aproximado de 6m, compreendendo da boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, cólon e ânus. O lúmen gastrointestinal é rugoso e forma uma parede de 4 camadas: serosa (camada mais externa), muscular externa (constituída de 2 camadas de tecido muscular liso), submucosa e mucosa.

A maior parte do epitélio é revestido por muco, secretado por todo trato gastrointestinal, pois atua como uma barreira mecânica. O cólon é a parte terminal do trato gastrointestinal, formado por ceco, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, sigmóide e reto. Sua principal função é o equilíbrio de sais e armazenamento das fezes (AULTON, 2005). A figura 4 representa a anatomia do sistema gastrointestinal.



Figura 4: Representação anatômica do sistema gastrointestinal.



Fonte: Adaptado de YANG, 2022.

A liberação colônica de fármacos depende de alguns fatores do meio biológico para garantir que o fármaco será liberado nessa região. Dessa forma, deve-se levar em consideração o tempo de trânsito intestinal, que varia de indivíduo para indivíduo, podendo ocorrer entre 2 e 6 horas, os diferentes valores de pH ao longo do TGI, uma vez que o pH ácido do estômago aumenta para pH 6 no intestino delgado e pH 7.4 no íleo terminal, além de fatores como ingestão de água e alimentos. Várias estratégias têm sido investigadas para promover a liberação colônica do fármaco, são elas: diferença de pH ao longo do TGI, trânsito intestinal, microflora intestinal e capacidade mucoadesiva ou mucopenetrante dos sistemas (HUA, 2015). Alguns sistemas poliméricos promovem uma liberação do fármaco através de degradação enzimática, como as ligações AZO, amplamente utilizadas por promoverem a clivagem de ligações sensíveis para liberar o agente ativo (TALAEI, 2013).

Os sistemas mucoadesivos tem sido uma estratégia interessante utilizada para o direcionamento do fármaco para a região colônica, esses sistemas possuem capacidade de aderir à camada de muco por meio de interações supramoleculares, promovendo aumento do tempo de retenção no sítio de ação/absorção, o que levará ao aumento da disponibilidade de fármacos.

O muco é formado por uma camada basal aderida a uma camada luminal, com espessura de 110 a 160µm no cólon, é secretado pelas células caliciformes, protegendo o epitélio intestinal contra possíveis moléculas estranhas (SANTOS, 2021). A camada de muco apresenta carga negativa, portanto, partículas com carga negativa ou sem carga podem se mover através do muco, as partículas com carga positiva são imobilizadas devido as interações iônicas, dessa forma, a mucoadesão pode ser alcançada pela interação eletrostática que proporciona uma retenção do fármaco no local de ação (NETSOMBOON; SCHNURCH, 2016).



No intestino delgado e membrana apical de células caliciformes presentes no cólon são expressas alguns tipos de mucinas, como a: MUC1, MUC3 e MUC4 que podem ser secretadas em resposta a diversos fatores como bactérias, toxinas que causem danos às células epiteliais, provocando um processo inflamatório em pacientes com retocolite ulcerativa. MUC2 é a principal mucina secretada no intestino grosso (DOROFYEV, 2013). As mucinas são glicoproteínas, seu comportamento viscoelástico depende de alguns fatores como pH, força iônica e grau de hidratação, que são relevantes para o transporte de partículas através do muco (BANSIL; TURNER, 2018).

Os mecanismos de interação com mucinas ressaltam a importância de controlar as propriedades físico-químicas dos carreadores de fármacos baseados em partículas como o tamanho hidrodinâmico, como também propriedades de superfície das nanopartículas que penetram no muco (HUCKABY, 2018), interações do sistema imunológico e direcionamento celular (ENSIGN, 2012). Existem duas fases que constituem a mucoadesão: a fase de contato (umidescimento) e fase de consolidação. A fase de contato é quando as partículas bioadesivas e a camada mucosa altamente hidratada entram em contato físico, que envolve intumescimento e adsorção das partículas do polímero. A fase de consolidação envolve a interpenetração e difusão das partículas da mucosa seguida de interações físicas e/ou químicas (Van der Waals, interação eletrostática, ligações de hidrogênio ou covalentes) (GÓMEZ- GUILLEN, 2021).

A estratégia de utilizar polímeros mucoadesivos permite otimizar a permeabilidade de fármacos, pois contribuem para um contato mais próximo dos sistemas com o epitélio intestinal (CARDOSO, 2021). A seleção de biopolímeros para sistemas nanoestruturados depende de alguns fatores como o tipo de íon, massa molar, carga superficial, solubilidade, resposta ao pH e capacidade de gelificação. Grupos hidroxila, carboxila ou amino em moléculas hidrofílicas são cruciais para promover intumescimento, devido sua capacidade de ligação ao hidrogênio (GÓMEZ-GUILLEN, 2021).

Para garantir uma liberação específica no cólon, diversas estratégias tem sido propostas, dentre as quais destacamos a formação de nanopartículas carreadoras compostas por materiais poliméricos, de forma que o fármaco possa atingir o seu sítio de ação (DEO, 2009).



2.2 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

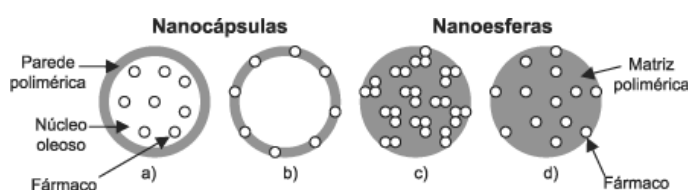
A nanotecnologia tem apresentado avanços recentes em formas de dosagem oral para superar as limitações das formulações convencionais. É uma área de desenvolvimento de

sistemas em nanoescala, empregados para entrega de agentes terapêuticos locais direcionados e liberação de maneira controlada, com diversos benefícios para tratamento de doenças. Todo material pode interagir especificamente com células e tecidos vivos, devido ao pequeno tamanho de partículas, minimizando toxicidade e aprimorando eficiência na terapia medicamentosa (SAEEDI, 2020). Diversos sistemas de fármacos estão sendo desenvolvidos para tornar a terapia mais eficaz, como lipossomas, nano e microemulsões, hidrogéis, cristais líquidos e nanopartículas (SAEEDI, 2020).

Micropartículas são partículas que medem entre 1 e 1000nm, já as nanopartículas apresentam diâmetro de partículas que variam entre 1 e 100nm (ARAÚJO, 2021), e é importante selecionar criteriosamente os materiais que irão fazer parte do sistema, uma vez que estes irão modular suas propriedades e características (PEDREIRO, 2016).

As nanopartículas poliméricas servem como uma importante estratégia para otimizar a estabilidade e liberação de fármacos, minimizando efeitos colaterais (DI FILIPPO, 2021), podem apresentar duas classificações: a) nanocápsulas, sistema aqual o fármaco será internalizado em vesículas, b) nanoesferas: sistemaem que o fármaco fica disperso em matriz polimérica (PRATA, 2011; REIS, 2006).

Figura 5: Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Adaptado de SCHAFFAZICK, 2003.

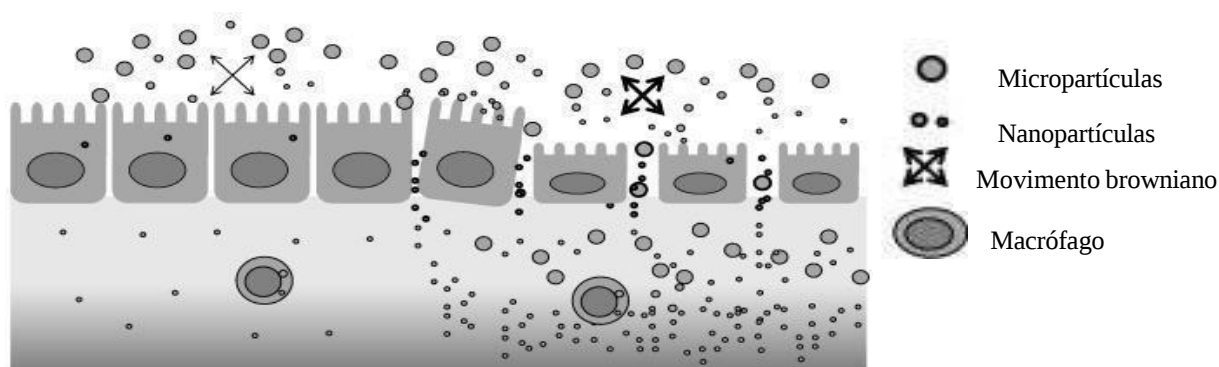
Diante das características físico-químicas das nanopartículas, é importante salientar que o tamanho influencia na interação com o meio biológico, a qual partículas de 415nm de diâmetro demoram cerca de 30 minutos para se difundir com o muco, e partículas de 1000nm não são capazes de permear o muco (HUSSAIN, 2001). O diâmetro de partículas para escala nanométrica otimiza o tempo de permanência no cólon exercendo efeito de permeabilidade e retenção epitelial pelas células do sistema imune por endocitose, que estão aumentadas na inflamação, além disso,



contribuem para evitar a rápida eliminação do sistema por diarreia, situação comum nas DII (HUA, 2015).

Em condições inflamatórias, como nas DII, o epitélio intestinal perde sua função de barreira devido rompimento de sua integridade anatômica, essa condição permite a adesão das nanopartículas (NPs) à mucosa. As NPs podem entrar diretamente nas células fagocíticas do tecido inflamado. Nanopartículas (250nm) e micropartículas (3,0um) foram colocados no lúmen intestinal de pacientes com DII com inflamação leve e moderada, e pôde-se observar que o transporte através da mucosa colônica inflamada foi dependente do tamanho de partículas, as micropartículas ficaram retidas nas camadas mais superficiais da mucosa, já as NPs penetraram maior profundidade (VISCIDO, 2014). A figura 6 representa os mecanismos que favorecem a absorção de NPs.

Figura 6: Esquema da absorção de partículas através da mucosa intestinal inflamada



Fonte: Adaptado de VISCIDO, 2014

A incorporação de fármacos em nanopartículas são capazes de protegê-los da degradação e liberação, prolongar o tempo no local de ação ou absorção, dessa forma, é possível reduzir dose e prolongar intervalos de administração (WU, 2020).

A entrega de fármacos no local de ação ou absorção tem sido um desafio no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, as nanopartículas permitem alcançar essas condições, pois seu tamanho reduzido pode aumentar o tempo de residência luminal, adesão e permeação nos tecidos e células (VISCIDO, 2014). No entanto, alguns inconvenientes não podem ser descartados, como a possível toxicidade de alguns materiais e a ausência de biocompatibilidade, quando comparados com as formulações convencionais (PIMENTEL, 2007).

2.2.1 SISTEMAS PARTICULADOS BASEADOS EM COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS

Os complexos polieletrólíticos (PECs) são seguros para fabricação de sistemas para entrega de fármacos, uma vez que permitem sua formação pela mistura de polieletrólitos de cargas opostas



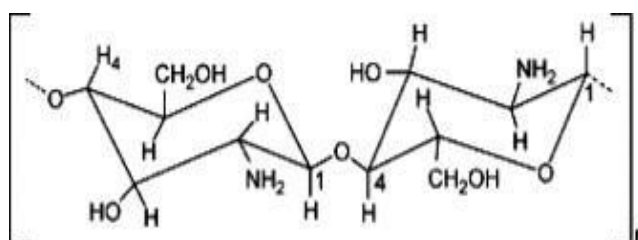
em água, sem solventes orgânicos ou reticulantes químicos. A presença de grupamentos hidrofílicos, como hidroxilas, carboxilas e grupos amino, permitem a formação de ligações covalentes com os tecidos biológicos, promovendo bioadesão (WU, 2020).

2.3 POLÍMEROS

2.3.3 QUITOSANA

A QS é um polímero obtido a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo estrutural presente em fungos, insetos e crustáceos. Possui diversas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e imunogenicidade (ARAÚJO, 2021), apresenta grupos funcionais em sua molécula como hidroxilas, aminas, capazes de interagir com os tecidos biológicos (LIU 2008). A figura 7 apresenta sua estrutura molecular, a qual observa-se duas unidades sacarídicas, N-acetil-D-glucosamina e o β 1-4 D-glucosamina como na quitina. Porém, na reação de desacetilação da quitina parte dos monômeros N-acetil-D-glucosamina são convertidos em D-glucosamina, originando a QS. Podem apresentar diferentes graus de desacetilação e massas molares (SALAZAR, 2015), quanto maior o grau de desacetilação maior a capacidade mucoadesiva (WANG, 2011), devido estar mais protonada para estabelecer interações eletrostáticas com os resíduos de ácido siálico presente na superfície da mucina eletronegativamente carregada (SALAZAR, 2015), é o que faz desse polissacarídeo apresentar tal propriedade.

Figura 7: Estrutura química da quitosana



Fonte: ABRAHAN, 2006.

Possui um pKa de 6,3, capacidade antiviral, antimicrobiana, anticâncer e antiinflamatória, é instável em água, por isso se faz necessário a reticulação por interações eletrostáticas com ânions multivalentes (LACERDA, 2018, NETSOMBOON, 2016), como alginato e carboximetilcelulose formando complexos polieletrólitos (ARAÚJO, 2021). A principal desvantagem é a alta solubilidade em meio ácido, podendo ocasionar uma liberação prematura do fármaco (PEDREIRO, 2016), devido se dissociar por protonação dos grupos amino livre antes de atingir o intestino delgado (MAKHLOF, 2011), entretanto, a reticulação com poliânions ajuda a reforçar propriedades químicas e mecânicas da QS (ABRAHAN, 2006), e a associação desta com

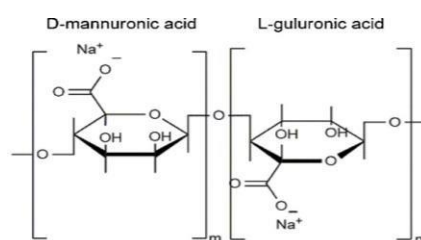


polímeros gastrorresistentes pode diminuir a liberação prematura do fármaco (PEDREIRO, 2016), tornando-a mais estável.

2.3.4 ALGINATO

O alginato é um polissacarídeo linear hidrossolúvel, de alta massa molar com seções rígidas e regiões flexíveis, formado por monômeros de ácido b-D-Maurônico (M) e ácido a-L- Gulurônico (G), ligados de forma linear por ligações glicosídicas (1,4), contendo três tipos de estruturas de blocos: blocos de ácido b-D Manurônico (M), blocos de ácido a-L-Gulurônico (G) e uma mistura desses blocos (MENEZES; 2013), como demonstrado na figura 8. Possui um valor de pKa de 3,5 (NETSOMBOON, 2016), o tamanho molecular e cinética de formação de gel impactam em suas propriedades funcionais, como a porosidade, capacidade de intumescimento, estabilidade e biodegradabilidade (ABRAHAN, 2006).

Figura 8: Estrutura química do alginato de sódio



Fonte: FERREIRA, L.M.B; 2020)

A composição e sequência química podem variar muito entre as espécies de algas, diferentes partes das algas e a época do ano em que são colhidas (DRAGET; TAYLOR, 2009). São extraídos de 3 espécies de algas marrons, *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (ABRAHAN, 2006) e também podem ser produzidos por bactérias *Azobacter vinelandii* e algumas *Pseudomonas* (MAURSTAD, 2008).

O alginato é um poliânion com grupos carboxila terminais, possui diversas aplicações como espessante, estabilizante de emulsões e espuma, agente de encapsulação, formação de filmes e é um bom agente mucoadesivo, além da capacidade de reter drogas em sistemas de liberação com outros polímeros (ABRAHAN, 2006), permitindo a formação de matrizes para compor nanopartículas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013). O processo de degelificação confere a propriedade de seletividade, uma vez que a reticulação com cátions multivalentes provoca a internalização do fármaco na matriz de gel (SARMENTO, 2007).

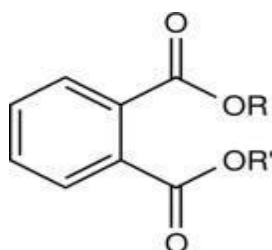


2.3.5 FTALATO DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSE

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) é um polímero muito utilizado na indústria farmacêutica, para obtenção de filmes de revestimento entérico de formas farmacêuticas sólidas devido a sua solubilidade pH dependente, prevenindo a dissolução do fármaco no estômago (FERREIRA, 2008). O pKa dos grupos de ácido carboxílico livre é de aproximadamente 5,2. Este ácido carboxílico livre torna-se carregado negativamente em valores de pH mais altos e representa interação eletrostática com a QS (MAKHLOF, 2011).

Este polieletrólito é um derivado da celulose, biodegradável, constituído por grupamentos hidroxila, como pode ser observado na figura 9 e que podem ser substituídos por éster ftálico. É obtido pela esterificação da hidroxipropilmetilcelulose (HP) com anidrido ftálico (PEDREIRO, 2016), é solúvel em metanol e isopropanol, pouco solúvel em acetona e insolúvel em éter e apresenta um potencial de mucoadesão em pH 6 e 4 (NETSOMBOON; SCHNURCH, 2016), na qual ocorre uma interação com o muco devido a presença de hidroxilas em sua estrutura que formam pontes de hidrogênio com a mucosa por ligações não covalentes (PEDREIRO, 2016).

Figura 9: Estrutura química do HP



Fonte: JONES, 2019.

A aplicabilidade deste polímero aos sistemas de liberação modificada, e sua capacidade de intumescimento, contribui para a cinética de liberação do fármaco incorporado. Além disso, apresenta outras características como a não toxicidade, biocompatibilidade, capacidade de incorporar outras substâncias (LOPES, 2005). Outra importante aplicação deste polímero foi observada por BONI 2017, demonstrando segurança em ensaios *in vitro* de viabilidade e permeação celular intestinal para potencial aplicação na liberação e/ou absorção de fármacos no cólon em patologias locais.

2.4 NANOSUSPENSÕES

As nanossuspensões são dispersões coloidais submicrométricas de partículas puras de fármacos, que podem ser estabilizadas por surfactantes, polímeros ou uma combinação de ambos (SANTOS, 2017). Normalmente, as nanossuspensões podem ser preparadas utilizando dois tipos



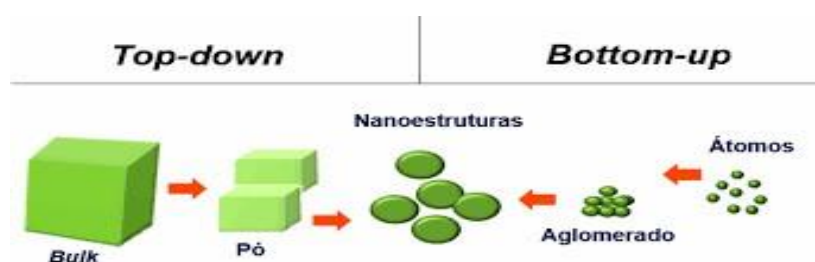
clássicos de nanonização: a precipitação química (de baixo para cima ou bottom-up) e o processo de desintegração (de cima para baixo ou top-down) em um meio líquido de dispersão.

O método de Top-down pode envolver diversos processos, como a moagem úmida, homogeneização de alta pressão e microfluidização, estas técnicas são eficientes devido não haver o uso de solventes orgânicos, no entanto, envolvem alto aporte energético, que por gerar calor, não é viável a fármacos termolábeis, a qual pode produzir partículas amorfas e deformação dos cristais. Na técnica de botton-up as partículas de fármaco são molecularmente dispersas em um solvente e precipitadas com a adição de um anti-solvente, como exemplo é o processo de precipitação química, conhecido pela reação ácido-base (ROBUSTI, L.M.G; 2021).

As nanosuspensões promovem o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, levando ao aumento das taxas de dissolução e, conseqüentemente melhora a biodisponibilidade oral (SANTOS, 2017), sendo uma ferramenta tecnológica promissora para fármacos com problemas de estabilidade e solubilidade como a MSZ possibilitam uma maior taxa de dissolução e otimizam a biodisponibilidade de fármacos insolúveis, desta forma, viabilizam a sua transposição através das barreiras biológicas e sua retenção nos tecidos específicos, devido a redução do tamanho de partículas do fármaco (SANTOS, 2017).

A figura 10 representa a obtenção de partículas através do método de Botton-up e Top-down.

Figura 10: Esquema dos métodos de produção de nanopartículas, por top down (redução de tamanho até nanoescala) e botton-up (montagem a partir de átomos e moléculas).



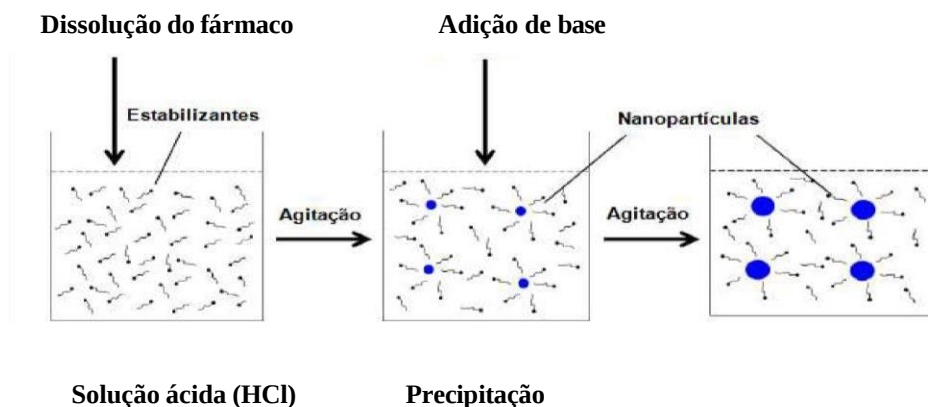
Dessa forma, buscou-se obter a MSZ na forma de nanosuspensão e solubilizada, incorporando-as em nanopartículas poliméricas à base de quitosana, alginato e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, com o objetivo de otimizar a eficiência de associação do fármaco ao sistema polimérico proposto.

A técnica por Bottom-up consiste na precipitação de partículas, a qual são formadas a partir de seu estado molecular, em solução supersaturada de um fármaco. A precipitação pode ser obtida por método de evaporação do solvente, fluido supercrítico, precipitação antissolvente e a precipitação química. Para fármacos que apresentam solubilidade pH dependente, a precipitação pode ser através de reações de neutralização ácido-base (CHEN, 2008). A figura 11 ilustra o processo de



obtenção de nanossuspensões, utilizando solução ácida para dissolução do fármaco e uma base para precipitação das partículas.

Figura 11: Representação do preparo de nanossuspensões utilizando a técnica de Botton-up por precipitação das partículas pelo método de reações ácido-base.



Fonte: Adaptado de CHEN, 2008.



3 OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar complexos polieletrólíticos baseados em quitosana e alginato com e sem adição de ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, contendo mesalazina molecularmente dispersa e em nanosuspensões para tratamento da retocolite ulcerativa.

3.1 ETAPAS PARA ALCANÇAR O OBJETIVO PROPOSTO

- a) Obtenção de nanossuspensões e nanopartículas de MSZ com dispersões poliméricas por complexação polieletrólítica;
- b) Caracterizar o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das partículas nos sistemas;
- c) Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação da mesalazina nos sistemas;
- d) Determinação da percentagem de fármaco incorporado aos sistemas;



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.2 MATÉRIAS PRIMAS

- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich)
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Shin-Etsu Chemical)
- Alginato de sódio (Sigma Aldrich)
- Ácido acético glacial (Qhemis)
- Hidróxido de sódio (Vetec)
- Água ultrapurificada (Milipore)
- Mesalazina (Kei)

4.1.3 EQUIPAMENTOS

- agitador magnético: (Fisaton)
- agitador mecânico: (Ika Eurostan 20 digital)
- balança analítica: (Ohaus)
- analisador de partículas: DLS - Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments)
- pHmetro: (Digimed)
- Espectrofotômetro: (Agilent Technologies Cary 60 UV-VIS)
- centrífuga



4.2 MÉTODOS

4.2.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA MSZ POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

Com o objetivo de determinar a eficiência de associação do fármaco aos sistemas polieletrólitos, foi desenvolvido um método de validação para quantificar a MSZ. Os ensaios foram realizados utilizando espectrofotômetro UV-VIS, com faixa de espectro de 200-800nm e seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão intracorrida e intercorrida, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez do método, como preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

4.2.1.2 SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

Para atingir a especificidade/seletividade de um método analítico, é necessário conseguir obter um analito de interesse entre outros componentes da formulação, que podem ser produtos de degradação, componentes da matriz, etc. A seletividade foi avaliada através da comparação dos espectros de absorção, verificando possíveis interferentes na quantificação da MSZ. Visto que a MSZ apresenta um pico de absorção de 298-300nm e o HP em 280nm, dessa forma, foram analisados os espectros de absorção da MSZ e HP.

4.2.1.3 LINEARIDADE

Para determinar a linearidade do método foi construída uma curva analítica da MSZ, partindo de uma solução estoque na concentração de 100µg/ml em água MilliQ. Foram preparadas 8 diluições nas concentrações entre 2µg/ml e 30 µg/ml (2,5,10,15,20,24,27 e 30µg/ml). Foi avaliada a equação da reta de acordo com estudo de regressão linear, método dos mínimos quadrados. A curva obtida apresentou uma relação entre as concentrações de MSZ e a absorbância obtida no espectrofotômetro UV- VIS.

4.2.1.4 PRECISÃO

A precisão do método intradia foi realizada utilizando as concentrações 5,15 e 30µg/ml, como preconizado pela legislação vigente, sendo estas baixa, média e alta concentração, em triplicata, realizada no mesmo dia e nas mesmas condições de preparo.

A precisão interdia foi realizada em dois dias diferentes, sob as mesmas condições de preparo das amostras. Os resultados foram obtidos pelos cálculos do DPR%. Para garantir que o método é preciso, o coeficiente de variação deverá ser < que 5% (BRASIL, 2003).



4.2.1.5 EXATIDÃO

A exatidão foi realizada nas concentrações 5,15 e 30µg/ml, de acordo com baixa, média e alta concentração, em quintuplicata. O valor da concentração média obtido foi comparado com o valor teórico (100%) e calculado pela equação: $\text{Exatidão} = C/CT \times 100$

A qual: C= média da concentração experimental, CT= concentração teórica.

4.2.1.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O LD e LQ foram realizados nas concentrações 0,5, 1,1,5, 2 e 2,5µg/ml, em triplicata e calculados de acordo com as seguintes fórmulas: ($LD = 3,3.DP/IC$) ($LQ = 10.DP/IC$)

A qual: LD é o limite de detecção, s= desvio padrão do eixo y, b= inclinação da curva e LQ= limite de quantificação.

4.2.1.7 ROBUSTEZ

O experimento foi conduzido verificando se houveram variações relacionadas ao tamanho, PDI e potencial zeta, a partir do preparo de uma solução de mesalazina na concentração 20µg/ml. As concentrações foram comparadas após um período de 12 e 24 horas.

4.3. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA MSZ EM DIFERENTE VALORES DE pH

O espectro de absorção das soluções de MSZ foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS, com objetivo de determinar o comprimento de onda da MSZ nos valores de pH 4 e 6, na qual a mesalazina está em sua forma zwitteriônica e catiônica. A MSZ possui uma molécula anfótera, com solubilidade e ionização dependentes do pH, e pKa dependente de seus grupos amino e carboxílico. Dessa forma, sua forma catiônica está em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico, e a forma aniônica está acima do ponto isoelétrico (SATO, 2015).

As soluções foram preparadas na concentração de 2mg/ml, sendo obtidos os espectros em função do comprimento de onda de máxima absorção, utilizando uma velocidade de nível médio.

4.3.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA MSZ EM DIFERENTES MEIOS DE pH

Para avaliar a solubilidade da MSZ em diferentes valores de pH, foi adicionada uma certa quantidade de fármaco em água de forma a saturar o meio, sendo ajustados os valores de pH para 4 e 6. Os tubos permaneceram sob homogeneizador por 24 horas, em seguida, foram centrifugados

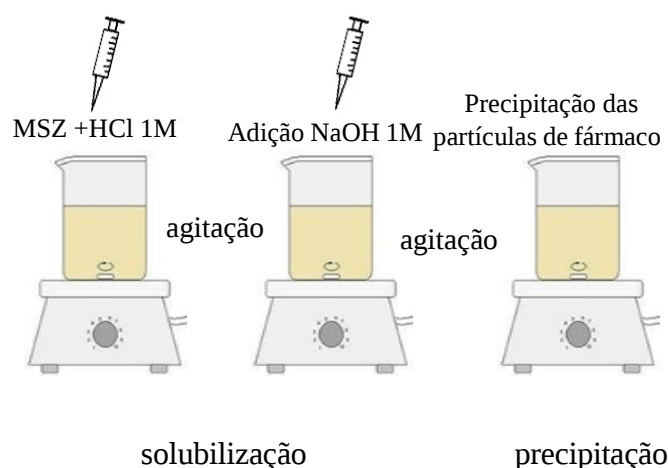


(Amicon) por 15 minutos, o sobrenadante foi diluído e quantificado de acordo com a curva analítica do método validado no item 4.2.1. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.2 PREPARO DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ

Para obter as nanossuspensões de MSZ, foi preparada uma solução-mãe em concentração de 10mg/ml utilizando HCl 1M para solubilização do fármaco. A MSZ possui boa solubilidade em solução ácida, dessa forma, sua precipitação pode ser alcançada pela adição de uma base, sendo utilizado o NaOH 1M para este processo. Após o preparo da solução-mãe, foram determinadas diluições nas concentrações 10, 5, 3,3 e 1,66mg/ml, e para ajustar os valores de pH 4 e 6 foi sendo gotejada uma solução de NaOH 1M sob agitação magnética por 15 minutos, obtendo-se uma mudança de fases, pela formação do precipitado, como mostra a figura 12. Essa técnica é conhecida por precipitação ácido-base (Bottom-up), a qual as partículas se formam a partir do seu estado molecular. Após 24 horas de repouso, as amostras foram avaliadas visualmente através de agitação manual, observando-se sua redispersão.

Figura 12: preparo das nanossuspensões de MSZ pelo método de Bottom-up (precipitação ácido-base).



Fonte: próprio autor

4.3.3 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE PARTÍCULAS PRECIPITADAS

Para avaliar o percentual de partículas precipitadas, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado (Amicon).

A quantificação da MSZ foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS utilizando curva analítica validada no item 4.2.1. Os resultados obtidos foram calculados a partir da fórmula:

$$EA\% = \frac{\text{massa total de MSZ} - \text{massa livre MSZ no sobrenadante}}{\text{Massa total de MSZ}}$$



4.3.4 ANÁLISE DE TAMANHO, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ

A caracterização das nanossuspensões foi realizada em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern), sob ângulo de detecção 173° em temperatura de 25°C e uma diluição de 7:3 (nanossuspensão:água).

4.3.5 ESTABILIDADE FÍSICA DAS NANOSSUSPENSÕES

As nanossuspensões foram mantidas sob abrigo da luz em geladeira, os parâmetros avaliados foram o diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, após 30 dias do preparo.

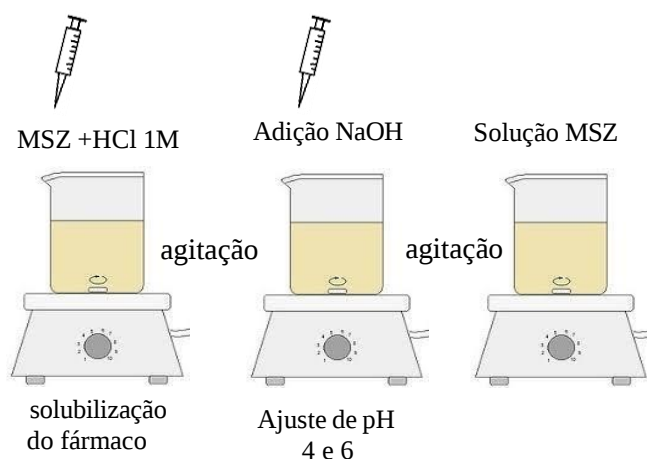
4.3.6 AVALIAÇÃO DA REDISPERSABILIDADE DAS NANOSSUSPENSÕES

Após 24 horas de preparo, as nanossuspensões foram homogeneizadas e analisadas quanto a sua redispersabilidade.

4.3.6 PREPARO DA MSZ SOLUBILIZADA

A solução de MSZ foi preparada a partir da concentração obtida no ensaio de solubilidade do fármaco. As amostras permaneceram sob agitação magnética por 15 minutos e os valores de pH foram ajustados para 4 e 6, como mostrado na figura 13.

Figura 13: Preparo da MSZ solubilizada a 0,8mg/ml, utilizando HCl para dissolução do fármaco e NaOH para ajustar o pH para 4 e 6, obtendo-se as soluções de MSZ.



Fonte: próprio autor



4.4 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIOS (QS/ALG) E TERNÁRIOS (QS/ALG/HP) SEM O FÁRMACO

4.4.1 PREPARO DAS DISPERSÕES POLIMÉRICAS

A QS, ALG e HP foram dispersos em concentração de 5mg/ml. Sendo, a QS dispersa em ácido acético a 0,1 mol/L, o ALG em água purificada (Miliq), e o HPMC em solução de NaOH a 1mol/L.

4.4.2 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIOS (QS/ALG) E TERNÁRIOS (QS/ALG/HP) SEM O FÁRMACO

As nanopartículas poliméricas foram preparadas através da técnica de complexação polieletrólítica, obtidas pela mistura do polímero catiônico QS e dos polímeros aniônicos ALG e HP (BONI, 2017). Foram preparadas diluições seriadas dos polímeros quitosana e alginato (sistema binário) nas proporções: 1:9, 2:8, 5:5, 6:4, 8:2, 9:1, em uma concentração polimérica total de 0,25mg/ml e em volume final de 10ml. Para o sistema ternário (quitosana/alginato/HP) as proporções aplicadas foram: 2:4:4, 5:2,5:2,5, 6:2:2, 8:1:1, utilizando a mesma concentração polimérica total e volume final das formulações. As dispersões poliméricas permaneceram sob agitação magnética por 15 minutos, seguindo a ordem de adição dos polímeros QS/ALG/HP.

4.4.3 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS SEM O FÁRMACO

A distribuição de tamanho e PDI (índice de polidispersão) das partículas foram obtidos a uma temperatura de 25°C, por meio das medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando equipamento Zetasizer Nano-ZS da Malvern sob detecção de 173°. O equipamento mede o movimento aleatório, devido ao choque entre as partículas dispersas em um fluido e relaciona com o tamanho, quanto mais lento é esse movimento, maior é o tamanho das partículas. Além disso, a técnica relaciona a temperatura e viscosidade do meio, o que permite o movimento das partículas. O tamanho das partículas pode ser calculado pelo coeficiente de difusão translacional, este não está relacionado somente ao tamanho, mas também a concentração e os íons presentes no meio. O resultado será convertido em diâmetro hidrodinâmico que pode ser obtido pela equação de Stokes Einstein:

$$d = k.T / 3\pi\eta D$$

A qual: d= diâmetro hidrodinâmico, K= constante de Boltzman, T= temperatura, N= viscosidade, D= coeficiente de difusão translacional (CARDOSO, 2019).

Foram realizadas as medidas dos sistemas poliméricos vazios (QS/ALG e QS/ALG/HP) e após



incorporação do fármaco. As medidas de potencial zeta nas nanopartículas foram realizadas à 25°C, submetendo as amostras a um campo elétrico no equipamento Zetasizer Nano-ZS (DLS) em 173°, e os resultados obtidos pela equação de Smoluchowski: $\zeta = \mu \eta / \varepsilon$

A qual: ζ = potencial zeta, μ = mobilidade eletroforética, η = viscosidade do meio, ε = constante dielétrica.

4.4.4 ESTABILIDADE FÍSICA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIOS (OS/ALG) E TERNÁRIOS (OS/ALG/HPMCP) SEM O FÁRMACO

A estabilidade física dos sistemas polieletrólíticos foi realizada com medidas após 30 e 45 dias após o preparo das formulações, avaliando possíveis alterações no tamanho, PDI e densidade de cargas nos sistemas.

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (OS/ALG) E TERNÁRIO (OS/ALG/HP) COM O FÁRMACO SOLUBILIZADO E EM NANOSSUSPENSÃO

4.5.1 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIO (OS/ALG) E TERNÁRIO (OS/ALG/HP) COM O FÁRMACO

Para incorporação da MSZ aos complexos polieletrólíticos, foram preparadas soluções de MSZ (0,8mg/ml) e nanossuspensões (1,66mg/ml) com o fármaco através dos métodos de obtenção contidos nos itens 4.4 e 4.5. Para incorporar a MSZ aos sistemas poliméricos, a solução/suspensão do fármaco foi misturada a solução de alginato e gotejados sobre a solução de quitosana sob agitação magnética por 15 minutos. Para as formulações ternárias, o HP foi gotejado sobre as amostras previamente obtidas, seguido de ajuste de pH 4 e 6. As formulações foram mantidas em geladeira e ao abrigo da luz.

4.5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO

A caracterização dos sistemas polieletrólíticos contendo o fármaco foi realizada em equipamento Zetasizer nano ZS, em temperatura de 25°C, sob ângulo de detecção de 173°. Para realizar as leituras das nanossuspensões de MSZ incorporadas ao fármaco, foram diluídas na proporção 7:3 (formulação:água).



4.5.3 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO

A estabilidade dos sistemas poliméricos contendo a MSZ, foi realizada em equipamento Zetasizer Nano ZS, verificando possíveis alterações no tamanho, PDI e potencial zeta.

4.5.4 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DA MSZ SOLUBILIZADA EAS NANOSSUSPENSÕES NOS SISTEMAS POLIMÉRICOS

Para avaliar a eficiência de associação do fármaco ao sistema, as formulações foram centrifugadas, filtradas (filtro Amicon) e diluídas em concentração de 15µg/ml. Nas leituras do sobrenadante, a concentração foi calculada a partir da seguinte equação:

$$EA\% = \frac{\text{massa total de MSZ} - \text{massa livre MSZ no sobrenadante}}{\text{Massa total de MSZ}}$$

4.8 ANÁLISE DE MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DE MSZ E DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS

A morfologia dos sistemas poliméricos contendo ou não o fármaco foi realizado microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F. Foram preparadas as amostras contendo somente o fármaco em nanossuspensão a 1,66mg/ml em pH, 4 e 6, os sistemas poliméricos binário e ternário em pH 4 e 6, sistemas binário e ternário com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH 4 e 6. As amostras foram diluídas na proporção 1:20 (v/v) em dispersão de Tween 20 (0,5% v/v), evitando aglomeração das partículas durante a secagem. Os materiais foram dispostos em suporte metálico para o processo de secagem e mantidos em dessecador por 24 horas, em seguida, foi revestido por material condutor (carbono). O software ImageJ foi utilizado para medir o diâmetro das partículas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA MSZ POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

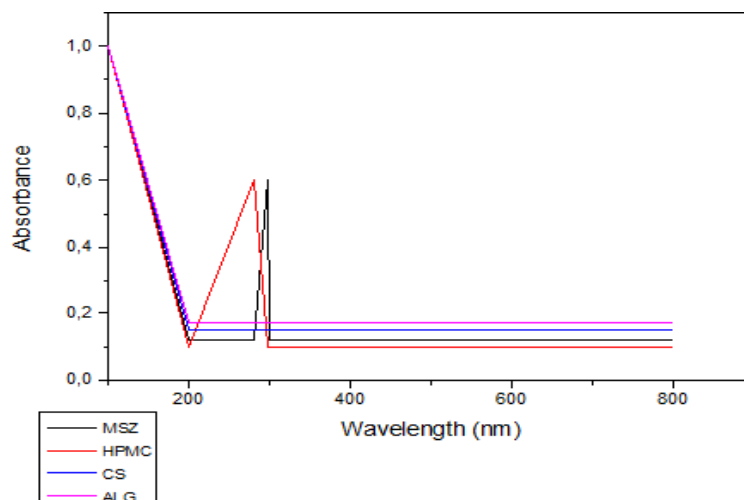
5.1.2 ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

A seletividade de um método é a capacidade de obter um analito de interesse em meio a outros componentes da formulação, podendo ser produtos de degradação, componentes da matriz etc. Inicialmente, as soluções poliméricas CS, ALG e HPMC e MSZ foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS, os picos obtidos foram sobrepostos para comparação (Figura 1). Como pode ser visto na figura 1, os polímeros CS e ALG não apresentam picos de absorção na



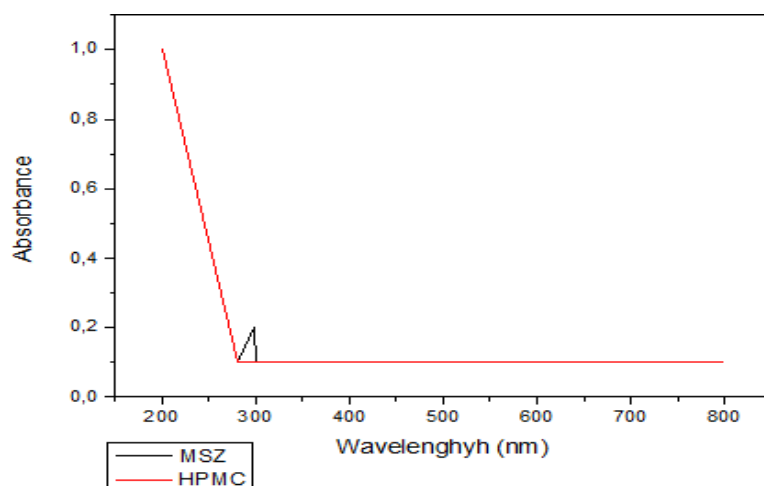
faixa de espectro de 200-800 nm que possam interferir na quantificação do fármaco. O polímero gastrorresistente HPMC apresentou um pico de absorção (280nm) muito próximo da região em que o MSZ tem seu maior pico de absorção. Os espectros obtidos estão demonstrados na figura 14.

Figura 14: Espectro de absorção da MSZ e HP



As soluções poliméricas MSZ e HPMC foram avaliadas na concentração de 7 μ g/ml. A Figura 15 representa os picos de absorção obtidos, demonstrando que não há interferência significativa com o fármaco.

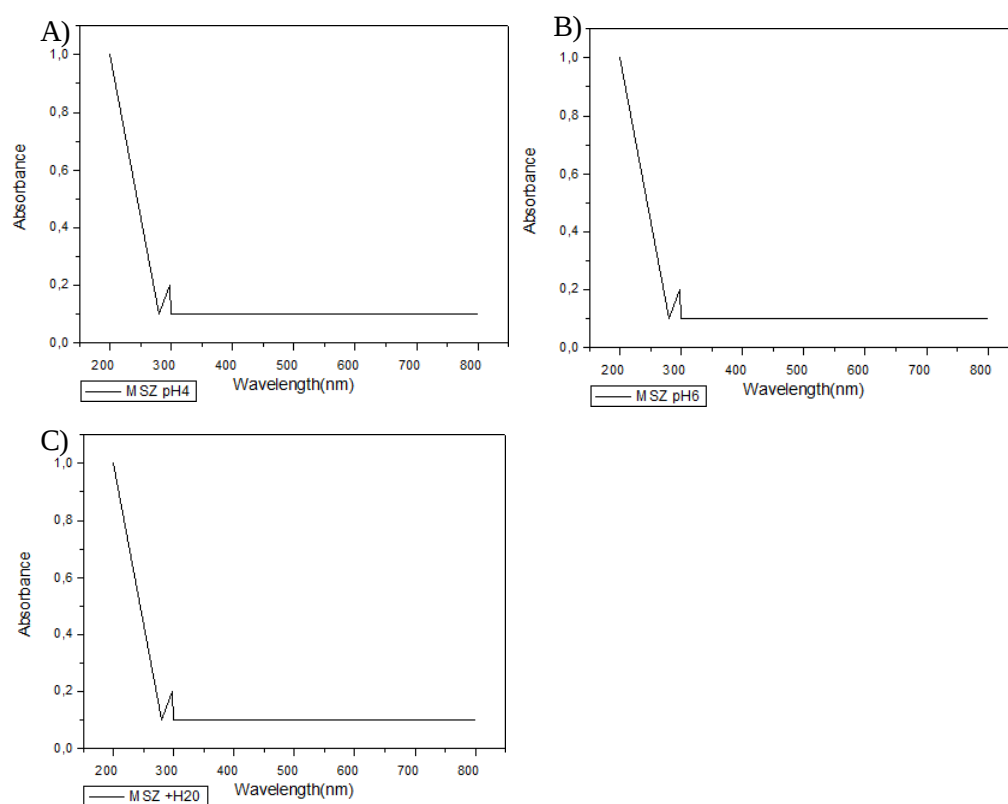
Figura 15: Espectro de absorção da MSZ na concentração de 7 μ g/ml na presença dos polímeros (—) e ausência de MSZ (---).



Para avaliar o comportamento do fármaco em diferentes meios, foram preparadas soluções do fármaco apenas solubilizadas em água e as amostras ajustadas para pH 4 e 6. Conforme mostrado nas figuras 16A, B e C, não foi observada alteração nos picos de absorção do medicamento.



Figura 16: Representação do espectro de absorção da mesalazina solubilizada em água (A) e em valores de pH 4 (B) e 6 (C).



A partir dos resultados obtidos em espectros de absorção da MSZ em diferentes meios, é possível observar que independente dos valores de pH, a MSZ não apresentou alteração nos espectros de absorção.

5.1.3 LINEARIDADE

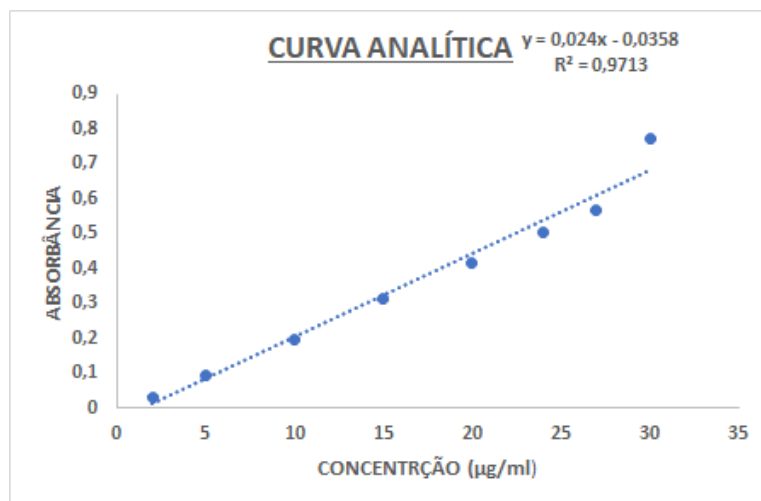
A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, sendo determinado no mínimo 5 concentrações diferentes (BRASIL, 2003). As amostras foram digitalizadas em espectrofotômetro UV-VIS com água destilada como branco, em comprimento de onda de 300nm. Os resultados obtidos apresentaram linearidade nos intervalos entre 2 e 30mcg/ml, conforme figura 17.

A Anvisa preconiza que o coeficiente de correlação (r) deve estar acima de 0,990, dessa forma a linearidade está de acordo com o estabelecido. Sendo y = absorbância e x = a concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$).



Figura 17: Curva analítica da MSZ em espectrofotômetro UV-VIS

$$y = 0,024X + 0,0358 \quad (r^2 = 0,9713)$$



5.1.4 **PRECISÃO**

A precisão de um método analítico é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla em uma amostra. As amostras para o teste de precisão intracorrida foram preparadas em triplicata, nas concentrações 5, 15 e 30 µg/ml. Os resultados obtidos foram inferiores a 5%, demonstrando que o método é preciso conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos pelo teste de precisão intra-corrida

Concentração Teórica (µg/mL ⁻¹)	Médias	DP	DPR %
5	0,099733	0,0001	0,1157
15	0,314167	0,0002	0,6226
30	0,6450	0,001	0,1640

5.1.5 **PRECISÃO INTERCORRIDA**

Os resultados foram avaliados em concordância em dias diferentes. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 2:



Tabela 2: Resultados obtidos pelo teste de precisão inter-corrida

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	Médias	DP	DPR %
5	0,09996	0,0003	0,3787
15	0,3264	0,0011	0,3533
30	0,6371	0,001	0,1966

5.1.6 EXATIDÃO

Para alcançar a exatidão do método analítico, é necessário que os resultados obtidos apresentem proximidade com o valor teórico real. A faixa de trabalho está entre 80 e 120% (Brasil, 2003). O ensaio de exatidão foi conduzido e os resultados obtidos estão na tabela 3:

Tabela 3: Resultados obtidos no teste de Exatidão

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
5	5,49	108
15	14,38	95
30	28,10	93,6

5.1.7 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que poder ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). Os resultados estimados foram obtidos a partir de 3 curvas analíticas, através das equações:

$$LQ = 10 \cdot DP / IC$$

$$LQ = 10 \cdot 0,0004932 / 0,0183$$

$$LQ = 0,2695 \mu\text{g/ml}$$

Pode-se determinar o LD a partir do limite de quantificação através da equação:

$$LD = LQ \cdot 3,3 / IC \quad 0,2695 = 0,0004932 \cdot 3,3 / 0,0183$$

$$LD = 0,08893 \mu\text{g/ml}$$



5.1.8 **ROBUSTEZ**

A robustez é a capacidade do método resistir a pequenas variações nas condições de análise. Para testar a robustez do método, foi preparada uma solução de mesalazina a uma concentração de 20µg/ml, acondicionada em frasco de vidro âmbar e colocada na geladeira. As análises foram realizadas no momento do preparo, 12 e 24 horas após o preparo. Os resultados estão representados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos no teste de Robustez

1ª medida	DP	DPR %	2ª medida (12 horas)	DP	DPR %	3ª medida (24 horas)	DP	DPR %
0,4496	0,001	0,31	0,4503	0,001	0,43	0,4468	0,0002	0,05
0,4512			0,4464			0,4467		
0,4484			0,4479			0,4463		

O fator de diluição foi obtido pelo cálculo do volume final das formulações dividido pela alíquota determinada pela concentração 7mcg/ml. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro, de acordo com o método validado.

Portanto, o presente método validado apresentou-se em acordo com as especificações pré-estabelecidas pela legislação vigente, sendo utilizado para dar seguimento aos experimentos.

5.2 **AVALIACÃO DA SOLUBILIDADE DA MSZ EM DIFERENTES MEIOS DE pH**

A solubilidade da MSZ foi determinada através da sua quantificação em espectrofotômetro UV-VIS, a partir da curva analítica do método previamente validado no item 4.2.1. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Determinação da solubilidade da MSZ em espectrofotômetro UV-VIS

<u>Formulações</u>	<u>Concentração da MSZ solubilizada mg/ml</u>
MSZ + H ₂ O	0,7871
MSZ pH 4	0,8845
MSZ pH 6	0,9285

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que não houve diferença de solubilidade entre os valores de pH, mesmo a MSZ sendo um fármaco de solubilidade dependente.



5.2.1 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DAS NANOSSUSPENSÕES DE MSZ

A caracterização das nanossuspensões de MSZ foi realizada para obtenção do tamanho, PDI e potencial zeta, os resultados obtidos estão representados na tabela 6.

Tabela 6: Caracterização das nanossuspensões de MSZ

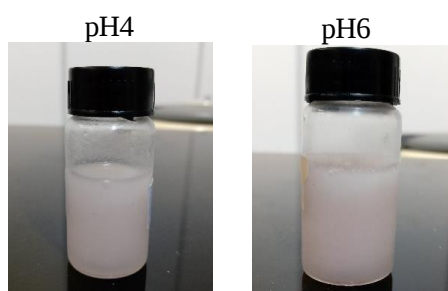
<u>Concentração</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>pH</u>	<u>Tamanho</u> <u>(nm)</u>	<u>PDI</u>	<u>Potencial</u> <u>zeta (mV)</u>
10	4	9.568	0,973	-4,11
10	6	51.880	1000	-1,39
5	4	7.793	0,855	+10,9
5	6	4.922	1000	-23,7
3,3	4	7.118	1000	-14,9
3,3	6	11.410	1000	-30,5
1,66	4	394,5	0,501	-14,8
1,66	6	397,8	0,654	-3,9

Através da caracterização das nanossuspensões de MSZ, podemos verificar que houve formação de partículas maiores e altos valores de PDI conforme aumentou a concentração de MSZ para obtenção das NS. Dessa forma, o menor diâmetro, PDI e potencial zeta das partículas foi obtido na concentração de 1,66mg/ml, sendo selecionada para incorporação das nanossuspensões nos sistemas binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP).

5.2.2 AVALIAÇÃO DA REDISPERSABILIDADE DAS NANOSSUSPENSÕES

Após um período de 24 horas, foi avaliado a redispersão das nanossuspensões homogeneizando as amostras, que permitiram fácil redispersão em ambos valores de pH 4 e 6, sem obter formação de sedimento compacto no fundo do frasco, como apresentados na figura 18.

Figura 18: Avaliação da redispersabilidade das nanossuspensões de MSZ



5.2.2 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE PARTÍCULAS PRECIPITADAS

Após caracterização das nanossuspensões, verificou-se que a concentração que apresentou menor diâmetro de partículas, PDI e potencial zeta foi de 1,66mg/ml. Dessa forma, para quantificar a mesalazina em nanossuspensão foi preparada a 1,66mg/ml, o sobrenadante foi separado e analisado empregando a curva analítica obtida pelo método previamente validado. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos na quantificação da MSZ no dia da preparação, após 24 horas, 1 semana e 1 mês.

Tabela 7: Quantificação das nanossuspensões de MSZ

<u>Formulações 1,66mg/ml</u>	<u>Percentagem de MSZ no precipitado (%)</u>
MSZ pH 4 (24 hs)	24,5
MSZ pH 4 (1 semana)	61,6
MSZ pH 4 (1 mês)	67,1
MSZ pH 6 (24 hs)	48
MSZ pH 6 (1 semana)	44
MSZ pH 6 (1 mês)	45

Analisando as nanossuspensões de MSZ em pH 4, podemos observar que após 24 horas a concentração no sobrenadante analisado aumentou, demonstrando que a quantidade de MSZ no precipitado após 24 horas foi solubilizado, obtendo-se menor percentagem de MSZ no precipitado. Em pH 6, após 24 horas a concentração de MSZ no sobrenadante foi reduzida, demonstrando que após um determinado tempo, ainda houve formação de partículas com maior percentagem de MSZ no precipitado.

5.3 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (OS/ALG) E TERNÁRIO (OS/ALG/HP) SEM O FÁRMACO

5.3.1 AVALIAÇÃO DAS PROPORÇÕES POLIMÉRICAS

A formação de nanopartículas pode ser influenciada por alguns fatores, como a concentração de polímeros, força iônica, massa molar, pH do meio, densidade e distribuição de cargas, tempo de agitação, temperatura (CARDOSO, 2019), e a ordem de adição dos materiais (YILMAZ, 2019). A seleção dos materiais também é um atributo muito importante na obtenção de sistemas polieletrólitos, neste trabalho, buscou-se destacar as principais propriedades dos polímeros, como baixa toxicidade, biocompatibilidade e capacidade de mucoadesão.

Para obtenção dos sistemas, aplicou-se o processo de complexação polieletrólítica, na qual a QS se reestrutura com os polímeros aniônicos por reticulação de seus grupos amino carregados



positivamente, e os grupos carboxílicos do alginato carregado do negativamente (ZHANG, 2012). Dessa forma, foram preparadas amostras em diferentes proporções e concentrações, dos sistemas vazios e com adição do fármaco. A análise macroscópica das amostras foi classificada pelas siglas: (A) agregado, (O) opalescente e (L) límpido como mostra a figura 19.

Figura 19: Classificação do aspecto macroscópico do desenvolvimento das nanopartículas poliméricas sem adição do fármaco.



A **L**
Fonte: próprio autor

A tabela 8 apresenta as diferentes proporções testadas para formação do sistema polimérico binário (QS/ALG), em diferentes valores de pH. O sistema binário foi preparado em concentração total polimérica de 0,25mg/ml, nas proporções (1:9, 2:8, 5:5, 6:4, 8:2 e 9:1) e em valores de pH 4 e 6.

Tabela 8: Avaliação macroscópica das dispersões poliméricas obtidas pela associação dos polímeros QS/ALG.

<u>Proporção (QS/ALG/)</u>	<u>pH</u>	<u>Característica visual</u>
1:9	4	Límpido
1:9	6	Agregado
2:8	4	Agregado
2:8	6	Agregado
5:5	4	Agregado
5:5	6	Agregado
6:4	4	Límpido
6:4	6	Límpido
8:2	4	Límpido
8:2	6	Límpido
9:1	4	Límpido
9:1	6	Límpido

Devido o excesso de carga negativa na solução aquosa de QS, e a maior proporção de ALG em



relação à QS, pode induzir a formação de agregados para 5:5. A medida que o ALG foi sendo adicionado, a densidade de cargas foi sendo reduzida, podendo aproximar-se da neutralidade elétrica (zwiteriônica), o que levou a redução do grau de reticulação entre as partículas e consequente agregação do sistema.

As dispersões do sistema ternário (QS/ALG/HPMCP) foram obtidas em concentração polimérica total de 0,25mg/ml, nas proporções (2:4:4, 5:2,5:2,5, 6:2:2 e 8:1:1) e em valores de pH 4 e 6. A seleção do sistema ternário foi baseado em algumas das proporções do sistema binário, a fim de comparar o comportamento dos sistemas com maiores e menores proporções de polícatión e poliânions. Como demonstrado na tabela 9, todas as preparações apresentaram aspecto visual límpido.

Tabela 9: Avaliação macroscópica da variação de concentração e proporção das dispersões poliméricas obtidas pela associação dos polímeros QS/ALG/HP.

<u>Proporção</u> <u>(QS/ALG/HPMCP)</u>	<u>pH</u>	<u>Característica visual</u>
2:4:4	4	Límpido
2:4:4	6	Límpido
5:2,5:2,5	4	Límpido
5:2,5:2,5	6	Límpido
6:2:2	4	Límpido
6:2:2	6	Límpido
8:1:1	4	Límpido
8:1:1	6	Límpido

5.4 PREPARO DOS SISTEMAS BINÁRIO (QS/ALG) E TERNÁRIO (QS/ALG/HP) SEM O FÁRMACO

5.4.1 ANÁLISE DE TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS SEM O FÁRMACO

Diversas características podem alterar o tamanho de partículas, dentre elas, a concentração e grau de complexação de polieletrólitos, podendo ser dependente do pH do meio e grau de ionização (AVADI, 2010). A formação de partículas menores pode ser obtida através de polímeros que possuem baixa massa molar e apresentam menor cadeia polimérica. Polímeros com massa molar alta e cadeia polimérica maior são capazes de formar partículas maiores, no entanto, podem produzir uma dispersão fisicamente mais estável (CARDOSO, 2019).

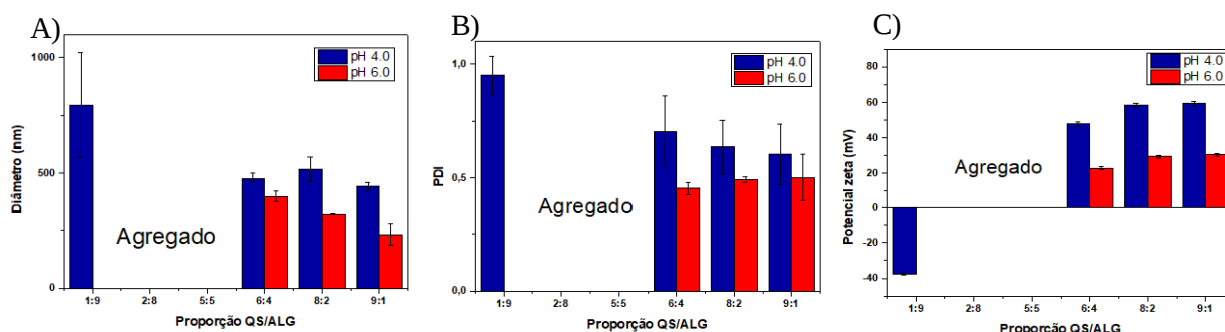
O índice de polidispersão está relacionado com a intensidade de luz dispersa às partículas de



tamanho variados, indicando a homogeneidade do sistema, e é calculado pela largura média dos picos. Um índice de polidispersão $< 0,5$ é favorável à obtenção de NPs com maior homogeneidade de tamanho e estabilidade física do sistema (ABRAHAM, 2006). Para avaliar o índice de polidispersão das amostras, considera-se que 0,1 é um sistema monodisperso, de 0,1 a 0,4 moderadamente e $> 0,5$ altamente polidisperso. Os valores de PDI próximos a zero indicam formação de um sistema mais homogêneo e valores maiores que 0,5 indicam sistemas heterogêneos, ou seja, com tamanhos de partículas variados (AVADI 2010).

O potencial zeta é utilizado para controlar a estabilidade física de formulações, a qual relaciona a carga superficial das partículas e a repulsão eletrostática entre as cargas positivas e negativas. A densidade de cargas depende do grau de ionização dos polímeros adicionados (CARDOSO, 2019), e os valores correspondentes a alta estabilidade estão entre -30mV e +30mV. As cargas de superfície podem alterar a estabilidade do sistema devido as diferentes proporções dos seus constituintes, valores altos de potencial zeta são importantes para estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois as forças repulsivas tendem a evitar agregação devido as colisões entre as partículas (SCHAFFAZICK, 2003). A figura 20A, B e C apresenta os valores de tamanho, pdI e potencial zeta dos sistemas poliméricos binários (QS/ALG).

Figura 20: Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas compostas por QS/ALG sem adição do fármaco.



De maneira geral, as NPs formadas por QS/ALG apresentaram diâmetro médio na faixa de 438,1 a 796,6nm em pH4, e em pH 6 o diâmetro foi de 230,9 a 396,5, caracterizando sistemas compostos por partículas submicrométricas. Observou-se que o aumento da proporção de QS em relação ao ALG, proporcionou redução do diâmetro e PDI. Os menores valores de diâmetro foram verificados em pH6, é provável que o pH do meio tenha influenciado na força de interação entre os arranjos conformacionais de suas estruturas, tornando-as mais compactadas (CARDOSO, 2019), uma vez que a mudança de pH pode alterar propriedades como tamanho, PDI e potencial zeta de NPs de QS (WANI, 2021).

Em relação ao PDI, todas as formulações testadas em pH 4 apresentaram-se polidispersas (com $PDI > 0,5$), indicando distribuição variável no diâmetro das partículas. As formulações em pH 6

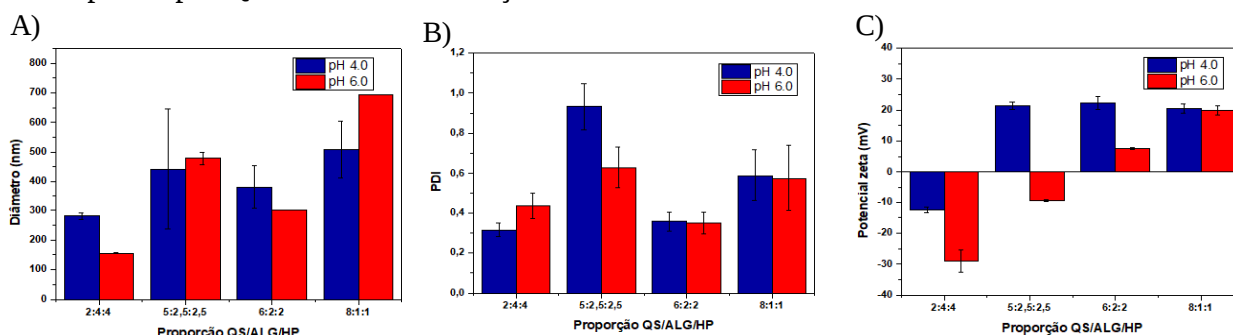


apresentaram-se monodispersas (com PDI <0,5), indicando homogeneidade na distribuição do diâmetro das partículas.

Na proporção 1:9 em pH 4, o potencial zeta apresentou um valor negativo (- 37,8mV), provavelmente pela maior proporção do poliânion (ALG) no sistema. Ainda em pH4, as formulações 6:4, 8:2 e 9:1 apresentaram valores de potencial zeta acima de +40mV, o que está relacionado a maior proporção do polycation (QS) no sistema, indicando um sistema estável. Já em pH6, o potencial zeta das proporções 6:4, 8:2 e 9:1 variou entre +22,9 e +30,5 mV. Observou-se que em pH 4, ao aumentar as proporções de QS em relação ao ALG nos sistemas, a densidade de cargas consequentemente foi aumentando, pois devido a natureza polieletrólítica da QS, sua densidade de carga superficial é alta, proporcionando formação de ligações de hidrogênio entre grupos amina e hidroxila (WANI, 2021).

Comparando os dois valores de pH, as partículas formadas em pH 6 demonstraram menor diâmetro médio, distribuição monomodal e estabilidade elétrica apropriada.

Figura 21 : Diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas compostas por QS/ALG/HP sem adição do fármaco.



As NPs compostas por QS/ALG/HP apresentaram diâmetro médio entre 281 a 508,9nm em pH4, e em pH 6 os valores de diâmetro variaram entre 156,2 e 693,4nm, indicando que a adição de HP aos sistemas, evidenciou alguns diâmetros de partículas menores. Tanto em pH4 quanto em pH6, o menor diâmetro de partículas foi obtido na proporção 2:4:4, com uma menor proporção de QS em relação aos poliânions ALG e HP, bem como o maior diâmetro de partícula foi obtido com maior proporção de QS ao sistema (8:1:1) com relação ao ALG e HP em pH6.

Os valores de PDI variaram de 0,314 a 0,934 em pH4, e em pH 6, de 0,348 a 0,630. Partículas monodispersas (<0,5) e sistema mais homogêneo foi obtido em pH 4 e 6, nas proporções poliméricas 2:4:4 e 6:2:2. Nas proporções 5:2,5:2,5 e 8:1:1, as partículas obtidas foram polidispersas para os dois valores de pH. Observou-se que a adição de HPMC à matriz polimérica proporcionou menores diâmetro de partículas e PDI para ambos valores de pH.



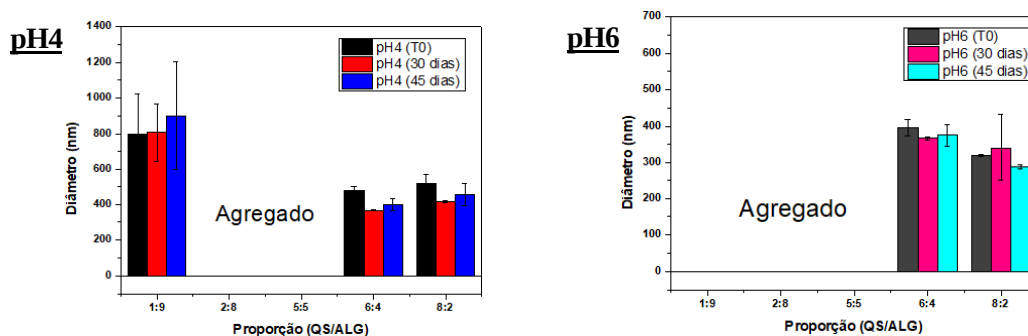
A amostra com proporção 2:4:4 apresentaram valores de potencial zeta negativo, com valores entre -12,5 e -29mV em pH 4 e 6 respectivamente, devido a maior proporção de poliânions. Já as NPs nas proporções 5:2,5:2,5 (pH4), 6:2:2 e 8:1:1(pH 4 e 6) apresentaram potencial zeta positivo com valores entre +7,57 a +22,2 mV. É possível observar que com adição de HPMC, houve menor densidade de cargas no sistema, essa redução pode indicar a incorporação do HPMC na matriz polimérica (BONI, 2017). A proporção 6:2:2 apresentou o menor valor de potencial zeta (+7,57mV), podendo estar relacionado com a maior proporção de QS, levando a uma interação entre os polímeros com redução de grupos carboxílicos, hidroxilas e consequentemente da densidade de carga superficial (CARDOSO, 2019). A amostra 5:2,5:2,5 em pH 6 apresentou valores de potencial zeta negativos, provavelmente devido as interações partícula-partícula na presença de polieletrólitos de cargas opostas, levando a neutralização e consequente reversão de cargas (YAMAGUCHI, 2019).

Com isso, avaliando a incorporação do fármaco aos sistemas binário e ternário, verificou-se que em ambos os sistemas mostraram menor diâmetro médio de partículas em pH 6, bem como o índice de polidispersão e com algumas exceções no potencial zeta, em que nas proporções 5:2,5:2,5 e 6:2:2 apresentou valores mais reduzidos, com menor estabilidade elétrica.

5.4.2 ESTABILIDADE FÍSICA DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (QS/ALG) E TERNÁRIO (QS/ALG/HP) SEM O FÁRMACO

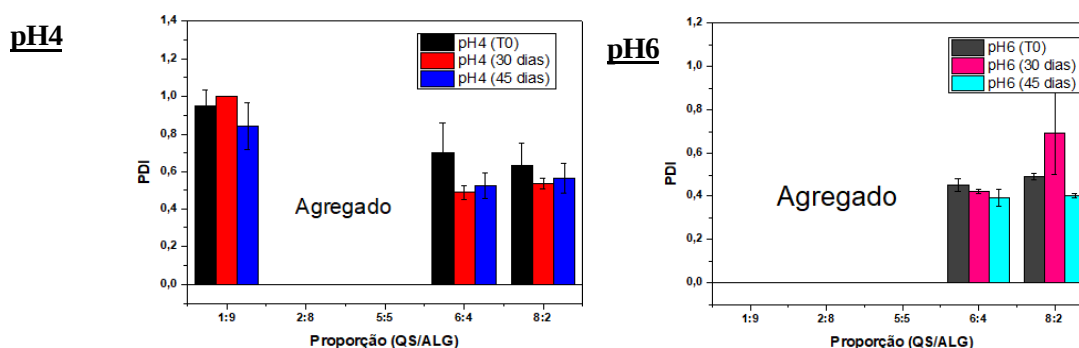
A estabilidade física dos sistemas poliméricos binário e ternário foi realizada após 30 e 45 dias do preparo, os resultados estão apresentados nas figuras 22A, B e C.

Figura 22: Avaliação do diâmetro médio na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.



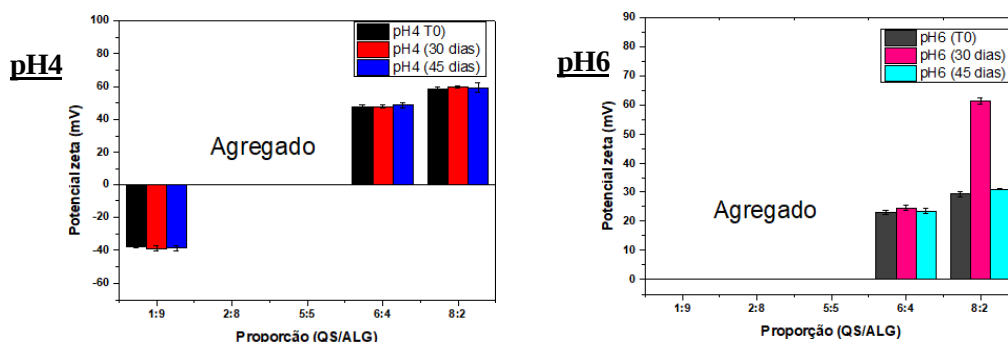
Após 45 dias, notou-se que houve aumento no diâmetro de partículas na proporção 1:9 em pH4, já para as proporções 6:4 e 8:2 houve uma ligeira redução no diâmetro das partículas. Em pH6, houve discreta redução no diâmetro de partículas nas proporções 6:4 e 8:2. Podemos observar que em maiores proporções de QS ao sistema em relação aos poliânions ALG e HP, o diâmetro de partículas foi sendo reduzido ao longo do tempo.

Figura 23: Avaliação do índice de polidispersão na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.



Na avaliação do PDI, é possível verificar que houve uma redução no PDI em todas as proporções observadas, com exceção de 1:9 em pH4 no período de 30 dias, voltando a reduzir após 45 dias. Em pH6, houve redução no PDI na proporção 6:4, já em 8:2 após 30 dias o valor aumentou e voltou a reduzir em 45 dias.

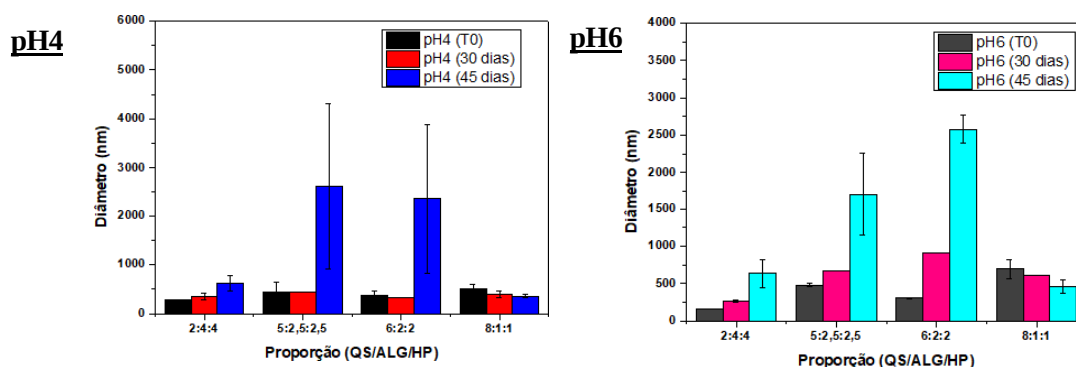
Figura 24: Avaliação do potencial zeta na estabilidade física do sistema polimérico binário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.



Na avaliação do potencial zeta em pH4, não foi observado diferença significativa tanto após 30 dias, quanto após 45 dias de preparo, o mesmo podemos observar em pH6 na proporção 6:4, com exceção da proporção 8:2 houve aumento significativo após 30 dias, voltando a estabilizar após 45 dias.



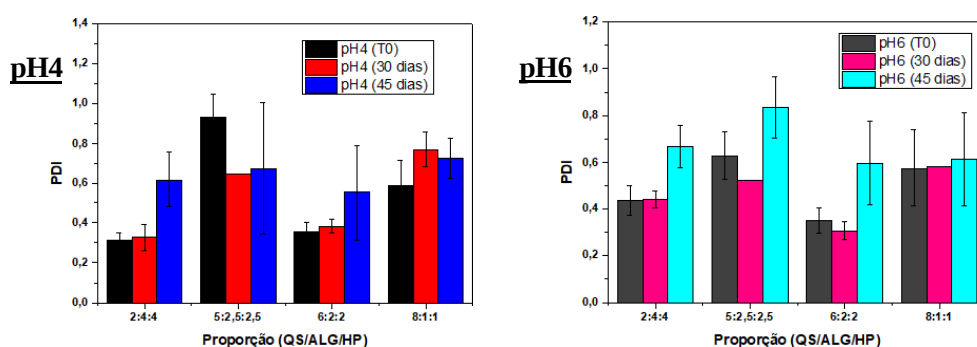
Figura 25: Avaliação do diâmetro médio na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.



Podemos observar que as NPs compostas por QS/ALG/HP em pH4, nas proporções 5:2,5:2,5 e 6:2:2 apresentaram um aumento significativo no diâmetro das partículas após 45 dias do preparo dos sistemas. Em pH6, houve aumento significativo no diâmetro das partículas nas proporções 2:4:4, 5:2,5:2,5 e 6:2:2, já na proporção 8:1:1 após 45 dias houve redução no diâmetro de partículas.

Tanto em pH4 quanto em pH6, as proporções 5:2,5:2,5 e 6:2:2 apresentaram aumento significativo no diâmetro das partículas após 45 dias de seu preparo. Em 8:1:1, a maior proporção de QS em relação aos poliânions ALG e HP apresentou redução no diâmetro de partículas em ambos valores de pH. Em estudo de comparação dos sistemas poliméricos binário e ternário, podemos verificar que nos sistemas com adição da proporção 2 e 2,5 de HPMC houve aumento considerável no diâmetro médio das partículas após período de 45 dias.

Figura 26: Avaliação do índice de polidispersão na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.

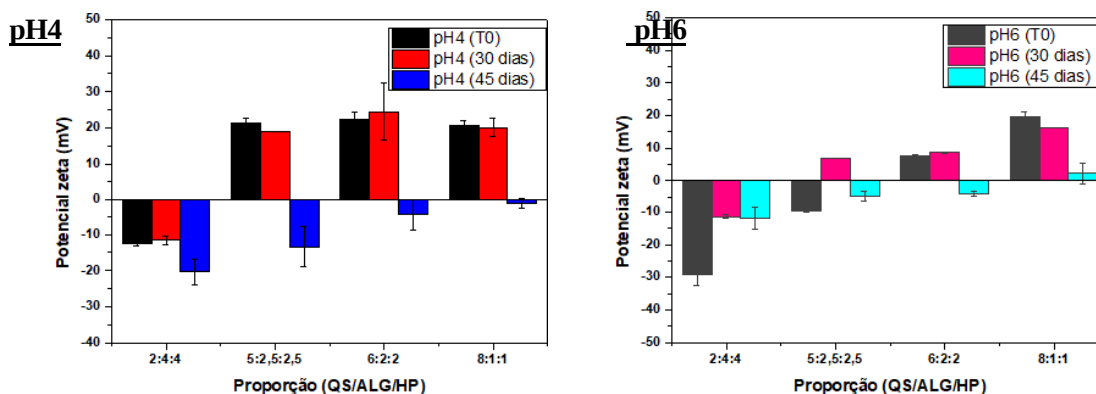


Em pH 4, as proporções 2:4:4, 6:2:2 e 8:1:1 apresentaram aumento no PDI após 45 dias de preparo, com exceção da proporção 5:2,5:2,5 a qual houve redução nos valores de PDI. Em pH6, houve aumento nos valores de PDI para todas as proporções testadas, com exceção na proporção 8:1:1, a qual se observa discreto aumento de PDI. Verificou-se através das amostras



com maior proporção de quitosana, que mesmo com adição de HPMC não houve diferenças significativas na distribuição das partículas entre os sistemas.

Figura 27: Avaliação do potencial zeta das partículas na estabilidade física do sistema polimérico ternário (tempo 0, 30 e 45 dias), em pH 4 e 6.



Na avaliação da estabilidade do potencial zeta em pH4 com adição de HPMC, podemos verificar que na proporção 2:4:4 houve um aumento na densidade de cargas após 45 dias de preparo dos sistemas, para as demais proporções houve inversão de cargas e consequente instabilidade dos sistemas. Em pH6, houve redução da densidade de cargas na proporção 2:4:4 e 8:1:1, e inversão de cargas nas proporções 5:2,5:2,5 e 6:2:2 após um período de 45 dias. Esses efeitos podem ocorrer devido as propriedades elétricas dos materiais ou interações entre as partículas coloidais, uma vez que a carga líquida de uma partícula pode ser reduzida ou revertida através da adsorção de cargas opostas de polieletrólitos, o que leva a neutralização de cargas com atração de íons de mesmo sinal que se repelem (contra-íons), balanceando cargas superficiais e formando uma dupla camada elétrica (YAMAGUCHI, 2019).

5.5 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (QS/ALG) E TERNÁRIO (QS/ALG/HP) COM O FÁRMACO SOLUBILIZADO E EM NANOSSUSPENSÃO

5.5.1 PREPARO DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (QS/ALG) E TERNÁRIO (QS/ALG/HP) COM O FÁRMACO

A incorporação da MSZ aos sistemas foi realizada de duas maneiras: utilizando o fármaco solubilizado em água na concentração de 0,8mg/ml, e na forma de nanossuspensões em concentração de 1,66mg/ml, sendo o pH ajustado para 4 e 6 para ambas as formas de preparo do fármaco. As proporções dos sistemas selecionadas para incorporação foram: 2:8 e 8:2 (QS/ALG) e 2:4:4, 8:1:1(QS/ALG/HPMCP), o objetivo é verificar o comportamento do fármaco ao ser

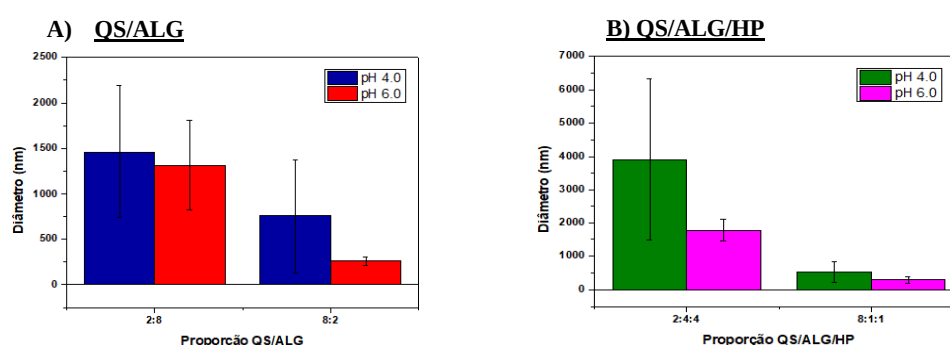


incorporado em menores e maiores proporções de cada constituinte do sistema polimérico, e a diferença da incorporação do fármaco solubilizado e na forma de nanossuspensões.

5.5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO EM NANOSSUSPENSÃO

Foi realizada a caracterização das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos, verificando o tamanho das partículas, polidispersão e , podendo ser observados nas figuras 28 A e B.

Figura 28: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – Diâmetro médio



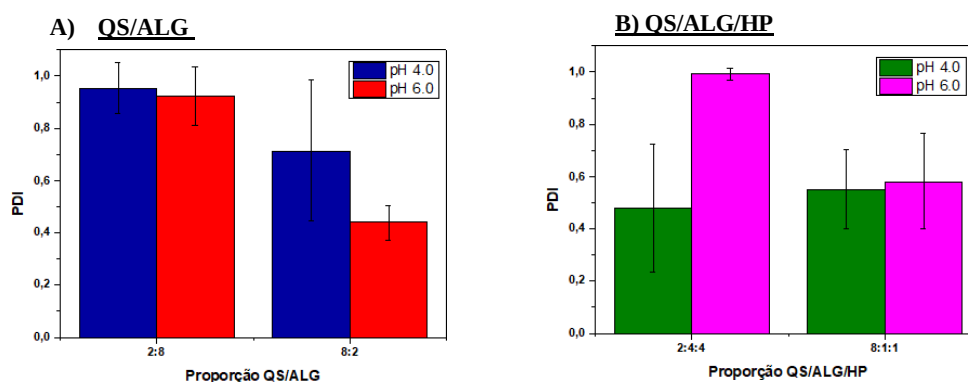
Em pH4, o sistema binário apresentou maior diâmetro de partículas (1461nm) na proporção 2:8 (QS/ALG), e o menor diâmetro de partículas (257,8nm) foi obtido em pH6, na proporção 8:2 (QS/ALG). O diâmetro de partículas diminuiu para ambos valores de pH 4 e 6, com o aumento da proporção de QS em relação ao ALG no sistema. O diâmetro de partículas variou entre 752,1 e 1461nm em pH 4, e em pH 6, o diâmetro de partículas variou entre 257,8e 1313nm.

No sistema ternário, o mesmo comportamento foi observado com menor diâmetro de partículas obtido em pH6, na proporção 8:1:1 (QS/ALG/HP), e o maior diâmetro de partículas foi obtido em pH4, na proporção 2:4:4 (QS/ALG/HP). O diâmetro de partículas foi reduzido com o aumento da proporção de QS ao sistema em relação aos outros polímeros (ALG/HP).

O conjunto de dados mostra que, a adição da MSZ em nanossuspensão ao sistema binário influenciou na obtenção do diâmetro de partículas, uma vez que na proporção 2:8 (QS/ALG) a característica foi de presença de agregados, após a incorporação do fármaco em pH6, obteve-se um diâmetro de 257,8nm. Para a proporção 8:2 (QS/ALG) em pH6 houve redução no diâmetro de 321,4 para 257,8nm. A incorporação do fármaco ao sistema ternário também influenciou no diâmetro de partículas, na proporção 8:1:1 houve redução do diâmetro de 693,4 nm para 294,6nm em pH6.

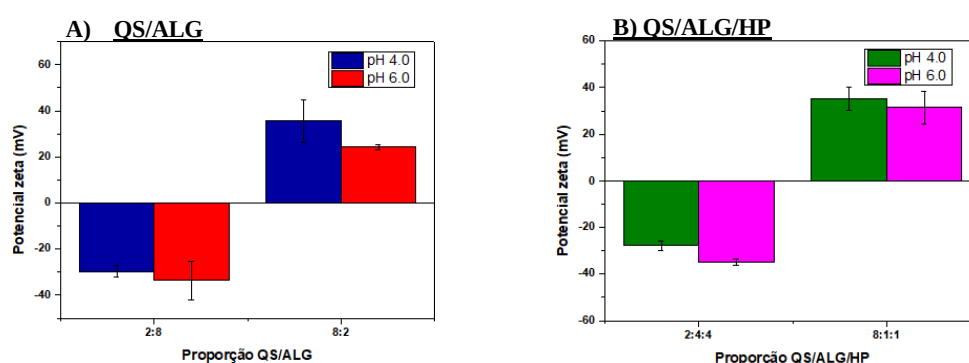


Figura 29: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário(QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – PDI



As nanopartículas compostas por QS/ALG apresentaram valores de PDI de 0,439 a 0,953, sendo a proporção 8:2 em pH6 considerada monodispersa. Para as NPs compostas por QS/ALG/HP, o PDI foi semelhante de 0,550 a 0,992, sendo em pH4 apresentados os menores valores de PDI. Com a incorporação da MSZ aos sistemas, os valores de PDI praticamente não alteraram, na proporção 8:2 em pH6, os valores foram de 0,494 para 0,439, na proporção 8:1:1 em pH6, também não houve diferença significativa, com valores de 0,576 para 0,581 após adição do fármaco ao sistema.

Figura 30: Caracterização da incorporação das nanossuspensões de MSZ aos sistemas poliméricos binário(QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) – Potencial zeta



No sistema binário(QS/ALG), os valores de potencial zeta foram negativos para proporção 2:8 em ambos valores de pH 4 (-29,8mV) e 6 (-33,7mV). Em pH 4, na proporção 8:2 (QS/ALG), os valores foram positivos (+35,7mV) e para pH 6 (+24,4mV). Dessa forma, para menores proporções de QS em relação ao ALG, os valores de potencial zeta foram negativos, e para maiores proporções de QS em relação ao ALG, os valores de potencial zeta foram positivos.

No sistema ternário(QS/ALG/HP), a proporção 2:4:4 (QS/ALG/HP) para ambos valores de pH 4 e 6, apresentou potencial zeta com valor negativo. A composição 8:1:1 (QS/ALG/HP) para ambos valores de pH 4 e 6, apresentaram potencial zeta com valor positivo. Em pH 4, o potencial zeta



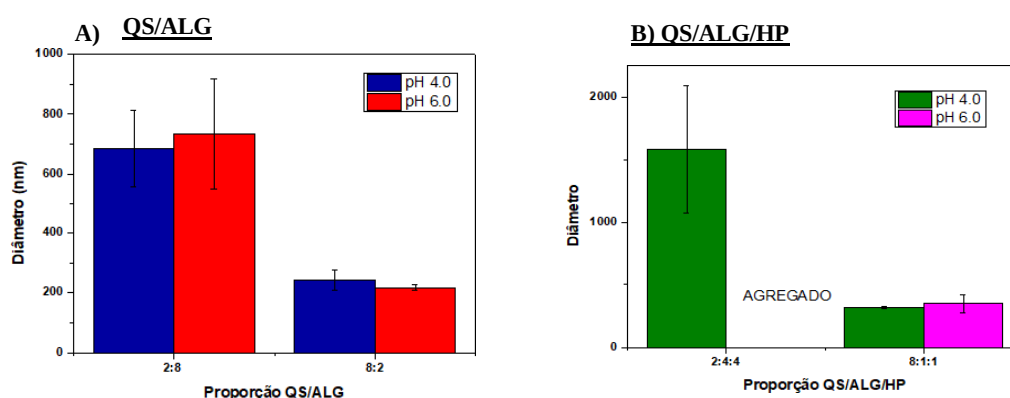
variou entre -28 e -35,4mV, e em pH 6, a densidade de cargas variou entre +35,1 e +31,6mV.

Podemos verificar que com a adição da MSZ, na proporção 8:2, o potencial zeta variou de +29,4 para +24,4mV em pH6. Para a proporção 8:1:1, podemos concluir que em pH6 com a maior proporção de QS em relação aos poliânions ALG/HP, houve aumento na densidade de cargas de +19,8 para +31,6mV, proporcionando maior estabilidade do sistema.

5.5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS BINÁRIO E TERNÁRIO CONTENDO A MSZ SOLUBILIZADA

As soluções de MSZ foram preparadas na concentração 0,8mg/ml, em valores de pH 4 e 6, e incorporadas aos sistemas poliméricos pelo método de complexação polieletrólítica. As formulações foram caracterizadas, verificando tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas obtidos, como demonstrados nas figuras 31 A e B.

Figura 31: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada ao sistema polimérico binário (QS/ALG) –Diâmetro médio



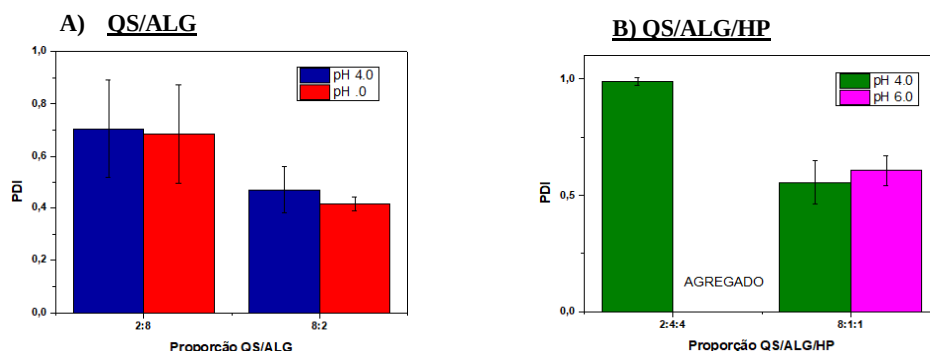
Em pH 4, o diâmetro de partículas obtido foi maior para os sistemas binário e ternário com maior proporção de poliânions. O diâmetro médio-z de partículas foi obtido em escala nanométrico tanto em pH 4 quanto em pH 6, variando de 217nm a 733,4nm. Observou-se que os menores diâmetros de partículas foram obtidos nos sistemas com maiores proporções do policátion, além disso, e após adição do fármaco disperso molecularmente as partículas ainda reduziram de tamanho, na proporção 8:2 em pH4, o diâmetro reduziu de 518,8nm para 243nm, e em pH6, o diâmetro reduziu de 321,4 para 217nm.

No sistema ternário, a proporção 8:1:1 (QS/ALG/HP) para ambos valores de pH, apresentou diâmetro de partículas entre 316 e 346,8nm, ainda a maior proporção de QS em relação aos demais polímeros (ALG/HP) proporcionou um diâmetro de partículas menor. Diâmetros de partículas menores são obtidos com QS de baixo peso molecular (CARDOSO, 2019), o que pode contribuir para esses achados.



Em pH 6, a proporção 2:4:4 apresentou formação de agregados, sugere-se que a maior proporção de cargas negativas no sistema anulou as cargas positivas, devido a menor interação polieletrólítica ocasionando a agregação do sistema.

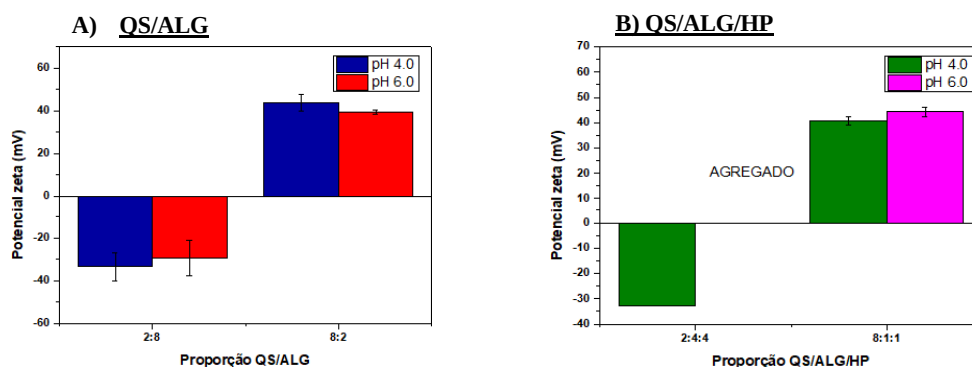
Figura 32: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) ternário (QS/ALG/HP) – PDI



Em pH 4 e 6, no sistema binário na proporção 2:8 (QS/ALG) apresentou distribuição de tamanho das partículas polidispersos ($>0,5$), e na proporção 8:2 (QS/ALG) os sistemas obtidos foram monodispersos ($<0,5$), demonstrando homogeneidade no sistema. Em pH 4, os valores de PDI variaram entre 0,470 e 0,705, e em pH6, os valores de PDI variaram entre 0,417 e 0,684. A adição de MSZ solubilizada ao sistema binário proporcionou discreta redução de PDI em pH6, com valores de 0,494 para 0,417.

No sistema ternário, a proporção 2:4:4 em pH6, apresentou formação de agregados. Todas as proporções apresentaram distribuição de tamanho polidisperso. A maior proporção de QS em relação aos polímeros ALG e HP proporcionou valores de PDI mais baixos (0,557 a 0,608), assim como para o sistema binário. Para o sistema ternário, a incorporação do fármaco alterou os valores de PDI, tanto na proporção 2:2:4 em pH 4 (0,314 para 0,590), quanto na proporção 8:1:1 em pH4 (0,590 para 0,989).

Figura 33: Caracterização da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) ternário – Potencial zeta



No sistema binário, em pH4, os valores de potencial zeta variaram entre -33,5 e -29,5mV. Em pH6, os valores de potencial zeta ficaram entre +43,7 e +39,2mV. A proporção 2:8 (QS/ALG) apresentou valores de potencial zeta negativos para ambos valores de pH, e a proporção 8:2 (QS/ALG) apresentou valores de potencial zeta positivo para ambos valores de pH. A maior proporção de QS em relação ao ALG proporcionou densidade de cargas mais alta. Após adição do fármaco ao sistema, na proporção 8:2 em pH4, o valor de potencial zeta variou de (+58,6 para +43,7mV) e em pH6 (+29,4 para +39,2mV).

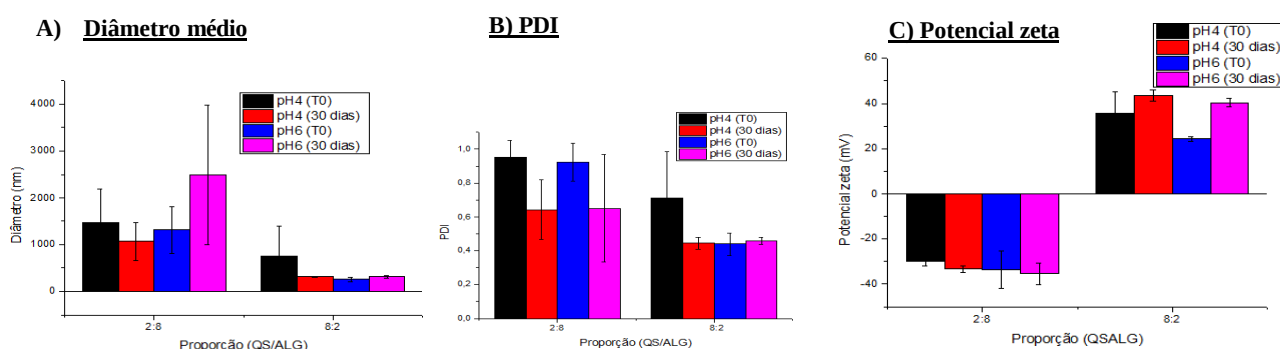
No sistema ternário, a proporção 2:4:4 (QS/ALG/HP) em pH4, apresentou potencial zeta negativo (-32,8mV), e em pH 6 apresentou formação de agregados. A proporção 8:1:1 (QS/ALG/HP) em pH 4 e 6, apresentou potencial zeta com carga positiva (+40,7 e +44,4 mV). A adição da MSZ ao sistema ternário promoveu aumento na densidade de cargas na proporção 2:4:4 em pH4 (-12,5 para -32,8mV), e em pH6 (+20,5 para -32,8mV).

Dessa maneira, podemos concluir que a maior proporção de quitosana em relação aos poliânions proporcionou menores diâmetros de partículas tanto em pH 4 quanto em pH6, bem como os valores de PDI e potencial zeta.

5.5.4 ESTABILIDADE DOS SISTEMAS CONTENDO O FÁRMACO INCORPORADO EM NANOSSUPENSÃO

As nanossuspensões foram armazenadas na geladeira ao abrigo da luz, e após 30 dias do preparo verificou-se a estabilidade em função do tempo das formulações analisando possíveis alterações no diâmetro de partículas, PDI e potencial, que estão representados nas figuras 34A, B e C.

Figura 34: Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta na estabilidade física das nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) incorporadas ao sistema polimérico binário (QS/ALG) em pH 4 e 6, após 30 dias do preparo.



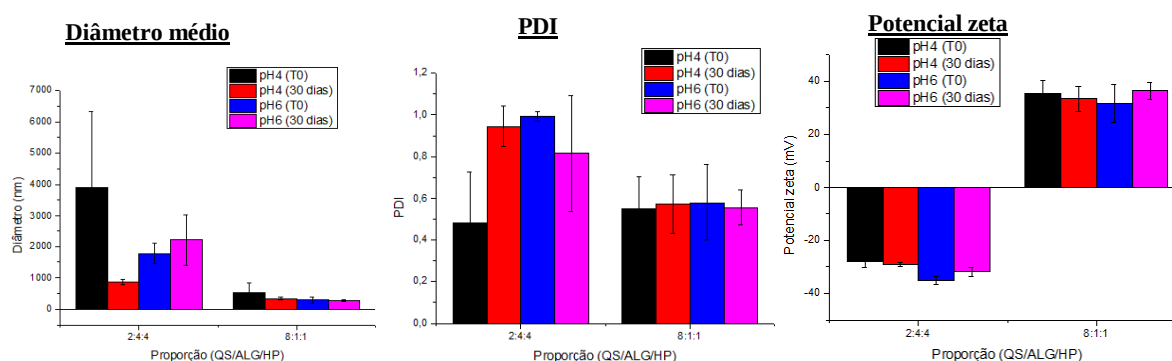
Avaliando a estabilidade das nanossuspensões de MSZ no sistema binário, observa-se que em pH4 houve redução no diâmetro de partículas na proporção 2:8 e em pH6 o diâmetro aumentou, já na proporção 8:2 houve redução no diâmetro de partículas em pH 4 e em pH 6 permaneceu



inalterado.

O PDI foi reduzido em pH4 e 6 na proporção 2:8, na proporção 8:2 em pH4 o valor de PDI foi reduzido e em pH6 não houve alteração. O potencial zeta das amostras praticamente permaneceu estável. Podemos verificar que na proporção 8:2 em pH 6 não houve alteração do sistema, e em pH 4 houve redução de diâmetro médio e PDI, bem como o potencial zeta permaneceu estável, podemos sugerir que a maior concentração de quitosana ao sistema proporcionou não somente a obtenção de menores tamanhos e distribuição de partículas, mas também pode ter contribuído na estabilidade destas amostras.

Figura 35: Avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta na estabilidade física das partículas de nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) incorporadas ao sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) em pH 4 e 6, após 30 dias de preparo.



Na avaliação da estabilidade da MSZ incorporada ao sistema ternário, observa-se que em pH4 o diâmetro de partículas reduziu consideravelmente na proporção 2:4:4 e aumentou em pH6. Na proporção 8:1:1, para ambos valores de pH, o diâmetro médio das partículas praticamente permaneceu estável. Os valores de PDI aumentaram em pH4 e reduziram em pH6, na proporção 2:4:4, já na proporção 8:1:1, não observou-se diferença nos valores de PDI para os dois pH. O potencial zeta não apresentou diferença significativa na densidade de cargas tanto em pH 4 quanto em pH 6, em ambas as proporções poliméricas.

5.5.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DA MSZ SOLUBILIZADA E AS NANOSSUSPENSÕES NOS SISTEMAS POLIMÉRICOS

Para avaliar a eficiência de associação do fármaco aos sistemas, a MSZ foi preparada nas formas solubilizada e nanossuspensão, e incorporadas aos sistemas poliméricos binário (QS/ALG) e ternário (QS/ALG/HP) conforme descrito no item 4.7.1, os dados estão demonstrados na tabela 10.



Tabela 10: Eficiência de associação da MSZ solubilizada e incorporada aos sistemas poliméricos.

<u>Formulações (QS-ALG-HP-MSZ 0,8mg-ml)</u>	<u>EA%</u>
2:8:0 pH4	30,5
8:2:0 pH4	30,6
8:2:0 pH6	28,3
2:4:4 pH4	29,5
8:1:1 pH4	29,0
8:1:1 pH6	28,4

Os valores obtidos na EA% foram semelhantes tanto para os sistemas binário quanto ternário, em ambos valores de pH e a adição de HPMC não influenciou na EA% da MSZ. Também foi calculada a eficiência de associação da MSZ em nanossuspensão incorporada aos polímeros, as percentagens obtidas estão representadas na tabela 11.

Tabela 11: Eficiência de associação das nanossuspensões de MSZ incorporada aos sistemas poliméricos.

<u>Proporção(QS/ALG/HP)</u>	<u>EA%</u>
2:8:0 pH 4	57,4
2:8:0 pH 6	57,4
8:2:0 pH 4	61,7
8:2:0 pH 6	43,4
2:4:4 pH 4	56,2
2:4:4 pH 6	50,9
8:1:1 pH 4	59,5
8:1:1 pH 6	43,2

Ao avaliarmos as percentagens obtidas na eficiência de associação da MSZ, verificamos que a adição do fármaco na forma de nanossuspensão apresentou quase o dobro dos valores de percentagem comparados ao fármaco disperso molecularmente. Dessa forma, podemos sugerir que a MSZ na forma de nanossuspensão pode aumentar a percentagem na eficiência de associação do fármaco aos sistemas poliméricos.

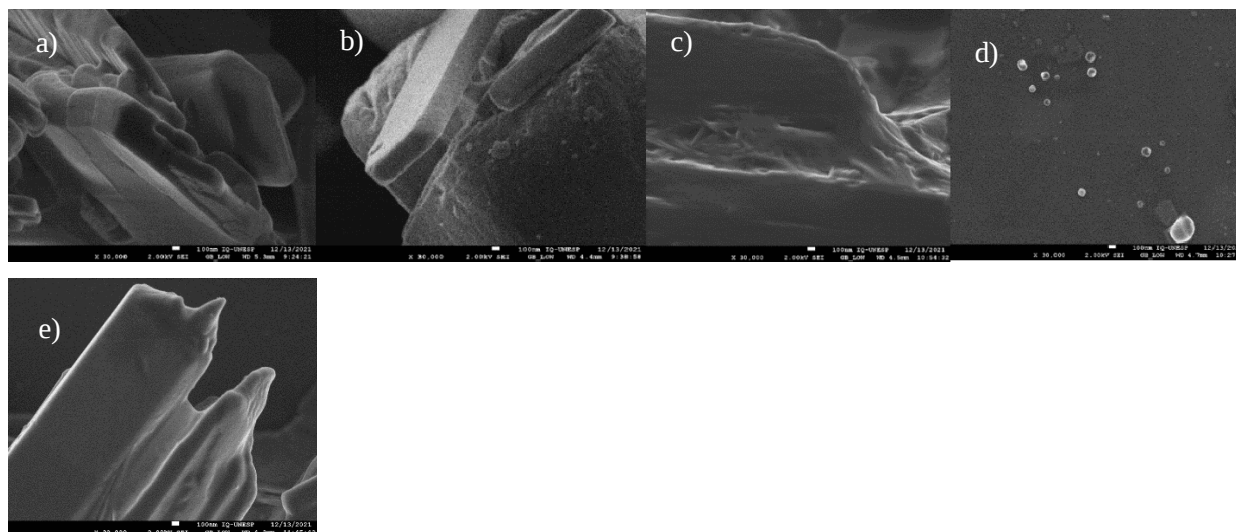
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA MSZ E DOS SISTEMAS POLIMÉRICOS BINÁRIO (QS/ALG) E TERNÁRIO (QS/ALG/HP) POR MEV

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) é uma das técnicas mais utilizadas para analisar características estruturais de materiais sólidos fornecendo imagens em alta



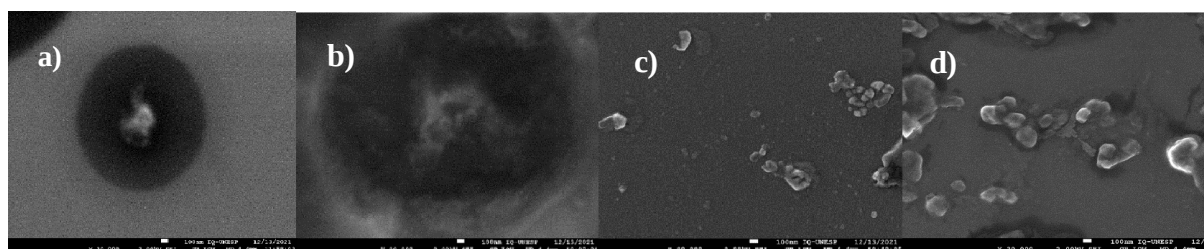
resolução (CARDOSO, 2019). No presente estudo, as fotomicrografias foram analisadas quanto a sua morfologia e estão representadas nas figuras 36 com aumento de 2.000 10.000 e 30.000 vezes.

Figura 36: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) matéria-prima MSZ; (B) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH4; (C) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH6; (D) nanossuspensões de MSZ (5mg/ml) em pH4 (E) nanossuspensões de MSZ (5mg/ml) em pH6.



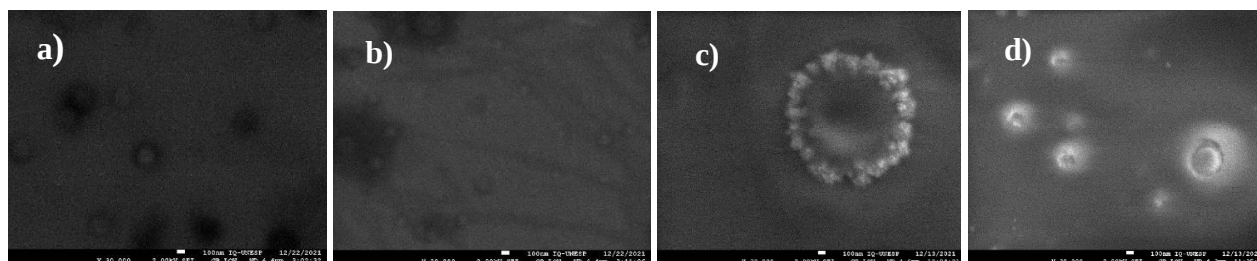
De acordo com as fotomicrografias apresentadas, é possível verificar que o (A) fármaco pó (adquirido comercialmente) possui características com a presença de cristais irregulares. O fármaco em (B) nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4, assume características muito próximas à matéria-prima, já em (C) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH6, as estruturas tomam forma com aspecto irregular. Nas amostras do fármaco em (D) concentração 5mg/ml em pH4, observa-se a presença de estruturas esféricas, o que em (E) pH6, a estrutura apresenta ter a mesma característica da matéria-prima.

Figura 37: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) sistema polimérico binário (QS/ALG) sem o fármaco em pH4 (B) sistema polimérico binário (QS/ALG) sem o fármaco em pH6 (C) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4 (D) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6.



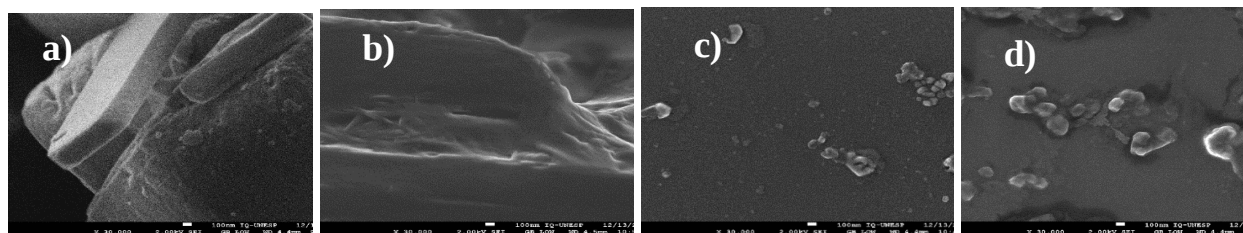
Através da análise microscópica do sistema binário (QS/ALG), podemos observar na fotomicrografia (A) o sistema sem a presença do fármaco em pH4 com formação de uma estrutura irregular, e em (B) o sistema sem o fármaco em pH6, apresenta uma estrutura semelhante de massa irregular. Em (C) a adição do fármaco ao sistema em pH4, demonstrou presença de algumas estruturas esféricas, podendo ser melhor visualizadas em (D) no pH6.

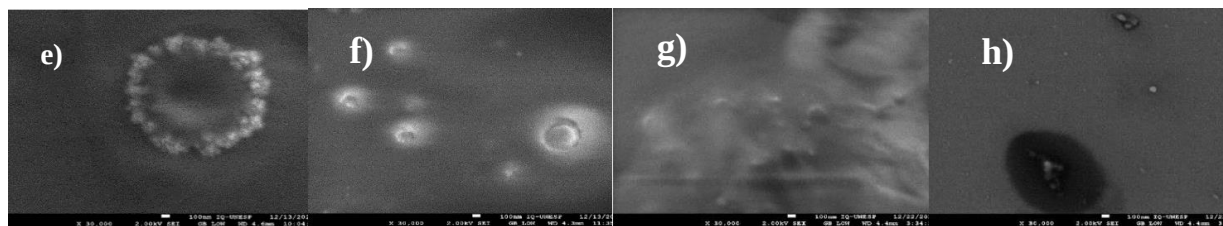
Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) sem o fármaco em pH4; (B) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) sem o fármaco em pH6; (C) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (D) sistema polimérico ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6.



Seguindo os estudos com o sistema ternário (QS/ALG/HP), observamos que tanto em pH4 (A) quanto em pH6 (B), as amostras evidenciam presença de estruturas esféricas. Com a adição do fármaco ao sistema em (C) (D) em ambos valores de pH houve formação de pontos luminescentes aos redor das partículas, sugere-se que tal fenômeno pode ser atribuído à presença de HPMC no sistema, assim mais estudos são necessários para entender esses achados.

Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) com aumento de 30.000x: (A) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH4; (B) nanossuspensões de MSZ (1,66mg/ml) em pH6; (C) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (D) sistema polimérico binário (QS/ALG) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6; (E) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH4; (F) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) em pH6; (G) sistema binário (QS/ALG) com o fármaco solubilizado (0,8mg/ml) em pH4; (H) sistema ternário (QS/ALG/HP) com o fármaco solubilizado em pH4.





Analisando o conjunto de dados, verificamos que o (A) fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) quando incorporado ao sistema binário (QS/ALG) em pH4 (C), adquiriu estrutura de partículas esféricas, bem como em pH6 (D), a estrutura irregular do fármaco (B) em nanossuspensão (1,66mg/ml) quando incorporada ao sistema adquiriu uma forma esférica das partículas. No sistema ternário, a adição do fármaco em nanossuspensão (1,66mg/ml) ao sistema (E) (F), provocou alteração na estrutura das partículas, que apresentaram-se esféricas com pontos luminescentes ao redor da partícula, em ambos valores de pH. Na adição do fármaco solubilizado (0,8mg/ml) (G) ao sistema binário em pH4, verificou-se presença de uma massa com alguns pontos esféricos que pode ser o fármaco e em (H) no sistema ternário em pH4, apresentou uma forma esférica com um ponto central irregular.



6. CONCLUSÃO

A mesalazina é um antiinflamatório eficaz no tratamento da retocolite ulcerativa leve a moderada, no entanto, sua posologia requer altas doses diárias em sua administração, o que compromete a adesão do paciente ao tratamento e consequentemente sua qualidade de vida. No presente estudo, nanopartículas poliméricas foram racionalmente delineadas para uma liberação cólon específica da mesalazina a partir de sua administração por via oral.

Para obtenção das nanopartículas poliméricas, foram selecionados polímeros com propriedades mucoadesivas, visando agregar a vantagem de permanência do fármaco por mais tempo no local da inflamação. Para tanto, foram selecionados os polímeros: quitosana (polication), alginato e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (poliânions) para compor sistemas desenvolvidos pela técnica de complexação polieletrólítica, sendo QS/ALG (sistema binário) e QS/ALG/HP (sistema ternário). Foram determinados o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas, caracterizando propriedades favoráveis à homogeneidade e estabilidade dos sistemas. O fármaco foi incorporado aos sistemas em sua forma solubilizada, na concentração próxima a saturação e em nanossuspensões, com intuito de promover um aumento na eficiência de associação. As nanossuspensões foram obtidas pela técnica de Bottom-up, através da precipitação ácido base em pH4 e 6. A eficiência de associação da MSZ em nanossuspensão foi o dobro (61%) da observada quando o fármaco estava solubilizado em uma concentração próxima à saturação. Dessa forma, a utilização de nanossuspensões pode ser uma ferramenta promissora para aumentar a eficiência de associação de fármacos como a MSZ.



7. **REFERÊNCIAS**

ARAUJO, V.H.S; et al. Chitosan-based systems aimed at local application for vaginal infections. **Carbohydrate Polymers** v. 261, 117919, 2021.

AULTON, M, E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª. Ed. Porto alegre: Artmed, 2005. p.231-347.

AVADI, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**.v. 6, n.1, p.53-63, 2010. DOI: [10.1016/j.nano.2009.04.007](https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007).

BANSIL, R; TURNER, B.S. The biology of mucus: composition, syntesis and organization. **Advanced drug delivery reviews**. v.124, p.3-15, 2018.

BARANI, M; et al. Nanotechnology for inflammatory bowel disease management: detection, imaging and treatment. **Sensing and bio-sensing research** v. 32, 100417, 2021.

BONI, F.I. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de MTX**. 150f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de ciências farmacêuticas, Araraquara, 2017.

BRASIL, Ministério da saúde. Portaria SAS/MS nº861, de 04 de novembro 2002. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas-Retocolite ulcerativa. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 de novembro 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Específica (RE) 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

CARDOSO, V.M.O. **Sistemas mucoadesivos de gelana/amido retrogradado destinados à liberação colônica do Bevacizumabe para o tratamento do câncer de colorretal**. 2019. 229f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de ciências farmacêuticas. Araraquara 2019.

CARDOSO, V.M.O; et al. Design of mucoadhesive gellan gum and chitosan nanoparticles intended for colon-specific delivery of peptide drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 628, 27321, 2021.



CARDOSO, V.M.C; et al. Rational design of nanocarriers based on gellan gum/retrograded starch exploiting polyelectrolyte complexation and ionic cross-linking processes: A potential technological platform for oral delivery of bevacizumab. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** v. 66, 102765, 2021.

CARVALHO, F.C; BRUSCH, M.L; EVANGELISTA, R.C; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J, pharm, sci**, v.46, n.1, São Paulo, jan/mar 2010. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000100002>.

CHEN et al. A facile nanoaggregation strategy for oral delivery of hydrofobic drugs by utilizing acid-base neutralization reactions. **Nanotechnology**, v. 19, p. 1-7, 2008.

DI FILIPPO, L.D; et al. A Critical Review of Biological Properties, Delivery Systems and Analytical/Bioanalytical Methods for Determination of Bevacizumab. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 51, n. 5, p. 445–453, 2021.

DOROFEYEV, A.E; VASILENKO, I.V; et al. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gastroenterology, research and practice**, v. 2013, 43123, p.1-9, 2013.

DRAGET, K.I; TAYLOR, C. Propriedades físico-químicas e biológicas dos alginatos e implicações biomédicas. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 251-256, 2009.

ENSIGN, L.M; CONE, R; HANES, J. Administração oral de medicamentos com nanopartículas poliméricas: barreiras do muco gastrointestinal. **Adv. Drug Del. Rev.** v. 64, p.557-570, maio, 2012.

FERREIRA, A.O. **Guia prático de farmácia magistral**. 3ª edição. São Paulo. Pharmabooks, 2008.

FERREIRA; N.N; LN PEDREIRO; MPD GREMIÃO. Desenvolvimento de hidrogéis pH responsivos como potenciais sistemas de liberação para administração de bevacizumabe. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 2, FM 10, 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os alginatos e suas múltiplas aplicações. n.26, p. 34-38, 2013.

GEORGE M, ABRAHAM TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. **J Control Release**. v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017. Epub 2006 May 22. PMID: 16828914.

GÓMEZ-GUILLEN, M.C; et al. Enhancement of oral bioavailability of natural compounds and probiotics by mucoadhesive tailored biopolymer-based nanoparticles: A review. **Food hydrocolloids**. v.118, 106772, 2021.

GREMIÃO, M. P. D. **Sistemas de Liberação de Fármacos**, 2012, 180 f. Tese (Livre-docente). – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara.



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.

HUCKABY, J.T; et al. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus. **Advanced drug delivery reviews**. v.124, p.125-139, 15 de janeiro 2018.

HUSSAIN, N; et al. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced drug delivery reviews**. v.50, p.107-142, 2001.

IACUCCI, M; SILVA, S; GHOSH, S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: A trendy topic once again? **Can journal gastroenterology**, v. 24, n. 2, p.127-133, 2010. doi: 10.1155/2010/586092.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KONUR, O. Os principais clássicos de citação em alginatos para biomedicina. Polissacarídeo de algas marinhas. Isolamento, aplicações biológicas e biomédicas. Elsevier, 2017. cap.12, p. 223-249.

LACERDA, G.J.S. **Micropartículas de quitosana como sistema de liberação colônica de Mesalazina no tratamento da doença inflamatória intestinal**. 81 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas- MG/2018.

LIU, Z; et al. Polyssaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v.60, n.15, p.1650-1662, Dec 2008.

LOPES, C.M; et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, v.41, n.2, p. 143-154, 2005.

MAKHLOF, A; TOSUKA, Y; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **Eur. J.Pharm Sci**. v.42, n.5, p.445-51, 2011).

MAKHLOF, A; et al. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. **Journal of controlled release: oficial jornal of the controlled release Society**, v.149, n.1, p.81-88, Jan 2011b.

MARTINI, E; et al. The epithelial barrier and its relationship mucosal immunity in inflammatory bowel disease. **Celular and molecular gastroenterology and hepatology**. v. 4, n.1, p. 33-46, 2017.

MAURSTAD, G; et al. Interpenetração da camada de polieletrólito e dilatação das multicamadas de alginato-quitosana estudados por microscopia de contraste e interferência de reflexão de comprimentos de onda duplo. **Carbohydrate Polymers**. v.1, edição 4, p.672-681, março 2008.

MENEGUIN, A.B; et al. Cellulose nanofibers improve the performance of retrograded starch/pectin microparticles for colon-specific delivery of 5-asa. **Pharmaceutics** v. 13, n. 9, 1515,



2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13091515.

MENEZES, et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.7, p.1309-1316, jul, 2013.

NETSOMBOON, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm.**v. 98, p. 76-89. 2016. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.003. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26598207.

PEDREIRO, L.N; et al. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolyte complexes as potential carrier to improve Zidovudine permeability. **Journal of nanoscience and nanotechnology**. v.16, n.2, p.1248-1256, 2016.

PEDREIRO, L.N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2015. 149 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2016.

PRATA, W.M. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas**. 127 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte- MG, 2011.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information; 2004-. Resumo do composto PUBCHEM para CID 4075, Mesalamina;[citado em 9 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mesalamine>.

RANG, H.P; DALE, M.M; et al. **Farmacologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 395.

REIS, C.P; et al. Nanoencapsulation I methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**. v.2, p.8-21, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.

REMBACKEN, B.J; SNELLING, A.M; et al. Non-pathogenic Escherichia Coli versus Mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. **Lancet**, v.354, n. 9179, p. 635-639, 1999. doi: 10.1016/s0140-6736(98)06343-0.

ROBUSTI, L.M. **Nanopartículas de mesalazina com propriedades mucoadesivas incorporadas em micropartículas para a liberação colônica**. Tese (Doutorado em Nanotecnologia Farmacêutica) Faculdade de Ciências farmacêuticas, Unesp, 2021.

SAEEDI, T; ALOTAIBI, H.B; PROCOPOVICH. Polymer colloids as drug delivery systems for the treatment of arthritis. **Advances in colloid and interface Science**, v. 285, 102273, 2020.

SANTOS, A.M, et al. Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. **International Journal of pharmaceuticals**, v.524, p. 330-338, 2017.



- SANTOS, A.M; et al. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 334, p. 353–366, 2021.
- SALAZAR,M.J.C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, São Paulo, 2015.
- SARMENTO, B; et al. Alginante/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**, v.24, n.12, p. 2198-2206, 2007.
- SATO, C.M. **Avaliação e comparação da qualidade de comprimidos revestidos de MSZ dispensados na farmácia escola da UFSC**. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Farmacia) Universidade Federal de Santa Catarina em Farmácia, 2015.
- SCHAFFAZICK, S.R; et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v26, p. 726-737,2003.
- SIMÕES. M.L.P.B, et al. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais. **Rev. Bras. Coloproct**, v.23, n.3, p.172-182, jul/set 2003.
- TALAEI, F et al. Overcoming therapeutic obstacles in inflammatory bowel diseases: A comprehensive review on novel drug delivery strategies. **European jornal of pharmaceutical sciences**, v.49, p.712-722, ed.4, 2013.
- TEIXEIRA, F.V et al. Infliximab: first line therapy in severe ulcerative colitis. Preliminay report. **Revista brasileira coloproctologia**, v.28, n.3, p.289-293, 2008.
- TRAVIS, S. P. L. et al. Review article: defining remission in ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 2, p. 113– 24, 2011.
- VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.
- VISCIDO, A; CAPANNOLO, A; LATELLA, G; CAPRILLI, R; FRIEFL, G. Nanotechnology in the treatment inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn´s and colitis**, v.8, p. 903-918, 2014.
- WANI, T.U; PANDITH, A.H; SHEIKN, F.A. Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles. **Journal of drug delivery science and technology**, v.65, 102730, 2021.
- WU, Y; et al. Mucoadhesive improvement of alginate microspheres as potential gastroretentive delivery carrier by blending with Bletilla Striata polyssaccharide. **International journal of biological macromolecules**. v.156, p.1191-1201, 2020.
- YAMAGUCHI. A; KOBAYASHI. M; ADACHI.Y. Yield stress of mixed suspension of silica particles and lysozymes . The effect of zeta potential and absorbed amount. **Colloids and surfaces**;



physicochemical and engineering aspects, v.578, 123575, 2019.

YANG, W; et al. The potential roles of natural plant polysaccharides in inflammatory bowel disease: a review. **Carbohydrate polymers**, v.277, 118821, 2022.

YILMAZ, M. T. et al. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, p. 166–178, 2019.

ZHANG, L.; LI, D.; GAO, P. Expulsion of selenium/protein nanoparticles through vesicle-like structures by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic environment. **World J Microbiol Biotechnol**, v.28, p. 3381–3386, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1150-y>.

