UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

MARIA FERNANDA ORTOLANI POLLINI

MICROPARTÍCULAS EROs-RESPONSIVAS COM *TARGETING* PARA MACRÓFAGOS ATIVADOS E LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE MESALAZINA COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Araraquara

2025

MARIA FERNANDA ORTOLANI POLLINI

MICROPARTÍCULAS EROs-RESPONSIVAS COM *TARGETING* PARA MACRÓFAGOS ATIVADOS E LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE MESALAZINA COMO POTENCIAL ESTRATÉGIA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Dissertação apresentada à Unidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Fármacia

Área de concentração: Pesquisa e desenvolvimento de fármacos e medicamentos

Orientador: Profª Drª Andréia Bagliotti Meneguin

Araraquara

2025

Pollini, Maria Fernanda Ortolani.
P774m Micropartículas EROs-responsivas com *targeting* para macrófagos ativados e liberação cólon-específica de mesalazina como potencial estratégia para tratamento da doença inflamatória intestinal / Maria Fernanda Ortolani Pollini. – Araraquara, 2025.
128 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Andréia Bagliotti Meneguin.

1. 5-ASA. 2. Cólon-especificidade. 3. Amido retrogradado. 4. Pectina. 5. Sulfato de dextrana. 6. Ácido 1,4-fenilenodiborônico. 7. Átomos. 8. Macrófagos – Ativação. I. Meneguin, Andréia Bagliotti, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Micropartículas EROs-responsivas com targeting para macrófagos ativados e liberação cólon-específica de mesalazina como potencial estratégia para tratamento da doença inflamatória intestinal

AUTORA: MARIA FERNANDA ORTOLANI POLLINI
ORIENTADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

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

Profa. Dra. ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN (Participaçao Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Prof. Dr. MARCOS LUCIANO BRUSCHI (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmácia / Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá

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

Araraquara, 14 de novembro de 2025.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou diariamente meu caminho, me acompanhou durante toda a minha trajetória e me fez capaz de superar muitos obstáculos e obter diversas vitórias.

Aos meus pais, Daniele e Silvio Fernando, que me deram todo suporte necessário, me fortaleceram em todas as minhas tomadas de decisão e acreditaram que eu seria capaz de superar todos os desafios existentes.

Ao meu namorado, Rafael, pela força, paciência e companheirismo.

À Profª Drª Andréia Bagliotti Meneguin, um ser humano incrível e que foi muito mais que uma orientadora, agradeço por ter confiado em mim para a realização deste trabalho e por ter dado o maior suporte durante todo o projeto, estando sempre presente. Sou extremamente grata por todos seus ensinamentos transmitidos com muita humanidade, paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, pela colaboração com o uso do Laboratório de Cultivo Celular e por toda a ajuda prestada para a realização de alguns experimentos.

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

A todos os amigos do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, pela convivência e por toda a ajuda prestada para a realização de diversos experimentos deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr-UNESP) pela oportunidade de estudo e pelo ensino de qualidade e profissionalismo transmitido.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo 2023/15205-9.

RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma patologia crônica inflamatória que acomete o trato gastrointestinal (TGI). O fármaco de primeira linha utilizado na terapia é o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA). Sua rápida absorção nas primeiras porções do TGI e chegada em baixas concentrações no cólon requer a administração de altas dosagens, o que ocasiona diversos efeitos colaterais. Dessa forma, tem-se o desenvolvimento de outras terapias para vetorização da liberação do 5-ASA para a região colônica, como sistemas de liberação orais cólon-específicos (SLOCs) baseados em polissacarídeos naturais, como amido retrogradado (AR) e pectina (P). Além disso, a mucosa gastrintestinal de pacientes com DII possui elevada concentração de macrófagos ativados, os quais superexpressam receptores *scavenger* do tipo classe-A (SR-A) em sua superfície. Isso possibilita a vetorização de carreadores poliméricos para a região inflamada por meio da incorporação de sulfato de dextrana (SD), um ligante específico desses receptores. Somado a isso, uma estratégia promissora para a liberação do fármaco nas áreas inflamadas com excessiva presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) consiste no design de micropartículas (MPs) EROs-responsivas, que podem ser desenvolvidas através da reticulação com ácido 1,4-fenilenodiborônico (AFD), um reticulante químico sensível às EROs. Por fim, a fim de minimizar a solubilidade em meio gástrico e melhorar a cólon-especificidade, as MPs podem ser revestidas com alginato de sódio (ALG), um polissacarídeo amplamente utilizado para sistemas de liberação prolongada de fármacos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver MPs cólon-específicas contendo 5-ASA, baseadas em blendas de AR/P/SD e revestidas com ALG, obtidas por dupla reticulação (Al^{3+} e AFD) e com tripla responsividade, além de avaliar as propriedades físicas, químicas, estruturais, morfológicas e de performance dos sistemas desenvolvidos. O método de geleificação ionotrópica possibilitou a formação de MPs esféricas com superfície rugosa, analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG). Os valores de eficiência de encapsulação (EE%) variaram entre 19% e 76%, sendo influenciado pela concentração de 5-ASA adicionada, tempo e tipo de reticulação. O ensaio de mucoadesão *ex vivo* indicou que os sistemas desenvolvidos apresentam mucoadesão sítio-específica, tendo 0% de adesão em mucosa gástrica e 100% em mucosa colônica. Somado a isso, foi revelada a atividade antioxidante de 80% nas MPs que possuíam AFD em sua composição. Os espectros de FTIR sugeriram a efetividade do processo de reticulação química por meio de bandas características, enquanto que os termogramas de análise térmica (DSC e TG) evidenciaram que esse mesmo processo promoveu maior estabilidade térmica ao sistema . Os ensaios de liberação *in vitro* revelaram baixa liberação de 5-ASA no ambiente gástrico (27 a 37% após 120 min), enquanto a maior parte foi liberada no meio colônico (78% após 300 min), com aceleração das taxas de liberação na presença de enzimas colônicas, o que corrobora a cólon-especificidade do sistema e proteção da mucosa gástrica promovida pelo ALG. O ensaio de erosão das MPs frente à EROs revelou que as MPs, quando expostas ao meio colônico contendo H_2O_2 apresentaram taxas de biodegradabilidade de até 80% e maior liberação do fármaco, confirmando a EROs-responsividade. A viabilidade celular em monocamadas de células Caco-2 revelou que as amostras não são citotóxicas, uma vez que apresentaram taxas de viabilidade superiores à 70%. O ensaio de permeabilidade intestinal *in vitro* realizado na mesma linhagem celular indicou taxas de permeabilidade até 38%, possibilitando um efeito preferencialmente localizado. Já os estudos de captação celular em macrófagos RAW 264.7 confirmaram o direcionamento ativo mediado pelo SD aos receptores SR-A1 pela fluorescência observada, reforçando a seletividade para regiões inflamadas. Os resultados obtidos sugerem o potencial das MPs duplamente reticuladas e revestidas com ALG como alternativa inovadora para o tratamento mais efetivo das DII´s e com menor incidência de efeitos colaterais.

Palavras-chave: 5-ASA; cólon-especificidade; amido retrogradado; pectina; sulfato de dextrana; ácido 1,4-fenilenodiborônico; micropartículas.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder that affects the gastrointestinal tract (GIT). The first-line drug used in therapy is 5-aminosalicylic acid (5-ASA). Its rapid absorption in the upper portions of the GIT and arrival at low concentrations in the colon require the administration of high doses, which lead to several side effects. Therefore, alternative therapies have been developed to vectorize the release of 5-ASA to the colonic region, such as colon-specific oral delivery systems (CSODS) based on natural polysaccharides, including retrograded starch (RS) and pectin (P). Furthermore, the gastrointestinal mucosa of IBD patients contains a high concentration of activated macrophages, which overexpress class A scavenger receptors (SR-A) on their surface. This enables the targeting of polymeric carriers to the inflamed region through the incorporation of dextran sulfate (DS), a specific ligand of these receptors. In addition, a promising strategy for drug release in inflamed areas with excessive levels of reactive oxygen species (ROS) consists of the design of ROS-responsive microparticles (MPs), which were developed through crosslinking with 1,4-phenylenediboronic acid (PDBA), a ROS-sensitive chemical crosslinker. Finally, in order to minimize solubility in the gastric environment and improve colon-specificity, the MPs were coated with sodium alginate (ALG), a polysaccharide widely used in sustained-release drug delivery systems. Thus, the objective of this study was to develop colon-specific MPs containing 5-ASA, based on RS/P/DS blends and coated with ALG, obtained by dual crosslinking (Al3+ and PDBA) with triple responsiveness, and to evaluate the physical, chemical, structural, morphological, and performance properties of the developed systems. The preparation method enabled the formation of spherical MPs with a rough surface, as observed by field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM). Encapsulation efficiency (EE%) values ranged from 19% to 76%, being influenced by the amount of 5-ASA added, as well as the type and duration of crosslinking. The ex vivo mucoadhesion assay indicated that the developed systems exhibit site-specific mucoadhesion, showing 0% adhesion to gastric mucosa and 100% adhesion to colonic mucosa. In addition, MPs containing PDBA in their composition displayed antioxidant activity of 80%. FTIR spectra suggested the effectiveness of the chemical crosslinking process through characteristic bands, whereas thermal analysis thermograms (DSC and TG) demonstrated that this same process promoted greater thermal stability of the system. In vitro release assays revealed low release of 5-ASA in the gastric environment (37% after 120 min), whereas most of the drug was released in the colonic medium (78% after 300 min), with accelerated release rates in the presence of colonic enzymes, confirming the colon-specificity of the system and protection of the gastric mucosa promoted by ALG. Moreover, the erosion assay of MPs in the presence of ROS showed that, when exposed to colonic medium containing H2O2, the MPs presented biodegradability rates of up to 80% and enhanced drug release, confirming ROS-responsiveness. Cell viability in Caco-2 monolayers revealed that the samples are non-cytotoxic, since they exhibited viability rates higher than 70%. The *in vitro* intestinal permeability assay performed on the same cell line indicated permeability of up to 38%, thus ensuring a preferentially localized effect. Cell uptake studies in RAW 264.7 macrophages confirmed DS-mediated active targeting to SR-A1 receptors through observed fluorescence, reinforcing selectivity for inflamed regions. Overall, the results suggest the potential of dual-crosslinked and ALG-coated MPs as an innovative alternative for more effective treatment of IBD with a lower incidence of side effects.

Keywords: 5-ASA; colon-specificity; retrograded starch; pectin; dextran sulfate; 1,4-phenylenediboronic acid; microparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama mundial de prevalência da DII 23
Figura 2. Taxas de incidência de DII, DC e RCU no Brasil a cada 100 mil habitantes (A); Taxas de prevalência de DII, DC e RCU no Brasil a cada 100 mil habitantes (B). 24
Figura 3. Variações da colite ulcerativa 26
Figura 4. Configuração geométrica das espécies ionizáveis do 5-ASA: (I) Espécie catiônica; (II) Espécie zwiteriônica; (III) Espécie aniônica 27
Figura 5. Tipos de micropartículas quanto à estrutura 30
Figura 6. Estrutura linear da amilose e ramificada da amilopectina 32
Figura 7. Esquema ilustrativo dos quatro tipos de amido resistente 33
Figura 8. Modelo “egg-box” ilustrando o mecanismo de geleificação da pectina de baixo grau de metoxilação 35
Figura 9. Estrutura química do SD 36
Figura 10. Representação esquemática da interação entre MPs contendo SD e macrófagos ativados por meio da ligação aos receptores scavenger do tipo classe A, superexpressos em locais inflamados 37
Figura 11. Estrutura química do ALG 38
Figura 12. Estrutura química do AFD 40
Figura 13. Representação esquemática do ensaio ex vivo de mucoadesão por retenção em rampa (Adaptada de Carvalho et al., 2010) 48
Figura 14. Representação esquemática da medição de TEER em inserto Transwell® 52
Figura 15. Representação esquemática do sistema Transwell® com monocamada de células Caco-2, utilizado para avaliação da permeabilidade de MPs 53
Figura 16. Esquema ilustrativo demonstrando o processo de obtenção do amido retrogradado e imagem fotográfica da dispersão de AR a 12,5% (m/v) com pectina de baixo GM na proporção 1:4 56
Figura 17. Representação esquemática do método de geleificação ionotrópica para a formação de MPs 57
Figura 18. Imagem das MPs reticuladas fisicamente (A-F), bem como obtidas por reticulação dupla (reticulação física e química) (G—L), obtidas em Esterioscópio Leica no aumento de 10x, sendo 1F (**A**); 2F (**B**); 1:1F (**C**); 2:1F (**D**); 1:2F (**E**); 2:2F (**F**); 1D (**G**); 2D (**H**); 1:1D (**I**); 2:1D (**J**); 1:2D (**K**); 2:2D **(L**). 63
Figura 19. Representação dos diâmetros Feret mínimo (D2) e Feret Máximo (D1) (Autoria própria, 2025) 65

Figura 20. Fotomicrografia das MPs AR/P/SD reticuladas fisicamente durante 30 minutos, nos aumentos de 15x, 50x e 1000x, sendo **A)** 1:1F e **B)** 2:1F. 66
Figura 21. Fotomicrografia das MPs AR/P/SD reticuladas fisicamente durante 5 minutos, nos aumentos de 100x e 1000x, sendo **A)** 1F; **B)** 2F; **C)** 1:1F; **D)** 1:2F; **E)** 2:1F e **F)** 2:2F. .. 67
Figura 22. Fotomicrografia das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química), nos aumentos de 80x, 100x e 1000x, sendo A: 1D; B: 2D; C: 1:1D; D: 1:2D; E: 2:1D; F: 2:2D. 68
Figura 23. Fotomicrografia de secção transversal das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química) nos aumentos de 200x e 1000x, sendo **A)** 1D; **B)** 2D; **C)** 1:1D; **D)** 1:2D; **E)** 2:1D; e **F)** 2:2D. 69
Figura 24. Espectros FTIR das MPs e de seus componentes isolados. 70
Figura 25. Curvas de DSC das MPs e de seus componentes isolados. 74
Figura 26. Termogramas de TGA das MPs e de seus componentes isolados. 78
Figura 27. Reação do radical DPPH. 82
Figura 28. Atividade antioxidante das MPs baseada na inibição do radical DPPH (%) após 2 h de incubação (média ± desvio padrão, n=3) 83
Figura 29. Porcentagem de mucina adsorvida nas MPs controle (AR/P) com diferentes concentrações de SD e dupla reticulação 85
Figura 30. Imagem fotográfica das amostras gastrointestinal suínas durante ensaio de mucoadesão ex vivo com instilação de FGS, FIS e FCS 87
Figura 31. Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs AR/P com dupla reticulação e contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%), nos meios gástrico pH 1,2 (A), intestinal pH 7,4 (B) e colônico pH 6,8 (C). 90
Figura 32. Perfis de liberação in vitro do 5-ASA em meio gástrico (pH 1,2), a partir de amostras MP 1,0SD/1,0/, sintetizadas de acordo com as estratégias elencadas de A à G. 92
Figura 33. MEV das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química) e revestimento com alginato nos aumentos de 80x, 100x e 1000x, sendo **A:** 1D-A; **B:** 2D-A; **C:** 1:1D-A; **D:** 1:2D-A; **E:** 2:1D-A; **F:** 2:2D-A. 96
Figura 34. Fotomicrografias das MPs AR/P/DS/ALG obtidas por reticulação dupla (reticulação física e química), obtidas em Esterioscópio Leica no aumento de 10x, sendo 1D-A **(A)**; 2D-A **(B)**; 1:1D-A **(C)**; 2:1D-A **(D)**; 1:2D-A **(E)**; 2:2D-A **(F)**. 97
Figura 35. Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs otimizadas e baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) nos meios gástrico pH 1,2 (A), intestinal pH 7,4 (B) e colônico pH 6,8 (C). 98

Figura 36. Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs otimizadas. O perfil foi obtido pelo método de dissolução com troca sequencial de meio diretamente na cuba, utilizando meios gastrintestinais simulados contendo enzimas: meio gástrico (pH 1,2, com pepsina), meio intestinal (pH 7,4, com pancreatina) e meio colônico (pH 6,8, com α-amilase, pectinase e dextranase). 104

Figura 37. Taxa de biodegradabilidade das MPs AR/P com reticulação dupla e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) em FCS (pH 6,8) na ausência (A) e na presença de H_2O_2..... 106

Figura 38. Ilustração esquemática do mecanismo de eliminação de EROs pelo AFD (Adaptado de Zhu et al., 2023). 107

Figura 39. Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) no meio colônico pH 6,8 com adição de 1mM de H_2O_2. 108

Figura 40. Viabilidade das células Caco-2 após tratamento com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA durante 24h a várias concentrações (0,0625 a 1 mg/mL) (média ± desvio padrão, n=3)..... 110

Figura 41. Permeabilidade in vitro do 5-ASA (%) através de monocamadas de células Caco-2 após incubação com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA (média ± desvio padrão, n=3)..... 113

Figura 42. Representação esquemática do método de spray-drying para a formação de MPs (Autoria própria, 2025)..... 115

Figura 43. Fotomicrografia das MPs AR/P/SD obtidas por spray-drying, nos aumentos de 500x e 3500x, sendo **A)** 1:1D; **B)** 2:1D; e **C)** 2D..... 117

Figura 44. Viabilidade das células de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA durante 24h a várias concentrações (0,0625 a 1 mg/mL) (média ± desvio padrão, n=3) 118

Figura 45. Capacidade de direcionamento das MPs 1:1D (A) e 2:1D (B) para as células RAW 264.7, sendo LPS(+) e SD (+); LPS (+) e SD(-); LPS (-) e SD (-). As MPs foram marcadas com corante fluorescente verde..... 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis exploradas para obtenção de MPs de AR/P/SD reticuladas duplamente por reticulação iônica com Al^{3+}, reticulação química com AFD e revestidas com ALG. 44

Tabela 2. Variáveis exploradas para obtenção de MPs controle (sem fármaco) de AR/P/SD reticuladas duplamente por reticulação iônica com Al^{3+}, reticulação química com AFD e revestidas com ALG. 45

Tabela 3. Rendimento do processo (%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD e 5-ASA (0,5 e 1,0%) reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por geleificação ionotrópica (média ± desvio padrão, n =3)..... 57

Tabela 4. Valores do percentual (%) de 5-ASA presente na solução reticulante de $AlCl_3$ após 5 e 30 minutos de reticulação física, bem como presente na solução de lavagem das MPs recuperadas anteriormente à secagem em estufa e após 5 minutos de reticulação com AFD. Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± DP**).**..... 59

Tabela 5. EE(%) do 5-ASA em MPs de AR/P contendo diferentes concentrações de SD e fármaco após processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica (reticulação física das MPs). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão). 61

Tabela 6. EE% do fármaco 5-ASA em MPs AR/P contendo diferentes concentrações de SD e fármaco após processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica (reticulação física) e química das MPs (dupla reticulação). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão)..... 62

Tabela 7. Valores de circularidade e diâmetro de Feret das MPs, obtidos a partir da digitalização das imagens obtidas em Esterioscópio Leica, no aumento de 10x. 64

Tabela 8. Taxa de mucoadesividade (%) das MPs de AR/P/5-ASA/DS, avaliadas em mucosas gástrica, intestinal e colônica através do método da rampa, com instilação dos fluidos gástrico (FGS), intestinal (FIS) e colônico (FCS) simulados, respectivamente, durante 30 minutos.... 86

Tabela 9. Valores de circularidade e diâmetro de Feret das MPs AR/P/SD/ALG obtidas por dupla reticulação. 97

Tabela 10. Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio ácido (pH 1,2) para os diferentes modelos matemáticos aplicados. 100

Tabela 11. Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio intestinal (pH 7,4) para os diferentes modelos matemáticos aplicados... 100

Tabela 12. Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio colônico (pH 6,8) para os diferentes modelos matemáticos aplicados.... 100

Tabela 13. Valores do parâmetro b do modelo cinético de Weibull nas MPs AR/P/SD/AFD revestidas com ALG em pH 1,2, 7,4 e 6,8, respectivamente. 102
Tabela 14. Valores do expoente n obtido através do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas nas MPs AR/P/SD/AFD revestidas com ALG em pH 1,2, 7,4 e 6,8, respectivamente. 103
Tabela 15. Valores de IC_{50} obtidos nas diferentes formulações de MPs após exposição em células Caco-2..... 111
Tabela 16. Valores de TEER inicial e TEER final obtidos nas diferentes formulações de MPs após remoção no compartimento apical 111
Tabela 17. Valores do coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e razão de aumento de absorção (R) das MPs após exposição em células Caco-2 114
Tabela 18. Rendimento do processo (%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por por spray-drying. 116
Tabela 19. EE(%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por spray-drying. 116

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA – Ácido 5-aminossalicílico

AA – Amido com alto teor de amilose

AFD – Ácido 1,4-fenilenodiborônico

$AlCl_3$ – Cloreto de alumínio

ALG – Alginato

AR – Amido retrogradado

DC – Doença de Crohn

DII – Doença inflamatória intestinal

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's modified eagle medium*

DP – Desvio padrão

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DSC – Calorimetria exploratória diferencial, do inglês *differential scanning calorimetry*

EE – Eficência de encapsulação

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FCS – Fluido colônico simulado

FGS – Fluido gástrico simulado

FIS – Fluido intestinal simulado

FITC – Fluoresceína isotiocianato

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*

GE – Grau de esterificação

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HBSS – Solução salina balanceada de Hanks

IC_{50} – Concentração inibitória 50%

LPS – Lipopolissacarídeos

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MPs – Micropartículas

P – Pectina

P_{app} – Coeficiente de permeabilidade aparente

pH – Potencial hidrogeniônico

RCU – Retocolite ulcerativa

SCFAs – Ácidos graxos de cadeia curta, do inglês *short-chain fatty acids*

SD – Sulfato de dextrana

SFB – Soro fetal bovino

SLOCs – Sistemas de liberação orais cólon-específicos

TEER – Resistência elétrica transepitelial, do inglês *transepithelial electrical resistance*

TGA – Análise termogravimétrica, do inglês *thermogravimetric analysis*

TGI – Trato gastrointestinal

TLR – Receptores do tipo Toll, do inglês *Toll-like receptor*

UI – Unidade internacional

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2. REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 Doença Inflamatória Intestinal 22
2.2 Retocolite Ulcerativa 25
2.3 Ácido 5-aminossalicílico 27
2.4 Sistemas de liberação orais cólon-específicos 28
2.5 Sistemas microparticulados 30
2.6 Microencapsulação 31
2.7 Polímeros naturais 31
2.7.1 Amido resistente 31
2.7.2 Pectina 34
2.7.3 Sulfato de dextrana 35
2.7.4 Alginato de sódio 37
2.7.5 Ácido 1,4-fenilenodiborônico 39
3. OBJETIVO GERAL 41
3.1 Objetivos específicos 41
4. MATERIAL E MÉTODOS 42
4.1 Material 42
4.2 Principais equipamentos 43
4.3 Retrogradação do amido em associação à pectina 43
4.4 Microencapsulação do 5-ASA por geleificação ionotrópica 43
4.4.1 Otimização do tempo de reticulação iônica 44
4.5 Reticulação química das micropartículas 44
4.6 Revestimento das micropartículas com alginato de sódio 44
4.7 Rendimento do processo 45
4.8 Eficiência de encapsulação 45
4.9 Análise de tamanho, forma e morfologia das micropartículas 46
4.9.1 Análise de tamanho e forma 46
4.9.2 Microscopia eletrônica de varredura 46
4.10 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier 46
4.11 Calorimetria exploratória diferencial 46
4.12 Análise termogravimétrica 46
4.13 Determinação da atividade antioxidante ou antirradicalar 47

4.14 Análise das propriedades mucoadesivas 47
4.14.1 Análise *in vitro* da interação com mucina 47
4.14.2 Ensaio *ex vivo* de mucoadesão por retenção em rampa 48
4.15 Estudos de performance 49
4.15.1 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA 49
4.15.1.1 Estratégias aplicadas para otimização do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA 49
4.15.2 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA em presença de conteúdo enzimático 50
4.15.3 Avaliação da responsividade da liberação *in vitro* do 5-ASA à presença de EROs 50
4.15.4 Ensaio de erosão das micropartículas frente à presença de EROs 50
4.16 Cultura celular de Caco-2 51
4.16.1 Viabilidade celular 51
4.16.2 Medida da resistência elétrica transepitelial 51
4.16.3 Permeabilidade do 5-ASA em monocamadas de células Caco-2 52
4.17 Obtenção das micropartículas pela ténica de *spray-drying* 53
4.18 Cultura celular de macrófagos RAW 264.7 54
4.18.1 Viabilidade celular 54
4.18.2 Habilidade de vetorização para macrófagos ativados 54
4.19 Análise estatística 55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
5.1 Retrogradação do amido em associação à pectina 56
5.2 Microencapsulação do 5-ASA por geleificação ionotrópica e rendimento do processo 56
5.2.1 Otimização do tempo de reticulação 57
5.3 Avaliação da eficiência de encapsulação após reticulação física e dupla reticulação das micropartículas 60
5.4 Análise de tamanho, forma e morfologia das micropartículas 62
5.4.1 Análise de tamanho e forma 63
5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura 65
5.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier 70
5.6 Calorimetria exploratória diferencial 73
5.7 Análise termogravimétrica 75

5.8 Determinação da atividade antioxidante ou antirradicalar 81
5.9 Estudo das propriedades mucoadesivas 83
5.9.1 Análise *in vitro* da interação com mucina 84
5.9.2 Ensaio *ex vivo* de mucoadesão por retenção em rampa 85
5.10 Estudos de performance 88
5.10.1 Otimização da formulação através do ensaio de liberação *in vitro* do 5-ASA 88
5.10.2 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA a partir de micropartículas otimizadas 98
5.10.3 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA em presença de conteúdo enzimático 103
5.10.4 Avaliação da responsividade da erosão das MPs e da liberação *in vitro* do 5-ASA à presença de EROs 105
5.11 Ensaios celulares em células Caco-2 108
5.11.1 Viabilidade celular 108
5.11.2 Medida da resistência elétrica transepitelial 111
5.11.3 Permeabilidade do 5-ASA em monocamadas de células Caco-2 112
5.12 Obtenção de micropartículas pela técnica de *spray-drying* 115
5.13 Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas pela técnica de *spray-drying* 116
5.13 Ensaios celulares em células de macrófagos RAW 264.7 117
5.13.1 Viabilidade celular 117
5.13.2 Habilidade de vetorização para macrófagos ativados 118
6. CONCLUSÕES 122
REFERÊNCIAS 124

1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma patologia de etiologia desconhecida caracterizada por inflamação crônica do trato gastrointestinal (TGI), cujas principais variedades são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), podendo acometer indivíduos de todas as faixas etárias, com maior incidência em jovens (Lautenschläger *et al.*, 2014). De acordo com Li et al. (2018), a DII apresenta maior prevalência em regiões desenvolvidas, como América do Norte e Estados Unidos; porém, apesar de apresentar baixas taxas de mortalidade, diminui significativamente a qualidade de vida de pacientes doentes e pode evoluir para quadros de câncer colorretal.

A DII se desenvolve através de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, como por exemplo histórico familiar, tabagismo, processos infecciosos, dieta, e uso de contraceptivos orais (Lautenschläger *et al.*, 2014). Por sua vez, o começo da patologia, bem como sua gravidade e curso, são modulados por fatores como alterações genéticas e desequilíbrio homeostático da barreira intestinal, apoptose, imunidade e transdução de sinal (Khor; Gardet; Xavier, 2011).

Enquanto a RCU consiste em uma inflamação limitada à região periapendicular do cólon, a DC envolve qualquer parte do TGI, mas é mais frequente na região perianal ou no íleo terminal, além de ser mais recorrente em casos de complicações, como abscessos, estenoses e fístulas. Essas diferenças fazem com que os sintomas manifestados em pacientes com RCU fiquem mais restritos ao cólon e ao reto, enquanto em casos de DC, os pacientes podem ter sintomas que envolvam todo o TGI, ou seja, da boca ao ânus (Khor; Gardet; Xavier, 2011).

Já em situações de DII em que a integridade da barreira epitelial da mucosa é afetada, os tratamentos atualmente utilizados têm como objetivo induzir a remissão e evitar que a doença progrida. A administração de medicamentos ainda continua sendo a primeira escolha para o tratamento de DII (Zhu *et al.*, 2023). Sendo assim, os medicamentos utilizados podem ser administrados por diversas vias, como a via oral (comprimidos, cápsulas e *pellets* com revestimento entérico), parenteral (injeções intravenosas e subcutâneas) e retal (enemas, espumas e supositórios). Dentre os fármacos utilizados, os aminossalicilatos (mesalazina, olsalazina e sulfassalazina) são o tratamento de primeira linha em casos de DII leve a moderada, além do uso de corticosteróides (dexametasona, hidrocortisona e prednisona), tiopurinas, inibidores de calcineurina e anticorpos anti-TNF-α, quando a DII se encontra de moderada a grave, estágio da doença no qual os pacientes não respondem mais ao tratamento de primeira linha (Kotla *et al.*, 2019).

O fármaco de primeira linha considerado seguro, eficaz e utilizado no manejo farmacoterapêutico de DII de leve a moderada é anti-inflamatório ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), também conhecido como mesalazina (Williams *et al.*, 2011). Apesar de não possuir um mecanismo de ação totalmente elucidado foi demonstrado que os efeitos imunossupressores, anti-inflamatórios e antioxidantes do 5-ASA ocorrem devido à fatores como inibição de prostaglandinas e síntese de citocinas pró-inflamatórias, eliminação de radicais livres, proteção da função da barreira epitelial celular e supressão da via do fator nuclear kappa B (Sardo *et al.*, 2019). Porém, sua rápida absorção nas primeiras porções do TGI, juntamente com a necessidade de altas dosagens desse fármaco para a eficácia do tratamento, promovem diversos efeitos colaterais e adversos. Somado a tais inconvenientes, as concentrações de 5-ASA que atingem o órgão mais acometido, o cólon, são muito reduzidas, o que tem sido considerado um dos principais fatores responsáveis pela baixa eficácia do tratamento. Dessa forma, pode ser vista a importância do desenvolvimento de outras terapias que otimizem o efeito terapêutico através de uma ação tópica com a consequente redução dos efeitos colaterais, como por exemplo os sistemas farmacêuticos que vetorizam a liberação de 5-ASA para a região colônica, conhecidos como sistemas de liberação orais cólon-específicos (SLOCs) ou colônicos (Sardo *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2023).

A liberação de fármacos no cólon oferece vantagens terapêuticas e tecnológicas, já que o cólon possui condições mais amenas que as demais seções do TGI, como pH mais próximo da neutralidade, atividade proteolítica reduzida e maior tempo de trânsito, fatores que oferecem proteção à estabilidade do fármaco, maior tempo de contato com a mucosa intestinal, além de vantagens terapêuticas às patologias que se beneficiam de tratamento localizado, com dosagens menores e efeitos colaterais diminuídos (Meneguin *et al.*, 2014).

Os polissacarídeos naturais são considerados uma estratégia promissora para o desenvolvimento de SLOCs ativados pela microbiota colônica. Dentre algumas das vantagens desses sistemas estão a biodegradabilidade, atoxicidade, obtenção de fontes naturais, baixo custo, capacidade de geleificação, estabilidade no estômago, possibilidade de modificação estrutural para aumento de especificidade e degradabilidade específica por enzimas provenientes de bactérias anaeróbicas colônicas (polissacaridases) (Kotla et al., 2019).

O amido retrogradado (AR), um amido modificado que pode ser obtido pela combinação dos processos de gelatinização e retrogradação, apresenta a habilidade de escapar da digestão nas porções superiores do TGI, sendo degradado seletivamente por enzimas secretadas pela microbiota colônica, razão pela qual tem sido utilizado com sucesso na construção de diferentes SLOCs, como comprimidos matriciais (Cristina et al., 2017), filmes de revestimento (Meneguin

et al., 2014, 2017), micropartículas revestidas (Meneguin et al., 2018), micropartículas obtidas por atomização (Meneguin et al., 2024), nanopartículas-em-micropartículas (Martins et al., 2021), entre outros.

Além do AR, a pectina (P) é um polissacarídeo não amiláceo, solúvel em água e extraído da parede de células vegetais que também é utilizado como excipiente para SLOCs, uma vez que se mantém na forma de agregados moleculares intactos na porção superior do TGI, sendo degradada por enzimas pectinolíticas residentes no cólon humano e possui propriedades favoráveis de mucoadesão, dissolução em pH alcalino e capacidade de formação de gel (Meneguin et al., 2014; Cristina et al., 2017; Dev; Bali; Pathak, 2011). Quando a P é associada ao AR, devido às suas propriedades geleificante e estabilizante, observa-se a formação de um material com propriedades formadoras de filme (Meneguin et al., 2014) e de micropartículas (MPs) apropriadas e promissoras para a obtenção de SLOCs. Além disso, quando adicionada na retrogradação do amido, a P é capaz de favorecer o processo de retrogradação, uma vez que eleva o teor de AR de 65,8% para 96,6% (Meneguin et al., 2014; Liu et al., 2003).

O alginato de sódio (ALG) é outro polissacarídeo amplamente utilizado como revestimento de SLOCs. Além de possuir baixa toxicidade e hidrofilicidade, o ALG posui a propriedade única de formação de géis estáveis, e somado a isso, apresenta baixa solubilidade em meio ácido (Dias *et al.*, 2017). Essa propriedade faz com que esse composto impeça a liberação prematura de fármaco em ambiente gástrico e promova liberação majoritária do mesmo em meio colônico, órgão-alvo da doença. Sendo assim, o ALG se torna um ótimo constituinte de revestimento em sistemas de liberação controlada destinados ao cólon (Yong; Mooney, 2012).

Complementando a sítio-especificidade para o cólon, a excessiva presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) na área inflamada pode ser explorada como outra importante estratégia de *targeting* ativo para o órgão-alvo. Isso porque as EROs, principalmente representadas pelos radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1O_2$), por possuírem um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa, são moléculas altamente instáveis e de elevada reatividade (Zhu et al., 2023). A capacidade antioxidante do sistema biológico de pacientes com DII é reduzida e tal desequilíbrio entre a formação e detoxificação das EROs ocasiona o estresse oxidativo, uma reação em cadeia que pode levar à morte celular, desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, além de danos ao DNA e RNA (Andréa et al., 2015).

Nesse contexto, estudos recentes apontam como alternativa viável de tratamento da DII a associação de anti-inflamatórios com antioxidantes de qualquer natureza, tendo os últimos um

papel essencial na eliminação excessiva de EROs da área inflamada (Andréa et al., 2015). Neste projeto, utilizou-se o ácido 1,4-fenilenodiborônico (AFD), um reticulante químico com atividade antioxidante para desenvolvimento de MPs EROs-responsivas, ou seja, que se desestruturam e liberam a carga de fármaco em resposta à presença de EROs (Zhu et al., 2023). Tal responsividade é atribuída à capacidade do AFD interagir com as EROs através das ligações carbono-boro e pelas ligações covalentes entre o AFD e hidroxilas (Hoang; Smith; Raines, 2017; Zhao et al., 2019). Dessa forma, quando as MPs reticuladas com AFD alcançam ambientes contendo EROs, as ligações carbono-boro são quebradas e formam-se ligações boro-oxigênio. Posteriormente, o borato é hidrolisado e o grupo fenol sofre um rearranjo, tendo como produtos a hidroquinona, cadeias poliméricas livres e ácido borônico. Por fim, o fármaco é liberado do interior das MPs com destino direcionado ao cólon (Iturmendi; Monkowius; Teasdale, 2017; Shen et al., 2021).

Outra importante abordagem tecnológica para o tratamento da DII é o *targeting* de carreadores poliméricos para macrófagos ativados, abundantes na mucosa gastrintestinal de pacientes portadores de DII e reconhecidos como produtores de citocinas pró-inflamatórias (como Il-1, IL-6 e TNF) e EROs. Consequentemente, os macrófagos ativados tornam-se candidatos ideais para vetorização de 5-ASA para áreas inflamadas na terapia da DII (Hashizume; Mihara, 2012). O sulfato de dextrana (SD) é um ligante específico dos receptores *scavenger* do tipo classe A1 (*SR-A1*, também conhecido como CD204) que são superexpressos na superfície de macrófagos ativados em regiões inflamadas. Trata-se de um polissacarídeo hidrofílico aniônico, atóxico, biodegradável e biocompatível, produzido naturalmente por bactérias *Leuconostoc mesenteroides* a partir de ácido lático. Além disso, SD apresenta propriedades antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes destinada ao tratamento de diversas patologias (Hashizume; Mihara, 2012; Ramasundaram *et al.*, 2023).

Em face ao exposto, é de nosso entendimento que o desenvolvimento de MPs baseadas em blendas de AR/P/SD, reticuladas física e quimicamente com Al^{+3} e AFD, respectivamente, e revestidas com ALG, promoveria o aumento de especificidade da liberação do 5-ASA para a região colônica. Esse projeto apresenta como inovação o aumento de especificidade pela área colônica inflamada através de um mecanismo quádruplo de responsividade ainda não reportado na literatura, representado pela i) digestibilidade seletiva do AR/P por enzimas provenientes de bactérias colônicas, ii) liberação pH-dependente promovida pelo ALG, iii) afinidade do SD por receptores *SR-A1* superexpressos em macrófagos ativados e iv) propriedades responsivas do AFD pelas EROs, resultando em um tratamento localizado de maior efetividade aos portadores de DII com reduzida incidência de efeitos colaterais e adversos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença Inflamatória Intestinal

Os primeiros casos de DII emergiram em meados do século XX, nas primeiras regiões industrializadas da América do Norte, Europa e Oceania. Posteriormente, no século XXI, os casos continuam a aumentar constantemente nessas regiões e a DII começa a crescer em regiões emergentes, como América Latina, África e Ásia (Hracs *et al.*, 2025). De acordo com as evidências, fatores ambientais relacionados à ocidentalização da sociedade, como aumento do tabagismo, dieta ocidental e melhores condições de higiene, implicaram em alterações das respostas imunológicas da mucosa à microbiota intestinal em indivíduos com predisposição genética, contribuindo ao desenvolvimento da doença (Hracs *et al.*, 2025; Lautenschläger *et al.*, 2014).

Segundo Solitano *et al.* (2025), estima-se que atualmente cerca de 7 milhões de pessoas no mundo vivam com a DII, um crescente desafio global de saúde e cuja prevalência vem aumentando constantemente a cada ano tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A DII é uma patologia de etiologia desconhecida caracterizada por inflamação crônica do TGI, cujas principais variedades são a DC e a RCU, podendo acometer indivíduos de todas as faixas etárias, com maior incidência em jovens (Lautenschläger *et al.*, 2014).

Como pode ser observado na Figura 1, em um estudo realizado pela *International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease*, foi feito um levantamento mundial sobre a prevalência da DII no período de 1920 a 2024 e através dele as regiões do mundo foram classificadas em quatro estágios epidemiológicos diferentes, sendo:

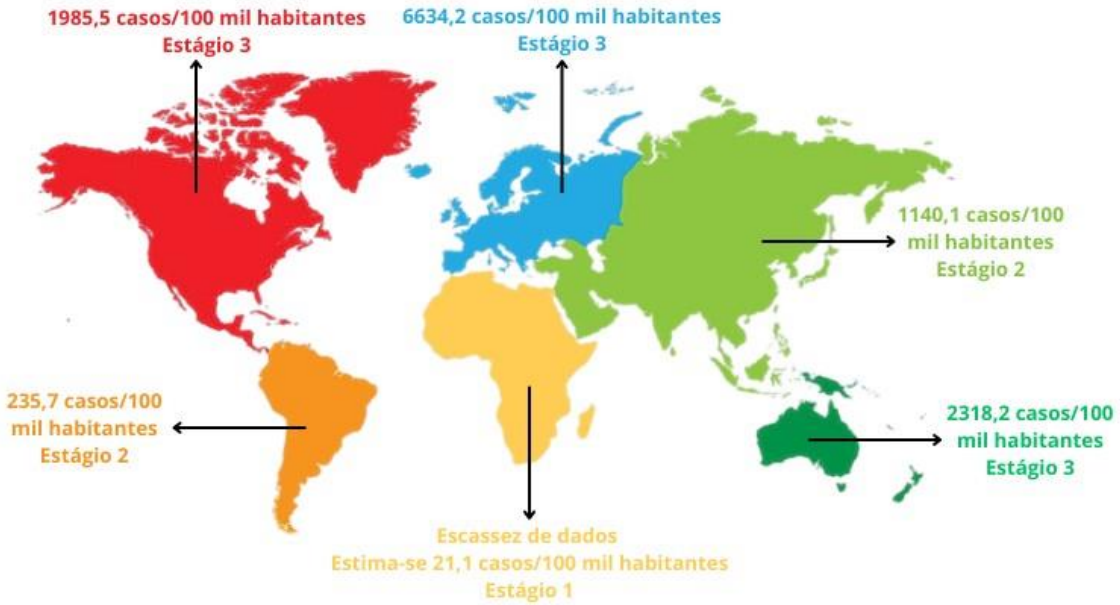
Estágio 1 – Emergência: casos esporádicos e subnotificados;

Estágio 2 – Aceleração da incidência: crescimento rápido de novos casos;

Estágio 3 – Prevalência em crescimento: incidência estabilizada mas aumento crescente da prevalência devido a maior sobrevida dos pacientes;

Estágio 4 – Equilíbrio da prevalência: prevalência estabilizada à medida que a mortalidade aproxima-se da incidência.

Figura 1 - Panorama mundial de prevalência da DII

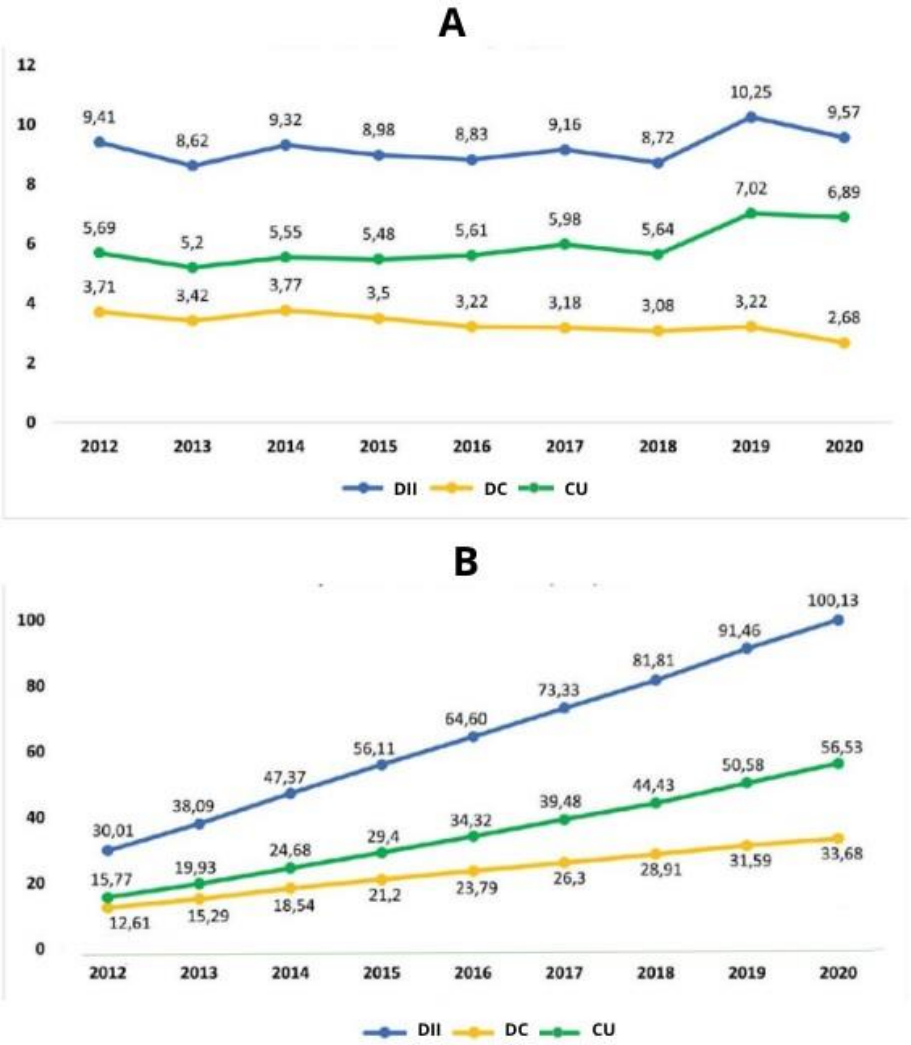


Fonte: Adaptado de IOIBD Global IBD Visualization of Epidemiology Studies in the 21st Century (GIVES-21) (2025)

Através da Figura 1, é possível observar o aumento significativo da prevalência da DII na América do Norte, Europa e Oceania, representando que uma alta parcela da população deve conviver com a doença nos próximos anos. Já na América do Sul, verifica-se um aumento da incidência, principalmente nas áreas urbanas, o que ocorre principalmente devido à ocidentalização da dieta e fatores ambientais. Por fim, apesar da escassez de dados do continente africano, este é caracterizado por baixa incidência e prevalência da doença, uma vez que os casos são esporádicos e subnotificados. Somado a isso, é possível ainda observar através dessa mesma figura que nenhuma região mundial atingiu o estágio IV da doença.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Coloproctologia, em um período de nove anos no Brasil, a prevalência da DII aumentou em 15%, atingindo 100 casos para cada 100 mil habitantes, cuja maior concentração ocorre nas regiões sul e sudeste do país, principalmente devido à ocidentalização dos hábitos. Já a incidência da doença, também apresentou um leve aumento de 0,8%, passando de 9,4 por 100 mil habitantes em 2012 para 9,6 por 100 mil habitantes em 2020. Os dados acima estão relatados na Figura 2.

Figura 2 - Taxas de incidência de DII, DC e RCU no Brasil a cada 100 mil habitantes (A); Taxas de prevalência de DII, DC e RCU no Brasil a cada 100 mil habitantes (B)



Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Coloproctologia (2024) (Acesso em: https://sbcp.org.br/medico/maio-roxo-estudo-aponta-que-prevalencia-de-doencas-inflamatorias-intestinais-no-brasil-aumentou-15-ao-ano-em-9-anos/)

Apesar de apresentar baixas taxas de mortalidade, a DII diminui significativamente a qualidade de vida dos pacientes, requerem altos custos médicos, causam perda de produtividade e, se diagnosticada tardiamente ou não tratada, pode evoluir para quadros de câncer colorretal. Por isso, destaca-se a importância do diagnóstico precoce e tratamento adequado (Li *et al.*, 2021; Solitano *et al.*, 2025)

Dentre as variações da doença, a RCU consiste em uma inflamação limitada à região periapendicular do cólon, enquanto a DC envolve qualquer parte do TGI, sendo mais frequente na região perianal ou no íleo terminal, além de ser mais recorrente em casos de complicações,

como abscessos, estenoses e fístulas. Essas diferenças fazem com que os sintomas manifestados em pacientes com RCU fiquem mais restritos ao cólon e ao reto, enquanto em casos de DC os pacientes podem ter sintomas que envolvam todo o TGI, ou seja, da boca ao ânus (Khor; Gardet; Xavier, 2011).

2.2. Retocolite Ulcerativa

A RCU é uma variante crônica da DII localizada na região do cólon e reto e que afeta cerca de 5 milhões de pessoas em todo o mundo, além da incidência da doença estar em constante aumento nos países em desenvolvimento (Berre; Honap; Peyrin-Biroulet, 2023). Nos países desenvolvidos, a incidência da RCU se estabilizou, diferentemente da prevalência, a qual aumentou drasticamente. Já nos países industrializados, apesar da baixa prevalência, vem sendo observado um aumento dos novos casos, devido à ocidentalização de hábitos e padrões alimentares, levando a mudanças na microbiota intestinal e imunidade adaptativa (Du, 2020).

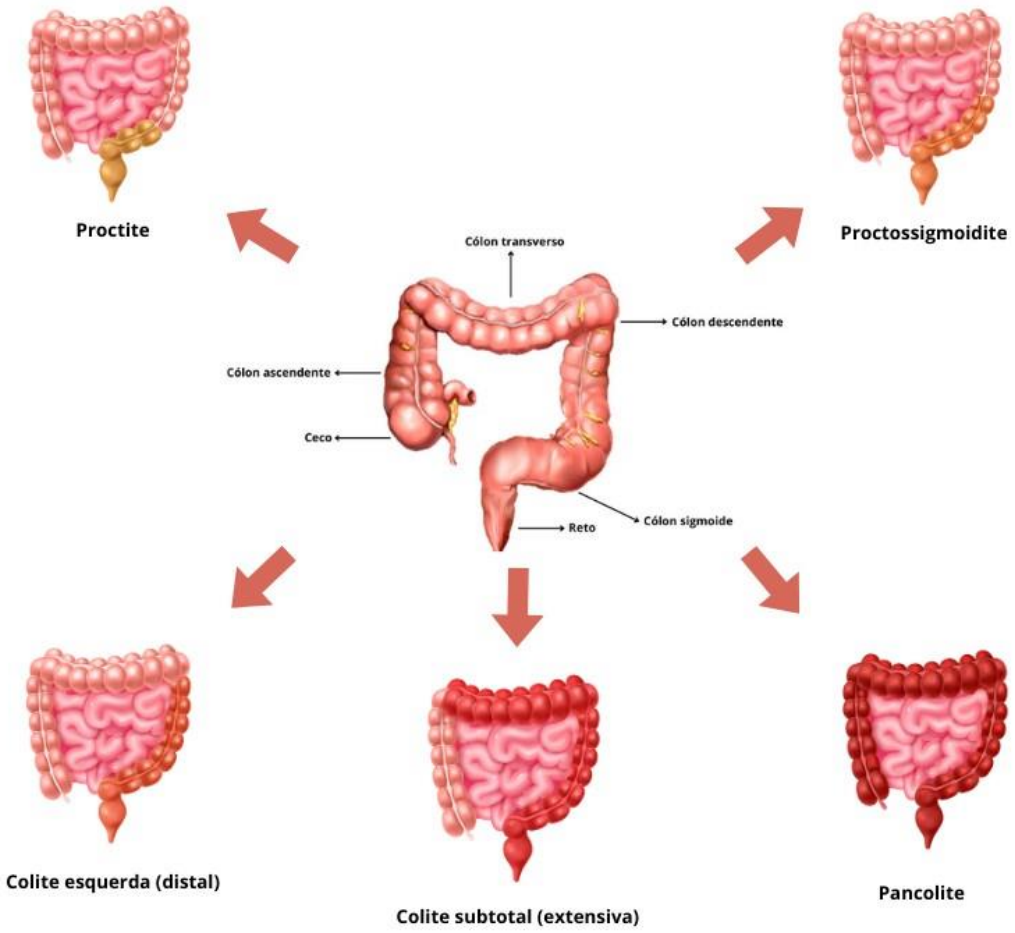
A fisiopatologia da RCU não é completamente elucidada, mas sabe-se que a doença ocorre após exposições ambientais em pessoas que apresentem predisposição genética, como por exemplo defeitos na barreira epitelial, disbiose e resposta imune desregulada (Berre; Honap; Peyrin-Biroulet, 2023). Em casos de portadores de RCU, a barreira intestinal se rompe e as células caliciformes responsáveis por secretar mucina, uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunológico intestinal, são extremamente reduzidas ou até inexistentes (Post *et al.*, 2019). Somado a isso, a ausência de bactérias comensais produtoras de butirato dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* também é uma característica de pacientes com RCU, já que o butirato é uma importante fonte de energia para as células do cólon e possui atividades antimicrobiana e antinflamatória (Berre; Honap; Peyrin-Biroulet, 2023; Schulthess *et al.*, 2019).

Além disso, a resposta imune encontra-se extremamente prejudicada na RCU. No cólon inflamado, ocorre uma excessiva presença de células dendríticas maduras, as quais desencadeiam alta expressão de receptores *Toll-like* (TLR) e ativação de fatores de transcrição, como o fator de transcrição NF-kB, levando a cascatas inflamatórias que resultam na alta produção de citocinas pró-inflamatórias e redução da produção de células T-reguladoras (Du, 2020).

Os sintomas da RCU incluem diarreia sanguinolenta na maior parte dos pacientes, além de dor abdominal, secreção de muco, tenesmo e urgência para evacuar. O diagnóstico é realizado através de exames clínicos, biológicos, endoscópicos e histológicos (Berre; Honap; Peyrin-Biroulet, 2023). Geralmente, os sintomas estão correlacionados à gravidade da doença na mucosa colônica e à extensão da doença na região do cólon.

Quando a RCU é limitada ao reto, geralmente é mais leve e é denominada proctite, sendo que seus sintomas consistem em sangramento retal, urgência para evacuar e tenesmo. Por outro lado, quando a inflamação ocorre do reto até a parte inferior do cólon sigmoide é chamada de proctossigmoidite e os sintomas são semelhantes à proctite, porém acompanhados de maior frequência de evacuações e dor abdominal. Já a colite esquerda (ou distal) é caracterizada por inflamação no reto, cólon sigmoide e descendente até a flexura esplênica, cujos sintomas incluem diarreia sanguinolenta e dor abdominal do lado esquerdo. Nos casos em que a colite ultrapassa a colite esquerda, mas não envolve todo o cólon, denomina-se por colite extensiva ou subtotal. Por fim, quando a inflamação atinge todo o cólon (do reto ao ceco) e os sintomas são mais graves, como diarreia sanguinolenta, fortes dores abdominais, tenesmo, febre e perda de peso, o tipo de colite é denominado pancolite. Nesse último caso, como a doença está em estágios mais graves, existe maior risco de complicações, como megacólon tóxico e até evolução para câncer colorretal (Lamb *et al.*, 2019; Segal, 2021).

Figura 3 - Variações da colite ulcerativa



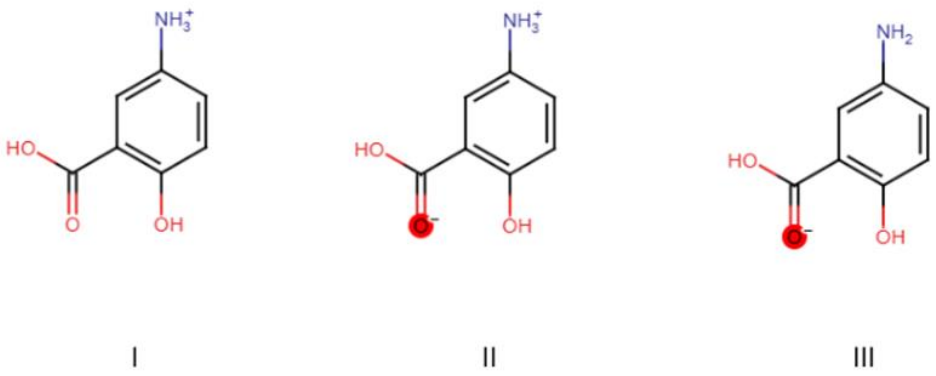
Fonte: Autoria própria (2025)

2.3. Ácido 5-aminossalicílico (5-ASA)

O objetivo do tratamento farmacológico para a RCU consiste em induzir uma resposta rápida, manter a remissão clínica e atingir normalização nos exames endoscópicos, a fim de prevenir que a doença progrida até gerar incapacidade (Berre; Honap; Peyrin-Biroulet, 2023). O fármaco de primeira linha considerado seguro, eficaz e utilizado no manejo farmacoterapêutico de DII de leve a moderada é o anti-inflamatório 5-ASA, também conhecido como mesalazina ou ácido 5-aminosalicílico (Williams *et al.*, 2011). A administração por via oral em comprimidos é a forma farmacêutica convencional, mas a administração via retal, através de enemas e supositórios também existe, porém são menos aceitáveis e podem reduzir a adesão ao tratamento (Gomes *et al.*, 2020).

O 5-ASA é um fármaco com baixa solubilidade aquosa, solúvel em etanol e cuja estabilidade em solução depende de fatores como pH, temperatura e exposição à luz. Além disso, esse fármaco possui dois valores distintos de pKa, sendo um pKa 2,3, o qual está associado ao grupamento carboxílico e outro pKa 5,69, associado ao grupo amina da molécula (Figura 4). Por isso, quando o 5-ASA se encontra em valores de pH < 2,3 o grupo amina está protonado e o fármaco é considerado catiônico (Fig. 4I); em pH > 5,69 o grupamento carboxílico está carregado negativamente, fazendo com que o 5-ASA esteja em sua forma aniônica (Fig. 4III); por fim, em valores de pH entre 2,3 e 5,69 coexistem cargas positivas e negativas, o que faz com que a carga do sistema seja nula e a molécula esteja em sua forma zwiteriônica (Fig. 4II). Dessa maneira, o 5-ASA estará majoritariamente positivo quando o pH estiver abaixo de 2,3 e negativo quando o pH estiver acima de 5,8 (Nojavan et al., 2012).

Figura 4 - Configuração geométrica das espécies ionizáveis do 5-ASA: (I) Espécie catiônica; (II) Espécie zwiteriônica; (III) Espécie aniônica



Fonte: Autoria própria (2025)

Apesar de não possuir um mecanismo de ação totalmente elucidado foi demonstrado que os efeitos imunossupressores, antinflamatórios e antioxidantes do 5-ASA ocorrem devido à fatores como inibição de prostaglandinas e síntese de citocinas pró-inflamatórias; eliminação de radicais livres, moléculas em evidência nessa patologia; proteção da função da barreira epitelial celular com ação bem evidente na mucosa intestinal; e supressão da via do fator nuclear kappa B, o qual é responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Gomes *et al.*, 2020; Sardo *et al.*, 2019). Porém, sua rápida e praticamente completa absorção nas primeiras porções do TGI, juntamente com a necessidade de altas dosagens desse fármaco para a eficácia do tratamento, promovem diversos efeitos colaterais e adversos. Somado a tais inconvenientes, as concentrações de 5-ASA que atingem o órgão mais acometido, o cólon, são muito reduzidas, o que tem sido considerado um dos principais fatores responsáveis pela baixa eficácia do tratamento (Colombel, 2018; Nakagawa *et al.*, 2018).

Dessa forma, pode ser vista a importância do desenvolvimento de outras terapias que otimizem o efeito terapêutico através de uma ação tópica com a consequente redução dos efeitos colaterais, como por exemplo os sistemas farmacêuticos que vetorizam a liberação de 5-ASA para a região colônica, conhecidos como SLOCs (Sardo et al., 2019; Zhu et al., 2023).

2.4. Sistemas de liberação orais cólon-específicos (SLOCs)

A liberação de fármacos no cólon oferece vantagens terapêuticas e tecnológicas, já que o cólon possui condições mais amenas que as demais seções do TGI, como pH mais próximo da neutralidade, atividade proteolítica reduzida e maior tempo de trânsito, fatores que oferecem proteção à estabilidade do fármaco, maior tempo de contato com a mucosa intestinal, além de vantagens terapêuticas às patologias que se beneficiam de tratamento localizado, com dosagens menores e efeitos colaterais diminuídos (Meneguin *et al.*, 2024). Diferentes abordagens tecnológicas têm sido desenvolvidas para alcançar a porção distal do TGI, sendo as mais reportadas o desenvolvimento de sistemas pH e/ou tempo-dependentes, síntese de pró-fármacos, e aqueles degradados pela microbiota colônica (Souto *et al.*, 2008).

Os SLOCs são considerados uma estratégia de administração cólon-específica utilizada para reduzir a exposição do fármaco às porções superiores do TGI, como trato digestivo superior e intestino delgado, garantindo que o fármaco atinja o cólon em sua forma intacta (Gong *et al.*, 2024). Além disso, esses sistemas são desenvolvidos com o intuito de otimizar as características físico-químicas, farmacológicas e toxicológicas de um fármaco que apresenta limitações quando está em formas farmacêuticas tradicionais, como é o caso do 5-ASA. Dessa

forma, o fármaco é incorporado ou revestido com polímeros, formando complexos que visam a liberação controlada (Gomes *et al.*, 2020).

Os sistemas de liberação tempo-dependentes são delineados com polímeros que possuem solubilidade dependente do tempo, isto é, o fármaco é liberado após um período de latência específico, baseado no tempo de trânsito previsto para que o sistema atinja o cólon. De maneira semelhante, a utilização de polímeros com solubilidade dependente do pH explora o gradiente de pH encontrado ao longo do TGI, promovendo a liberação em meios com pH colônico. Contudo, as variações de tempo de trânsito verificadas entre os indivíduos e o qual se encontra principalmente acelerado em quadros diarreicos de portadores de DII, juntamente com a variação dos valores de pH induzidas pela alimentação, uso de medicamentos, bem como presença de doenças, tornam tais estratégias passíveis de falha de performance. Dessa forma, a atividade enzimática específica do ambiente colônico é considerada a alternativa mais confiável para o desenvolvimento de SLOCs e deve ser explorada com mais detalhes. Isso porque a microbiota colônica abundante (10^{12} UFC/mL contra menos de 10^{2} UFC/mL no estômago devido à acidez) implica em aumento da atividade enzimática, fato este que proporciona os mais favoráveis resultados para os SLOCs ativados pela microbiota (Kotla *et al.*, 2019; Souto *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos naturais são considerados uma estratégia promissora para o desenvolvimento de SLOCs ativados pela microbiota colônica. Dentre algumas das vantagens desses sistemas estão a biodegradabilidade, atoxicidade, obtenção de fontes naturais, baixo custo, capacidade de geleificação, estabilidade no estômago, possibilidade de modificação estrutural para aumento de especificidade e degradabilidade específica por enzimas provenientes de bactérias anaeróbicas colônicas (polissacaridases) (Kotla *et al.*, 2019).

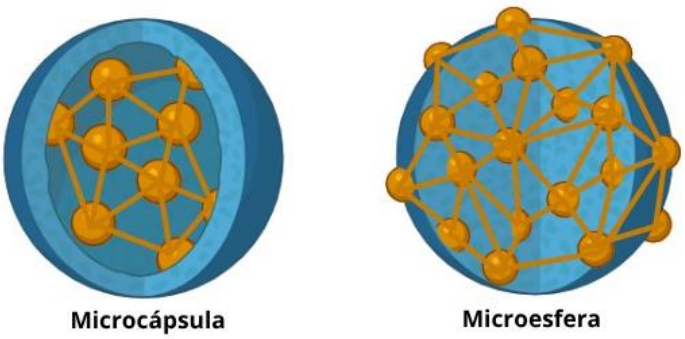
Outra vantagem extremamente importante que torna os SLOCs baseados em polissacarídeos uma ótima estratégia para tratamento de DII é o fato de que esses sistemas podem também agir como prebióticos às bactérias do cólon, já que os polissacarídeos não digeridos no TGI são degradados pela microbiota colônica e originam monossacarídeos usados pela comunidade bacteriana como fonte de energia. Tal propriedade é particularmente importante aos pacientes portadores de DII os quais possuem disbiose, condição clínica marcada pelo desequilíbrio da microbiota, *i.e.*, o número de bactérias patogênicas é maior do que o número de bactérias benéficas (Sinha; Kumria, 2003). Sendo assim, a implementação de estratégias como modificações físicas, químicas e enzimáticas, além da obtenção de blendas poliméricas, vêm sendo exploradas. Um exemplo é o uso de sistemas microparticulados, os quais apresentam vantagens em comparação aos sistemas convencionais, como tamanho

reduzido, maior área superficial, controle e prolongamento da liberação do fármaco, pontos muito relevantes que auxiliam na melhora da resposta terapêutica, redução de efeitos adversos e toxicidade (Rafiee; Rasool, 2022).

2.5. Sistemas microparticulados

O termo "micropartícula" refere-se a uma partícula cujo diâmetro se encontra entre 1 e 1000 μm. O tipo mais comum de MPs são as poliméricas, construídas na maior parte das vezes por polímeros naturais biodegradáveis. Dentro da categoria de MPs, estão as microesferas e microcápsulas (Fig. 5), sendo que a primeira terminologia é utilizada quando não há uma estrutura que separe o núcleo do revestimento e o fármaco se encontra distribuído de maneira uniforme por toda a matriz polimérica. Diferentemente, as microcápsulas apresentam núcleo circundado por outro material e o fármaco é revestido por um polímero presente na membrana da cápsula (Rafiee; Rasool, 2022; Singh *et al.*, 2010).

Figura 5 - Tipos de micropartículas quanto à estrutura



Fonte: Autoria própria (2025)

O uso de sistemas microparticulados em SLOCs é uma ferramenta digna de destaque, já que apresenta muitas características inovadoras e benéficas ao tratamento localizado. Quando comparado aos sistemas convencionais, oferece inúmeras vantagens, como maior proteção do fármaco encapsulado contra degradação, absorção mais regular e diminuição da irritação da mucosa devido a melhor distribuição das MPs ao longo do TGI; perfis de liberação do fármaco mais controlados e desejados que atendem às necessidades terapêuticas do paciente; melhora da biodisponibilidade do fármaco; e direcionamento do fármaco para um sítio específico (Meyer-D; David; Auvergne, 2022; Singh *et al.*, 2010).

Apesar das numerosas vantagens associadas aos sistemas microparticulados, sua produção ainda apresenta desafios significativos. Entre eles, destacam-se o custo mais elevado decorrente tanto dos materiais empregados quanto das técnicas de preparo, além de menor reprodutibilidade entre lotes. Ademais, esses sistemas exigem um controle rigoroso de variáveis como temperatura, pH, adição de solventes e intensidade de agitação, fatores que podem comprometer diretamente a estabilidade da formulação. Diante disso, o desenvolvimento de MPs demanda cuidados técnicos mais criteriosos e um tempo de processamento superior quando comparado a outras formas farmacêuticas (Karnvar *et al.*, 2021).

2.6. Microencapsulação

A microencapsulação é um processo que vem sendo amplamente utilizado por diversos setores nos últimos anos, já que é uma técnica que objetiva reduzir os efeitos externos sobre os ativos encapsulados, conferindo proteção contra agentes como umidade, luz, oxigênio e calor. Além de atuar como uma barreira física, essa técnica contribui para o mascaramento de sabor, aumento da estabilidade e biodisponibilidade, bem como o controle das taxas de liberação (Meyer-D; David; Auvergne, 2022; Singh *et al.*, 2010; Wong; Al-Salami; Dass, 2018).

Para alcançar essas propriedades, diversos métodos de obtenção de MPs poliméricas podem ser aplicados, com destaque para a polimerização interfacial, revestimento em leito fluidizado, *spray-drying*, separação de fases e gelatinização ionotrópica (Lam; Gambari, 2014).

O método de geleificação ionotrópica é altamente utilizado para obtenção de nanopartículas e MPs poliméricas solúveis em água, uma vez que se trata de um método simples e pode ser realizado em condições reacionais brandas, como a ausência do uso de solventes orgânicos e altas temperaturas (Russo *et al.*, 2023). Esse método se baseia na interação eletrostática entre duas espécies iônicas, ou seja, polieletrólitos (polissacarídeos, por exemplo) que reagem com íons de cargas opostas, resultando na formação de MPs com redes tridimensionais interconectadas (Froelich *et al.*, 2023).

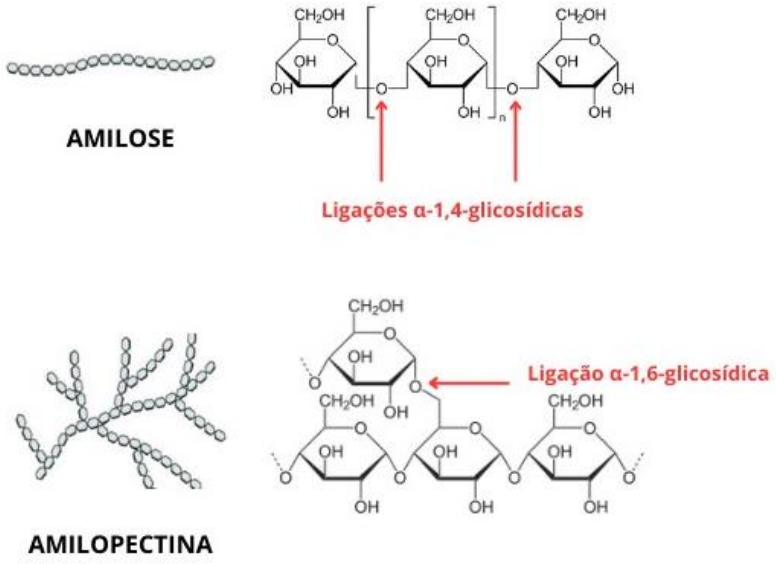
Atualmente, os polímeros naturais vêm sendo cada vez mais utilizados no processo de obtenção de MPs por essa técnica, devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade dos mesmos. Dentre os polímeros mais utilizados, podem ser citados o amido (Mar *et al.*, 2023; Perez; Francois, 2016), a pectina (Abitbol *et al.*, 2021; Lascol *et al.*, 2018), o alginato (Muthumari *et al.*, 2023; Patel *et al.*, 2017), a quitosana (Russo *et al.*, 2023; Sacco *et al.*, 2021) e a goma gelana (Froelich *et al.*, 2023).

2.7. Polímeros naturais

2.7.1. Amido resistente

O amido é um polissacarídeo semi-cristalino em formato de grânulos com tamanho entre 1 e 100 μm de diâmetro, sintetizado em diversos tecidos vegetais e composto por subunidades de glicose, sendo elas amilose e amilopectina (Fig. 6), as quais variam com base no tipo de polimerização (Tester; Karkalas; Qi, 2004). A amilose tem uma estrutura linear onde resíduos de D-glicose ligam-se por ligações α-1,4-glicosídicas, em contraste à amilopectina, que é uma molécula extremamente ramificada e muito maior que a amilose e contém ligações α-1,6-glicosídicas. Além disso, enquanto cada cadeia de amilose contém entre 200 e 700 resíduos de glicose, o grau de polimerização da cadeia de amilopectina varia de 9600 a 15.900 unidades de glicose (Wang *et al.*, 2023).

Figura 6. Estrutura linear da amilose e ramificada da amilopectina



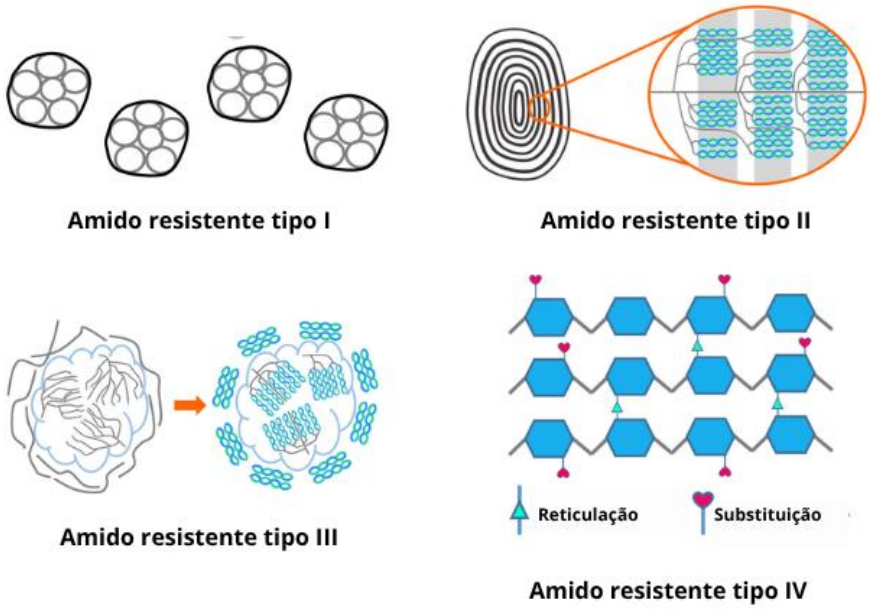
Fonte: Autoria própria (2025)

Em humanos, o amido digerível é hidrolisado por α-amilases salivares e pancreáticas, que hidrolisam as ligações α-1,4-glicosídicas. Por sua vez, a fração do amido somado aos seus produtos da degradação que não são digeridos no intestino delgado de indivíduos saudáveis e atingem o cólon de maneira intacta é chamada de amido resistente (Htoon *et al.*, 2009). A resistência do mesmo depende de várias características físico-químicas e classifica o amido resistente em 4 grupos principais.

O amido resistente tipo I corresponde ao amido presente em estruturas não digeríveis, fisicamente inacessível pelas enzimas digestivas devido à presença da parede celular vegetal qua envolve os grânulos (Fig. 7). Já o amido resistente tipo II possui estrutura cristalina compacta no interior de grânulos de amido intactos, como ocorre naturalmente na banana verde.

Por outro lado, o amido resistente tipo III, também conhecido por amido retrogradado, é aquele obtido pelo processo de gelatinização e retrogradação, em que há a reorganização forçada da amilose e da amilopectina em novas estruturas cristalinas. Por fim, o amido resistente tipo IV consiste no amido quimicamente modificado, como por reticulação ou substituição química de maneira a torná-lo mais resistente (Dobranowski, 2021; Htoon *et al.*, 2010).

Figura 7. Esquema ilustrativo dos quatro tipos de amido resistente



Fonte: Adaptado de Shen; Li (2022)

O amido retrogradado (AR), também denominado amido resistente do tipo III (AR-3), é a forma de amido resistente mais frequentemente utilizada na construção de novos sistemas de liberação de fármacos e é um amido modificado obtido pela combinação dos processos de gelatinização e retrogradação (Dobranowski, 2021). Apresenta alta estabilidade térmica e baixa solubilidade em água, além de possuir a habilidade de escapar da digestão nas porções superiores do TGI, sendo degradado seletivamente por enzimas secretadas pela microbiota colônica, razão pela qual tem sido utilizado com sucesso na construção de diferentes SLOCs, como comprimidos (Cristina *et al.*, 2017), filmes de revestimento (Meneguin *et al.*, 2014), MPs revestidas (Meneguin *et al.*, 2018), nanopartículas (Martins *et al.*, 2021), entre outros.

Mecanisticamente, o processo de gelatinização que ocorre em excesso de água aquecida promove o intumescimento dos grânulos de amido, seguido pelo rompimento das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura granular e lixiviação das cadeias de amilose. A retrogradação propriamente dita consiste em uma lenta recristalização dos componentes do

amido através do armazenamento e resfriamento, sendo um processo mais rápido para amilose do que para amilopectina devido à estrutura ramificada desta última. Como resultado, uma rede tridimensional mais empacotada e de maior cristalinidade é formada, a qual oferece maior proteção às ligações glicosídicas contra ao ataque enzimático (Dobranowski, 2021).

Ao atingir o cólon, o AR é fermentado por constituintes da microbiota intestinal tendo como produtos os SCFAs, como acetato, propionato e butirato, sendo o último o mais importante para a regulação da saúde intestinal humana. O butirato é produzido principalmente por espécies bacterianas do filo *Firmicutes* e, dentre seus benefícios, podem ser citadas a redução da inflamação através da supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumento das células reguladoras T intestinais, modulação da atividade de macrófagos, diminuição do risco de câncer de cólon e melhora na função da barreira intestinal (Demartino; Cockburn, 2020; Gasaly; Gotteland, 2021).

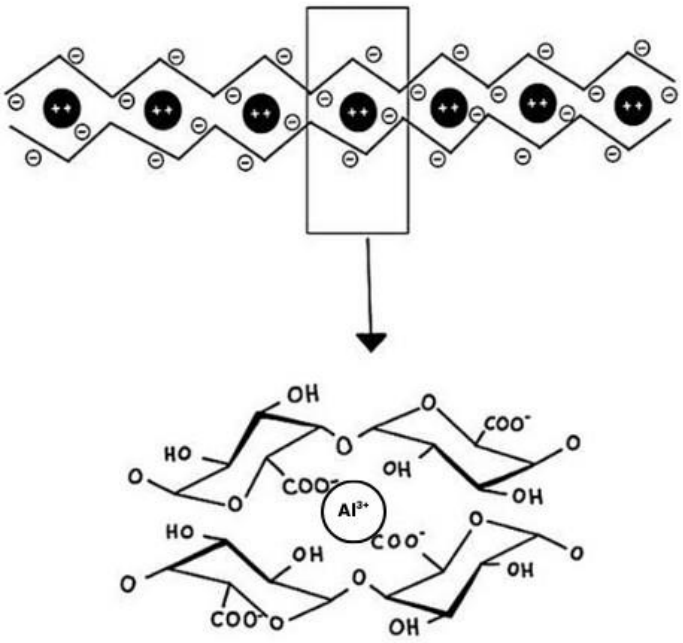
2.7.2. Pectina

A pectina (P) é um polissacarídeo não amiláceo natural, solúvel em água e extraído da parede de células vegetais, composto por homogalacturonano e ramnogalacturonano, cujo primeiro componente apresenta uma cadeia formada por resíduos de ácido galacturônico ligados covalentemente entre si por ligações glicosídicas alfa-1,4, os quais estão presentes na forma de sais ou ésteres metílicos. Com base no grau de esterificação (GE), a pectina é classificada em alto grau de esterificação (se GE > 50%) ou baixo grau de esterificação (GE < 50%). A esterificação indica a porcentagem de grupamentos carboxílicos que estão esterificados, ou seja, na presença de ésteres metílicos, logo, pectinas de alto GE possuem mais que 50% de seus grupos carboxílicos esterificados, enquanto a pectina de baixo GE possui menos que 50% desses grupamentos (Sultana, 2023).

Esse polímero também é utilizado como excipiente para SLOCs, uma vez que se mantém na forma de agregados moleculares intactos na porção superior do TGI, sendo degradada por enzimas pectinolíticas residentes no cólon humano e possui propriedades favoráveis de mucoadesão, dissolução em pH alcalino e capacidade de formação de gel (Meneguin *et al.*, 2014; Cristina *et al.*, 2017; Dev; Bali; Pathak, 2011). Quando a P é associada ao AR, devido às suas propriedades geleificante e estabilizante, observa-se a formação de um material com propriedades formadoras de filme (Meneguin *et al.*, 2014) e de MPs apropriadas e promissoras para a obtenção de SLOCs. Além disso, quando adicionada na retrogradação do amido, a P é capaz de favorecer o processo de retrogradação, uma vez que eleva o teor de AR de 65,8% para 96,6% (Meneguin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2003).

Além disso, enquanto a P de alto GE possui a capacidade de formar géis por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, não necessitando da presença de cátions, a P de baixo GE é capaz de formar géis na presença de íons catiônicos. Estes atuam como uma ponte entre pares de grupamentos carboxílicos de diferentes cadeias de pectinas em uma ampla faixa de pH, criando zonas de junção (Lutz *et al.*, 2009). Esse tipo de junção normalmente é denominado como modelo "caixa de ovos" (*egg box*), no qual as cadeias de pectinato são hélices duplas de arranjo antipararalelo e que, nas zonas de junção, formam fendas de ligação que aprisionam cátions polivalentes, como Ca^{2+} e Al^{3+}, e ligam as cadeias entre si (Fig. 8). Sendo assim, observa-se que a geleificação aparentemente envolve dois estágios: a formação de dímeros (*egg box*) seguido de condensação destes em agregados, ou seja, a justaposição dos *egg box* (Rolin, 1993).

Figura 8 - Modelo "egg-box" ilustrando o mecanismo de geleificação da pectina de baixo grau de metoxilação



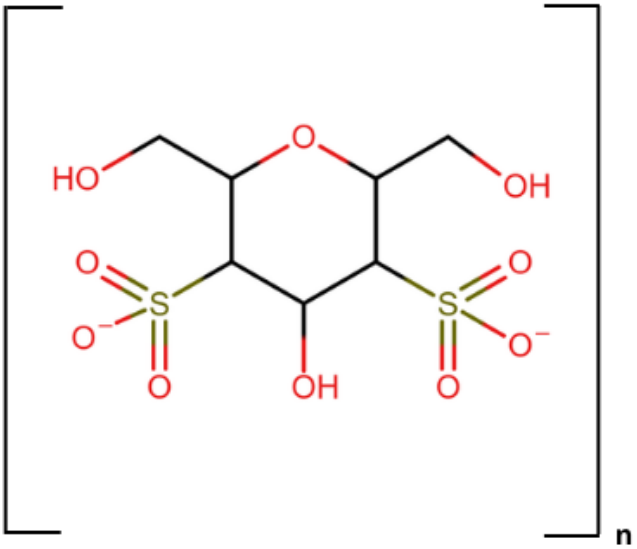
Fonte: Adaptado de Said *et al*. (2023)

Sendo assim, apesar da pectina de baixo GE ter maior solubilidade em uma ampla faixa de pH quando comparada a de alto GE, a formação de géis na presença de íons catiônicos é essencial para a obtenção de MPs pela técnica de geleificação ionotrópica, por isso, a pectina de baixo GE foi utilizada na formulação.

2.7.3. Sulfato de dextrana

Sulfato de dextrana (SD) (Figura 9) é um polissacarídeo hidrofílico aniônico, atóxico, biodegradável e biocompatível, produzido a partir da esterificação da dextrana com ácido clorossulfônico. A dextrana, por sua vez, é obtida através da fermentação de bactérias *Leuconostoc mesenteroides* à base de ácido lático. Este polissacarídeo aniônico é composto por unidades de glicose ligadas por ligações α-1,6 além de ser altamente ramificado e possuir teor de enxofre em cerca de 17%, o que é equivalente entre 2 e 3 grupamentos de sulfato por unidade de glicose (Banerjee; Bandopadhyay, 2016; Patel; Majumder; Goyal, 2012). Além de suas características físico-químicas favoráveis, o SD apresenta propriedades farmacológicas relevantes, como atividades antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Essas achados tornam o SD um composto com promissora aplicação em diversas abordagens biomédicas (Ramasundaram *et al.*, 2023).

Figura 9 - Estrutura química do SD



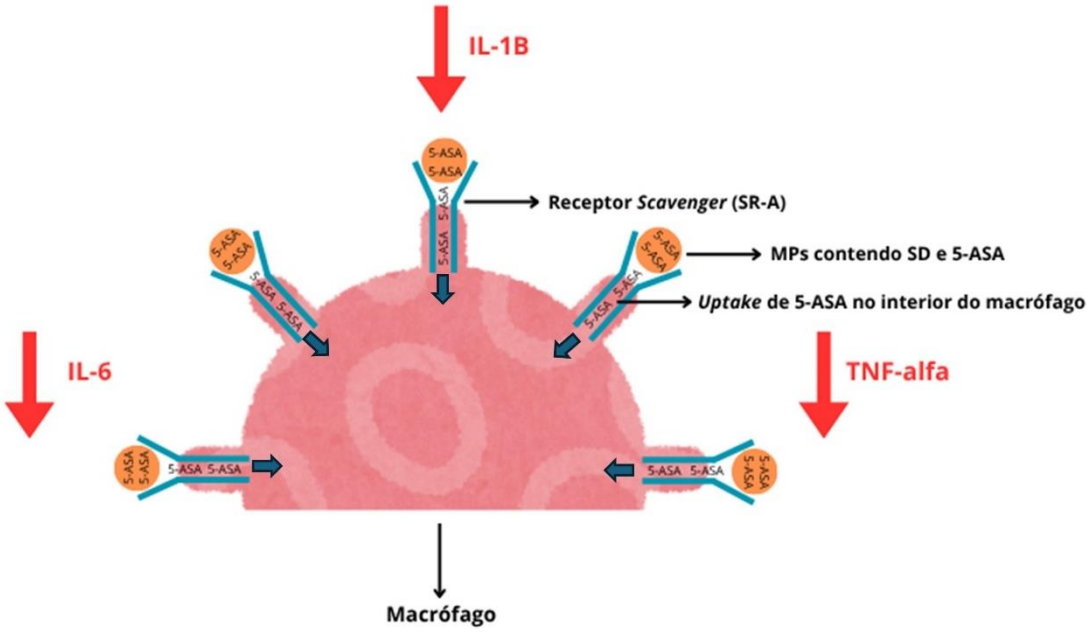
Fonte: Autoria própria (2025)

Dentre as abordagens do ponto de vista farmacêutico, o SD possui capacidade de promover depuração da lipemia, sendo clinicamente empregado no tratamento de dislipidemias. Além deste, sua carga negativa permite que este composto interaja com a trombina, inibindo sua atividade e prevenindo a coagulação sanguínea. O SD também atua como agente estabilizante, impedindo a agregação de proteínas, e desempenha função de agente geleificante em aditivos de cultura celular e formulações cosméticas a fim de evitar a formação de agregados celulares (Ramasundaram *et al.*, 2023).

Mais importante ainda, o SD é capaz de se ligar aos receptores *scavenger* do tipo classe A1 (*class A1 scavenger receptor* [*SR-A1*], também conhecido como CD204, os quais se

encontram superexpressos nas superfícies de macrófagos ativados em locais inflamados, como nas DII (Hashizume; Mihara, 2012; Ramasundaram *et al.*, 2023). O núcleo hidrofílico do SD é capaz de permitir que os sistemas particulados atuem ativamente em macrófagos ativados, possibilitando maior especificidade da liberação no cólon inflamado (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática da interação entre MPs contendo SD e macrófagos ativados por meio da ligação aos receptores scavenger do tipo classe A, superexpressos em locais inflamados



Fonte: Autoria própria (2025)

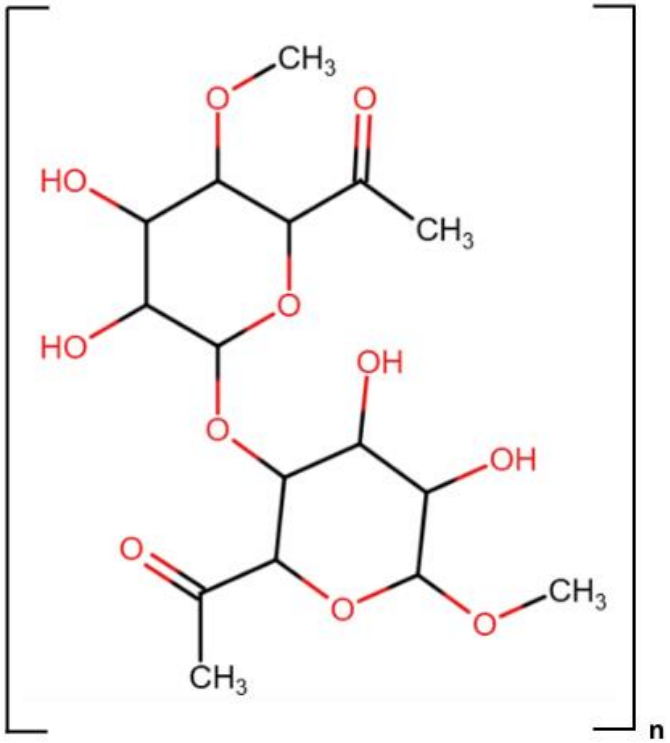
No trabalho de Li *et al* (2021) foram preparadas MPs de amplo espectro de eliminação de EROs e com SD modificado em sua superfície a fim de direcioná-las aos macrófagos ativados e promoverem maior dispersibilidade em solução aquosa. Com os estudos, foram comprovadas que as MPs foram capazes de eliminar EROs de amplo espectro e que a modificação da superfície delas com SD permitiu a ligação nos receptores *SR-A1* superexpressos nos macrófagos ativados, facilitando a chegada nos locais de inflamação e proporcionando redução em aproximadamente 40% da inflamação colônica e melhor efeito terapêutico no tratamento de DII.

2.7.4. Alginato de sódio

O alginato de sódio (ALG) (Fig. 11) é um polissacarídeo hidrofílico aniônico extraído de algas ou de fontes bacterianas cuja estrutura é composta por copolímeros lineares que contém resíduos de ácido β- D- manurônico (unidades M) e α-L-gulurônico (unidades G) ligados por

ligações 1,4-glicosídicas e que, dependendo de suas proporções, irão influenciar as propriedades físicas dos ALG (Sanchez-Ballester; Bataille; Soulairol, 2021; Yong; Mooney, 2012). O ALG tem sido utilizado para revestimento de formas farmacêuticas convencionais e diferentes sistemas de liberação prolongada devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e hidrofilicidade, juntamente com a sua propriedade única de formar géis estáveis (Dias et al., 2017). Em soluções aquosas, o grupamento carboxila do ALG possui a capacidade de ionização em cargas negativas, o que causa repulsão em suas moléculas e aumenta a viscosidade da solução; mas também, esses mesmos grupamentos podem reagir com cátions multivalentes (como Al^{3+} e Ca^{2+}) e formar uma rede de hidrógeis estáveis (Wang; Yang, 2025).

Figura 11 - Estrutura química do ALG



Fonte: Autoria própria (2025)

Além disso, o ALG apresenta características que tornam sua solubilidade pH dependente, ou seja, seu ponto de solubilidade depende do pH, sendo que em valores mais ácidos, como o do estômago, o ALG é menos solúvel. Essa propriedade evita a liberação prematura de fármacos compostos por ALG e faz com que a liberação ocorra preferencialmente na região do intestino inferior, como no colón, fazendo do ALG um bom componente para sistemas de liberação controlada (Yong; Mooney, 2012). No estudo conduzido por Ling *et al.* (2019), nanopartículas contendo proteínas terapêuticas foram encapsuladas em MPs gastroprotetoras revestidas com ALG/quitosana e reticuladas com Ca^{2+}. Essas MPs

demonstraram resistência à incubação em meio gástrico (pH 1,6) durante 1h, liberando apenas cerca de 25% do composto ativo. A liberação das nanopartículas ocorreu especificamente nas regiões intestinal e colônica (pH 6,5), atingindo aproximadamente 70% em 3h. Dessa forma, a administração oral dessas nanopartículas promoveu redução dos índices clínicos e histológicos associados à DII em um modelo murino de colite induzida.

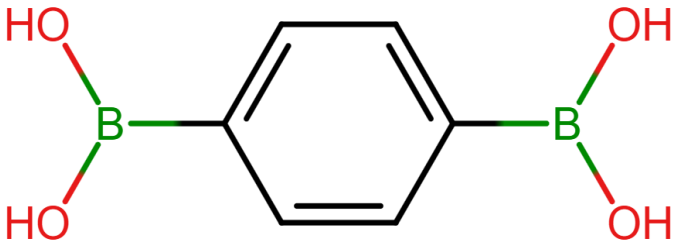
2.7.5. Ácido 1,4-fenilenodiborônico (AFD)

Apesar da presença de uma camada epitelial que atua como barreira protetora do TGI, a entrada de patógenos, a presença de ingredientes alimentares, bem como a interação entre células imunes podem causar ativação de neutrófilos e macrófagos para produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, os quais irão contribuir para o estresse oxidativo. Em casos de DII, observa-se disfunção da barreira intestinal com aumento de sua permeabilidade (*leaky gut*), resultando em liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as EROs, favorecendo a cascata inflamatória na região intestinal e, consequentemente, contribuindo para início dos sintomas ou progressão de DC e RCU (Andréa *et al*., 2015; Minuzzo *et al.*, 2016).

Estratégias avançadas para a construção de sistemas de liberação cólon-específicos têm explorado gatilhos fisiopatólogicos característicos da DII, especialmente da RCU, como a produção excessiva de EROs. Dentre esses estímulos, as EROs se destacam como alvos promissores devido a sua elevada concentração de até 100 x no microambiente inflamatório da mucosa colônica. Nesse contexto, o AFD tem sido investigado como componente sensível às EROs na construção de SLOCs aplicáveis em áreas inflamadas. Isso porque o AFD estabelece ligações reversíveis com grupos diol polissacarídicos, que podem ser rompidas seletivamente na presença de EROs, promovendo a desintregração do sistema e a liberação controlada do fármaco (Andréa *et al.*, 2015).

O AFD é um composto orgânico caracterizado por possuir em sua estrutura dois grupos borônicos (-$B(OH)_2$) ligados na posição para (1 e 4) de um anel benzênico (Figura 12). Dentre suas aplicações, o AFD é amplamente utilizado como reticulante químico de polímeros naturais, com atividade antioxidante, para desenvolvimento de MPs EROs-responsivas, fazendo com que o fármaco chegue de forma eficaz na região inflamada, e não visando a atividade antioxidante terapêutica deste composto (Zhu *et al*., 2023). O AFD é capaz de eliminar as EROs através das ligações carbono-boro e pelas ligações covalentes entre ácido fenilborônico e hidroxilas (Hoang; Smith; Raines, 2017; Zhao *et al*., 2019).

Figura 12 - Estrutura química do AFD



Fonte: Autoria própria (2025)

O processo de reticulação química com o AFD ocorre através de interações dinâmicas e sensíveis ao pH ou ao estresse oxidativo. Dessa forma, quando as MPs reticuladas com AFD são expostas em ambientes inflamatórios contendo elevadas concentrações de EROs, as ligações carbono-boro são quebradas e formam-se ligações boro-oxigênio. Posteriormente, o borato é hidrolisado e o grupo fenol sofre um rearranjo, tendo como produtos a hidroquinona, cadeias poliméricas livres e ácido borônico. Por fim, o fármaco é liberado do interior das MPs com destino direcionado ao cólon (Iturmendi; Monkowius; Teasdale, 2017; Shen *et al.,* 2021).

Diante do exposto, todas as informações citadas acima justificam o desenvolvimento do sistema inovador baseado em polissacarídeos naturais e mecanismo de responsividade quádrupla, capazes de promover a liberação localizada de 5-ASA na mucosa colônica inflamada.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver MPs contendo 5-ASA, baseadas em blendas de AR/P/DS, obtidas por dupla reticulação (física e química) com Al^{+3} e AFD, respectivamente, revestidas com ALG e com mecanismos quádruplo de responsividade, além de avaliar as propriedades físicas, químicas, estruturais, morfológicas e de performance dos sistemas desenvolvidos, visando um tratamento mais eficaz e seguro para as DII.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Retrogradar o amido em associação à pectina através de tratamento hidrotérmico;
- ✓ Microencapsular o 5-ASA com a blenda AR/P/SD por geleificação ionotrópica através de íons Al^{+3};
- ✓ Reticular quimicamente as MPs com AFD;
- ✓ Revestir as MPs com ALG;
- ✓ Estimar a eficiência de encapsulação (EE%);
- ✓ Avaliar a morfologia de superfície e seção transversal das MPs por *MEV-FEG;*
- ✓ Avaliar a interação química entre os componentes das micropartículas e a reticulação química com AFD por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA);
- ✓ Analisar à adesão MPs na mucosa gastrointestinal através do ensaio *in vitro* de interação com a mucina e ensaio *ex vivo* de mucoadesão por retenção em rampa;
- ✓ Determinar o perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA em fluido simulado gastrintestinal na presença e ausência de enzimas;
- ✓ Determinar o perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA na presença e ausência de EROs;
- ✓ Determinar a erosão das MPs em ambiente colônico simulado frente à presença de EROs;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular das MPs em células de adenocarcinoma colônico humano (Caco-2) e células de macrófagos (RAW 264.7);
- ✓ Avaliar a permeabilidade do 5-ASA em MPs frente a células Caco-2;
- ✓ Avaliar a capacidade de vetorização das MPs para macrófagos RAW 264.7 ativados e não ativados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Ácido 5-aminossalicílico 95% (Sigma-Aldrich® - St. Louis, MO, EUA);

- Ácido clorídrico 37% (Quimis - Diadema, Brasil);

- Ácido fenileno-1,4-diborônico (Santa Cruz Biotechnology - Dallas, Texas, EUA). Hidróxido de sódio (Grupo Química - Rio de Janeiro, Brasil);

- Alfa amilase de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Alginato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. - São Paulo, Brasil);

- Amido de milho com alto teor de amilose (AA) tipo Hylon VII, contendo 70% de amilose e 30% de amilopectina (National Starch & Chemical Co. - Bridgewater Township, NJ, EUA);

- Cloreto de alumínio hexahidratado 95% (Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda. - São Paulo, Brasil);

- Dextran sulfato de sódio (Sigma-Aldrich® - St. Louis, MO, EUA);

- Dextranase (AEB Latino Americana SA - Paraná, Brasil);

- Fluoresceína Isotiocianato - FITC (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Fosfato de potássio monobásico 98,0-100,5% (Quimis - Diadema, Brasil);

- Lipopolissacarídeos (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Meio Eagle modificado por Dulbecco, soro fetal bovino, vitaminas, aminoácidos não-essenciais e glutamina (Corning);

- Mucina de porco tipo II (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Pancreatina (Vetec Química Fina Ltda. - Rio de Janeiro, Brasil);

- Pectina de baixo teor de metoxilação do tipo LM-506CS grau de esterificação 20-45% (CP Kelco - Copenhagen, Dinamarca);

- Pectinase (AEB Latino Americana SA - Paraná, Brasil);

- Pepsina de mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Peróxido de hidrogênio 35% (Êxodo Científica - São Paulo, Brasil);

- Sal HEPES (Sigma-Aldrich® - St Louis, MO, EUA);

- Solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Corning);

- Solução HBSS (Nova Biotecnologia - São Paulo, Brasil);

- Suportes permeáveis Transwell® (diâmetro 12mm, 12 poços, tamanho de poro 0,4μm, área de membrana 1,13 cm^2) (Greiner Bio-One);

- Tripsina 0,25% (Nova Biotecnologia - São Paulo, Brasil).

4.2. Principais equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento MSH-5-BASIC LGI Scientific (Brasil);
- Agitador mecânico de hélice IKA Eurostar 20 (Liverpool, Reino Unido);
- Autoclave vertical CS Prismatec (Brasil);
- Balança analítica Marte (Espanha);
- Câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), MA420, Marconi (Brasil);
- Centrífuga de bancada 80-2B CentriBio (Brasil);
- Dispersor IKA Ultraturax Eurostar (Liverpool, Reino Unido);
- Dissolutor SR-8 Plus Hanson Research® (Chatsworth, Califórnia, USA);
- DSC 4000 Perkin Elmer (EUA);
- Eletrodo STX2, EVOMX World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA);
- Espectrofotômetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60 (Santa Clara, Califórnia, USA);
- Espectrofotômetro FTIR Shimadzu IRPrestige-21 (Kyoto, Japão);
- Esterioscópio Leica MZ APO® (Wetzlar, Alemanha);
- Estufa com circulação e renovação de ar MA 035 Marconi (Brasil);
- Microscópio JEOL JSM-7500F (Japão);
- Peagâmetro Digimed (Brasil). Mini Spray Dryer B-191 Büchi (Suíça);
- Microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse TE300 (Japão);
- Sistema TGA 4000 Perkin Elmer (EUA).

4.3. Retrogradação do amido em associação à pectina

Amido de milho de alta amilose (AA, Hylon VII) (National Starch and Chemical Co. Bridgewater, NJ, USA) foi disperso em água destilada na concentração de 5% (m/v), sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, a dispersão foi autoclavada para gelatinização a 121ºC por 120 min. Ao final do processo, a dispersão de AA gelatinizada e resfriada à 30ºC foi misturada com pectina de baixo grau de metoxilação tipo LM-506CS (CP Kelco), na proporção de 1:4 (AR:P), cuja proporção utilizada foi determinada de acordo com protocolos previamente descritos em literatura os quais validaram a metodologia empregada (Meneguin *et al.*, 2014). Para o processo de retrogradação, as dispersões foram submetidas a ciclos térmicos alternados de 4ºC e 30ºC por 16 dias, sendo 2 dias em cada temperatura.

4.4. Microencapsulação do 5-ASA por geleificação ionotrópica

A dispersão de AR/P obtida no item 4.3 foi misturada com diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%, m/v) e do fármaco 5-ASA (0,5% e 1,0%, m/v, Sigma-Aldrich®) sob agitação magnética durante 5 e 30 min. Posteriormente, as preparações foram gotejadas através de seringa e agulha (27G - 25x 0,60) sem bisel em 50 mL de solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (5%, m/v, Vetec®) (Meneguin *et al.*, 2018), sob agitação magnética constante por 5 min. As MPs foram separadas por filtração em funil de Büchner e lavadas 3x com 30 mL de água destilada em cada lavagem para remoção do excesso de Al^{3+}.

4.4.1. Otimização do tempo de reticulação iônica

Visando otimizar o tempo de reticulação física em função da EE%, foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução reticulante composta de $AlCl_3$ após 5 e 30 minutos de reticulação física, coincidente com o término do gotejamento da dispersão. Alíquotas de 1 mL também foram retiradas dos 90 mL de solução de lavagem, recuperados após as MPs serem lavadas com água destilada (3x, 30 mL/lavagem). As amostras foram filtradas em filtro PTFE hidrofílico com poro de 0,22 µm e o 5- ASA quantificado em espectrofotômetro UV-Vis a 331 nm, a partir de metodologia analítica validada por Meneguin e colaboradores (2021), com equação da reta $y = 0,0221x + 0,0049$ ($R^2 = 0,9999$), obtidos no intervalo de 5 a 45 µg/mL de 5-ASA.

4.5. Reticulação química das micropartículas

As MPs obtidas na seção 4.4 foram imersas em 25 mL de solução de AFD (0,1% ou 0,5% m/v) (Zhu *et al.*, 2023) mediante agitação magnética por 5, 10 e 20 min em temperatura ambiente. Depois, elas foram separadas por filtração em funil de Büchner e secas a 30°C por 24 horas, em estufa com circulação forçada de ar.

4.6. Revestimento das micropartículas com alginato de sódio

As MPs secas obtidas na seção 4.5 foram imersas em solução de ALG (2% m/v) (Ling *et al.*, 2019) mediante agitação magnética por 5 min em temperatura ambiente. Depois, elas foram secas a 30°C por 24 horas, em estufa com circulação forçada de ar. O processo foi repetido 2 vezes para garantir que toda a superfície da MP tivesse sido revestida. As amostras obtidas nas seções 4.5 e 4.6 foram nomeadas de acordo com as variáveis apresentadas nas Tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Variáveis exploradas para obtenção de MPs de AR/P/SD reticuladas duplamente por reticulação iônica com Al^{3+}, reticulação química com AFD e revestidas com ALG.

	Concentração SD e 5-ASA (%, m/v)			
	0,5% SD 0,5% 5-ASA (1:1)	**0,5% SD 1,0% 5-ASA (1:2)**	**1,0% SD 0,5% 5-ASA (2:1)**	**1,0% SD 1,0% 5-ASA (2:2)**
Reticulação física (Al^{3+})	1:1F	1:2F	2:1F	2:2F
Dupla reticulação (Al^{3+} e AFD)	1:1D	1:2D	2:1D	2:2D
Dupla reticulação e revestimento com ALG	1:1D-A	1:2D-A	2:1D-A	2:2D-A

Fonte: Autoria Própria (2025)

Tabela 2 -Variáveis exploradas para obtenção de MPs controle (sem fármaco) de AR/P/SD reticuladas duplamente por reticulação iônica com Al^{3+}, reticulação química com AFD e revestidas com ALG.

	Concentração de SD (%, m/v)	
	0,5% SD	**1,0% SD**
Reticulação física (Al^{3+})	1F	2F
Dupla reticulação (Al^{3+} e AFD)	1D	2D
Dupla reticulação e revestimento com ALG	1D-A	2D-A

Fonte: Autoria Própria (2025)

4.7. Rendimento do processo

As MPs obtidas por dupla reticulação foram secas em estufa, e mantidas em dessecador até atingir peso constante. O rendimento do processo foi calculado gravimetricamente correlacionando a massa das MPs com relação a massa inicial de sólidos, conforme a Equação 1:

$$Rendimento = \left(\frac{massa\ experimental}{massa\ teórica}\right) x\ 100\ (eq.1)$$

4.8. Eficiência de encapsulação (EE%)

MPs secas foram precisamente pesadas (30 mg) e incubadas em 5 mL de tampão fosfato (pH 7,0/0,1 M), sob agitação magnética constante por 2 horas. Em seguida, a dispersão foi submetida à trituração em ultraturrax por 2 minutos, centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado filtro PTFE hidrofílico com poro de 0,22 μm. Posteriormente, o fármaco foi quantificado em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 331 nm, em triplicata. A EE% foi calculada através da Equação 2:

$$EE\% = \left(\frac{massa\ do\ fármaco\ quantificada}{massa\ do\ fármaco\ teórica}\right)\ x\ 100\ (eq.\ 2)$$

4.9. Análise de tamanho, forma e morfologia das micropartículas

4.9.1. Análise de tamanho e forma

O tamanho e a forma das partículas foram analisados em estereoscópio Leica MZ APO®. As amostras foram dispostas em vidro de relógio e as imagens captadas, utilizando-se aumento de 10x. Foram avaliados a circularidade e o diâmetro de Feret de 100 microesferas de cada formulação, a partir da digitalização das imagens em computador, utilizando-se o programa analisador de imagem ImageJ.

4.9.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

A morfologia de superfície e da seção transversal das MPs foi avaliada por MEV-FEG em microscópio JEOL JSM-7500F (Japão). As fotomicrografias de cada amostra foram obtidas com ampliação de 15, 50 e 1000 x.

4.10. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As MPs foram reduzidas a pó com auxílio de moinho de bolas e 2 mg foram misturados com 100 mg de KBr. As amostras e os compostos isolados foram avaliados usando um espectrofotômetro FTIR Shimadzu IRPrestige-21 na faixa de 400−4000 cm^{-1}, com acúmulo de 64 varreduras e resolução de 1 cm^{-1}.

4.11. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

MPs (5 mg) foram seladas em cadinhos de alumínio e as amostras juntamente aos compostos isolados foram analisados em um TA Instruments DSC 4000 (Perkin Elmer) em um intervalo de temperatura de 25 a 400 ºC, utilizando taxa de aquecimento de 10 ºC/min em uma atmosfera dinâmica inerte de nitrogênio com fluxo de gás de 50 mL/min.

4.12. Análise termogravimétrica (TGA)

MPs (5 mg) foram seladas em cadinhos de alumínio e as amostras juntamente aos compostos isolados foram analisados em sistema TGA 4000 (Perkin Elmer) em uma faixa de temperatura de 25 até 600 ºC, utilizando taxa de aquecimento de 10 ºC/min em atmosfera de ar com fluxo de gás de 50 mL/min.

4.13. Determinação da atividade antioxidante ou antirradicalar

A determinação da atividade antioxidante ou antirradicalar das MPs foi realizada seguindo o protocolo delineado por Roque-Borda *et al.* (2017) e Alex López-Córdoba *et al*. (2014), com algumas adaptações, na ausência de luz durante todo o experimento. Inicialmente, foi preparada uma solução do radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) na concentração de 25 mg/L em metanol, o qual foi utilizado como meio da reação. Posteriormente, 10 mg de MPs foram adicionadas nos poços de uma placa de 96 poços e sobre elas foi adicionada a solução DPPH•-metanol. Um espectro de absorção foi então obtido para esta solução a fim de determinar o comprimento de onda em que ocorreu a absorção máxima. As leituras de inibição foram feitas a 520 nm periodicamente até a estabilidade ser alcançada, o que ocorreu após 2 horas. Posteriormente, foi calculado o percentual de inibição (I%) do radical através da Equação 3, onde Abs amostra se refere à absorbância das amostras e Abs controle se refere à absorbância da solução do radical DPPH• em metanol (solução estoque).

$$Inibição(\%) = \frac{(Abs\ controle - Abs\ amostra)}{Abs\ controle}\ x\ 100\ (eq.3)$$

4.14. Análise das propriedades mucoadesivas

4.14.1. Adsorção de mucina

Inicialmente, a propriedade mucoadesiva das MPs desenvolvidas foi analisada através do teste de adsorção de mucina por meio de um ensaio colorimétrico (Boni, 2014; Dhawan; Sigla; Sinha, 2004; Prezotti *et al.*, 2014). Para o teste, 20 mg de MPs controle e de MPs com fármaco foram mantidas em contato com 1 mL de solução aquosa de mucina tipo II (pH 6,8), na concentração de 500 µg/mL, por 1 hora à 37°C e com agitação de 30 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para a quantificação de mucina livre através do ensaio colorimétrico com reagente de Lowry (kit Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification-Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O método de Lowry foi desenvolvido por Lowry e colaboradores (1951) e é baseado em duas sucessivas reações: reação de Biureto e redução do reagente de Folin-Ciocalteu. Na reação de Biureto, uma solução alcalina de carbonato de sódio é misturada a uma solução de com cobre, formando um complexo cobre-proteína. Seguido disso, o complexo cobre-proteína reage com o reagente de Folin-Ciocalteu, sofre redução e origina a coloração azul, cuja intensidade é medida em espectrofotômetro.

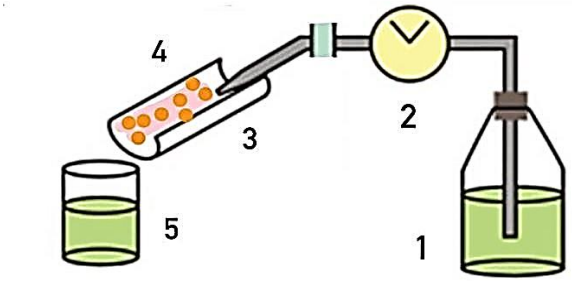
A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-Visível a 749 nm e a concentração de mucina livre foi calculada a partir da equação de reta obtida através da curva de calibração da mucina. O ensaio foi realizado em triplicata e a quantidade de mucina adsorvida foi determinada indiretamente a partir da quantificação da mucina livre no sobrenadante, através da Equação 4.

$$Q\ mucina\ adsorvida = Q\ mucina\ adicionada - Q\ mucina\ livre \quad (eq.\ 4)$$

4.14.2. Ensaio *ex vivo* de mucoadesão por retenção em rampa (*wash-off mucoadhesion*)

A avaliação da mucoadesão *ex vivo* utilizando o "modelo de rampa" foi realizado utilizando mucosa gastrintestinal de porco de acordo com o procedimento adaptado por Prezotti e colaboradores (2014). Resumidamente, a mucosa das regiões gástrica, intestinal e colônica foi cortada longitudinalmente, lavada com solução salina resfriada durante 10 minutos a fim de remover sujidades, sem, no entanto, remover a camada de muco. Posteriormente, as mucosas foram fixadas em um suporte acrílico com auxílio de fita adesiva. Cerca de 30 unidades de MPs foram dispostas sobre a mucosa e deixadas em repouso durante 20 minutos, permitindo seu intumescimento e adesão ao epitélio. Passado esse tempo, o sistema foi posicionado em um suporte inclinado (aproximadamente 30º) e irrigado com os fluidos gástrico simulado (FGS, HCl 0,1 M, pH 1,2), intestinal simulado (FIS, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) ou colônico simulado (FCS, tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) em fluxo constante de 13 mL/min, durante 30 minutos (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática do ensaio ex vivo de mucoadesão por retenção em rampa



1. FGS ou FIS ou FCS
2. Bomba peristáltica
3. Suporte
4. Mucosa gastrintestinal de porco com as MPs
5. Coletor

Fonte: Adaptada de Carvalho *et al.* (2010)

A porcentagem de mucoadesão foi determinada através da contagem do número de MPs que permaneceram fixadas à mucosa transcorridos 30 minutos.

4.15. Estudos de performance

4.15.1. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA

O estudo foi realizado em dissolutor SR-8 Plus Hanson Research®, usando o aparato-I adaptado, equipado com mini-cestos e cubas de volume reduzido (150mL), utilizando massa de MPs correspondente à 3 mg de 5-ASA. Foram utilizados meios de dissolução que mimetizam os diferentes valores de pH ao longo das regiões do TGI (estômago, intestino delgado e cólon), mantendo-se as condições *sink* durante todas as condições de pH. Os meios foram mantidos a 50 rpm e 37 ± 0,4 ºC. Inicialmente, o ensaio foi conduzido em 50 mL de FGS, composto por uma solução de HCl 0,1 mol L^{-1} (pH 1,2) durante 2 horas. Na etapa seguinte, o ensaio foi realizado em 50 mL de FIS, baseado em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) por 4 horas como preconizado pela Farmacopéia Americana (USP 33, 2010). Na última etapa, foi preparado o FCS, baseado em tampão fosfato (pH 6,8). O ensaio foi conduzido por tempo suficiente para que no mínimo 80% do fármaco fosse liberado. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, filtradas através de um filtro PTFE tamanho de poro 0,22 μm e foi feita a reposição imediata de meio à mesma temperatura. A quantidade de fármaco liberada foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda específico (303 nm para FGS e 331 nm para FIS e FCS) a partir de metodologia analítica validada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.15.1.1. Estratégias aplicadas para otimização do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA

Com o objetivo de aumentar a resistência das MPs às condições gástricas e direcionar a liberação do 5-ASA à região colônica, diferentes estratégias de modificação do sistema obtido por geleificação ionotrópica foram avaliadas e as formulações submetidas ao ensaio de liberação *in vitro*, conforme descrito a seguir.

A) Alteração do tempo de reticulação química de 5 para 20 minutos sob agitação após o gotejamento da solução de AFD;
B) Reticulação dupla das MPs após secá-las em estufa a 30 ºC;
C) Ajuste do pH das dispersões poliméricas com fármaco para 6,0-6,5, através da adição de NaOH;
D) Aumento da concentração da solução de AFD de 0,1% para 0,5% (m/v);

E) Aumento do tempo de homogeneização entre dispersão polimérica e fármaco de 10 para 30 min sob agitação magnética;
F) Redução da concentração de SD incorporada às MPs de 0,5% para 0,1% (m/v);
G) Revestimento das MPs com alginato de sódio a 2% (m/v) durante 5 minutos por 2 vezes.

4.15.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA em presença de conteúdo enzimático

O estudo foi realizado de acordo com o estabelecido no item 4.12.1 e adicionalmente, para analisar o comportamento do sistema frente à presença de conteúdo enzimático, foram adicionados: ao meio FGS pepsina de mucosa gástrica suína a uma concentração de 0,304 g L^{-1}, durante 2 horas; ao meio FIS pancreatina proveniente de pâncreas suíno a uma concentração de 19,5 g L^{-1}, por 4 horas como preconizado pela Farmacopéia Americana (USP 33, 2010); e na última etapa, o meio FCS foi acrescido de α-amilase (10 UI mL^{-1}) (LI *et al*., 2021), pectinase (0,02 g mL^{-1}) (Butte *et al*., 2014) e dextranase (15UI mL^{-1}) (Abid *et al.*, 2020), a fim de permitir a digestão da blenda de AR/P/SD. O ensaio foi conduzido por tempo suficiente para que no mínimo 80 % do fármaco fosse liberado. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, filtradas através de um filtro PTFE tamanho de poro 0,22 μm e foi feita a reposição imediata de meio à mesma temperatura. A quantidade de fármaco liberada foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda específico (303 nm para FGS e 331 nm para FIS e FCS) a partir de metodologia analítica validada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.15.3. Avaliação da responsividade da liberação *in vitro* do 5-ASA à presença de EROs

O estudo foi conduzido conforme estabelecido no item 4.12.1. Adicionalmente, para avaliar a responsividade dos sistema à presença de EROs, foi adicionado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao meio FCS, na concentração de 1 mM, conforme descrito por Zhu *et al*. (2023). Alíquotas foram coletadas em tempos previamente determinados e analisadas por espectrofotometria à 331 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.15.4. Ensaio de erosão das micropartículas frente à presença de EROs

As MPs foram incubadas em 3 mL de FCS contendo ou não H_2O_2 na concentração de 1mM, em um banho a 37 °C com oscilação de 30 rpm, a fim de simular o peristaltismo intestinal.

Amostras foram retiradas em tempos pré-determinados durante 48 h (30 min, 60 min, 120 min, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h) em triplicata. O excesso de água da superfície das MPs foi cuidadosamente removido com papel filtro e as partículas foram secas à estufa (60 ºC durante 24 horas). A biodegradabilidade das amostras foi avaliada gravimetricamente, de acordo com a Equação 5:

$$Biodegradabilidade\ (\%) = \frac{(Peso\ inicial - peso\ no\ tempo\ t)}{peso\ inicial}\ x\ 100\ (eq.\ 5)$$

4.16. Cultura celular de células de adenocarcinoma colônico humano (Caco-2)

Células de adenocarcinoma colônico humano (Caco-2) (ATCC, Rockville, MD) foram mantidas em DMEM com 4,5 g/L de glicose e suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 2% (v/v) vitaminas, 2% (v/v) solução de aminoácidos não essenciais, 2% (v/v) L-glutamina e 2% (v/v) de uma solução antimicótica-antibacteriana, a 37°C em atmosfera umidificada de O_2/CO_2 (95:5, v/v). Todos os experimentos foram realizados após 21 dias de semeadura, quando as células Caco-2 exibiram máxima diferenciação. Anteriormente a cada teste, o meio foi removido e as monocamadas de células lavadas com PBS (3x).

4.16.1. Viabilidade celular

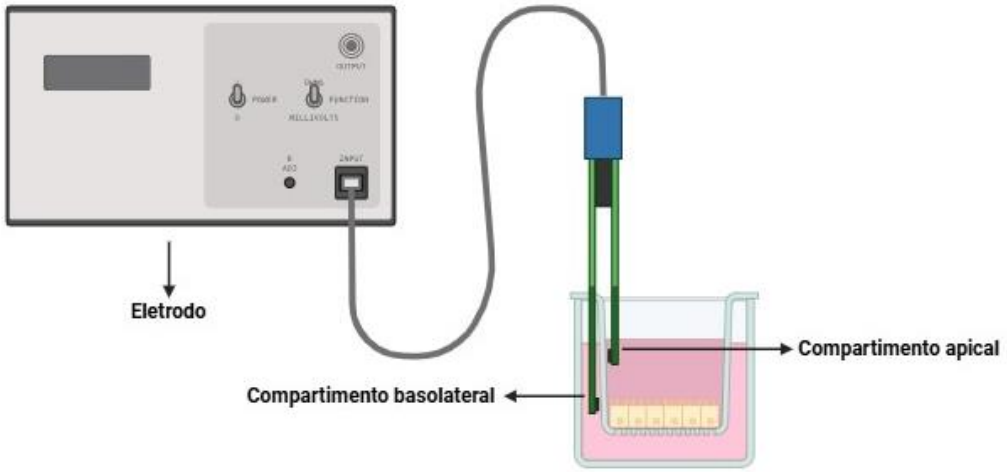
A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio Alamar Blue®, reagente que permite a avaliação da proliferação celular a partir da redução do sal de resazurina à resofurina pela atividade metabólica mitocondrial, cuja intensidade de redução é proporcional à quantidade de células. As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço. Após 24 h, amostras foram adicionadas a cada poço em diferentes faixas de concentrações (62,5 ug/mL a 1000 ug/mL de 5-ASA) e incubadas por 24 h. O meio foi removido, adicionado 200 µL da solução de Alamar Blue à 10% dissolvido em meio de cultura e as placas incubadas por 4 h em condições de cultivo (37°C, 5% CO_2 e atmosfera úmida). Após incubação, as absorbâncias foram determinadas em leitor de microplacas à 570 nm (forma reduzida) e 600 nm (forma oxidada) e a redução do Alamar Blue calculada a partir da equação fornecida pelo fabricante (Meneguin *et al.*, 2024).

4.16.2. Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

Células Caco-2 nas passagens 25-30 foram semeadas com 1 x 10^5 células/poço em suporte para cultura celular de policarbonato Transwell® contendo 12 poços e o meio foi alterado diariamente durante 21 dias. A monocamada de células Caco-2 foi lavada 3x com PBS

e posteriormente, incubada em solução balanceada de Hank´s (HBSS) por 1h, as quais se mantiveram em repouso a 95% O_2 e 5% CO_2 a 37 ºC para atingir o equilíbrio. A integridade da monocamada foi avaliada através da medição de TEER em membrana de policarbonato com tamanho de poro de 0,45µm e área de filtro de 1,13cm^2 utilizando um eletrodo STX2, EVOMX World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA). Para a realização da medida, este foi colocado no compartimento basolateral e o outro no apical (Fig. 14). Em linhagens celulares Caco-2, as monocamadas celulares com TEER entre 300 e 500 Ω. Cm^2 foram consideradas aptas para a realização do ensaio de permeabilidade, considerando que tais valores sugerem alta integridade da barreira epitelial (Meneguin *et al.*, 2018). Os valores de TEER foram verificados no início (tempo 0) e ao final do ensaio de permeabilidade (tempo 180).

Figura 14 - Representação esquemática da medição de TEER em inserto Transwell®



Fonte: Autoria própria (2025)

4.16.3. Permeabilidade *in vitro* do 5-ASA em monocamadas de células Caco-2

O ensaio de permeabilidade do 5-ASA através de monocamadas de células Caco-2 foi realizado na direção apical-basolateral.

Antes de iniciar os testes, o meio foi removido e as monocamadas lavadas 3x com PBS (1 mL, à 37 °C). As amostras foram suspensas em HBSS (correspondente à 125 µg/mL de 5-ASA), adicionadas ao compartimento apical dos insertos (Fig. 15) e as placas incubadas à 37 °C, durante 180 min. O volume de 200 µL de amostra foi coletado do compartimento basolateral em diferentes tempos (0, 15, 30, 60, 120 e 180 min) e o meio substituído imediatamente com HBSS à mesma temperatura. A quantidade de 5-ASA permeada através das células foi quantificada em espectrofotômetro UV/VIS, no comprimento de onda de 331 nm, através de

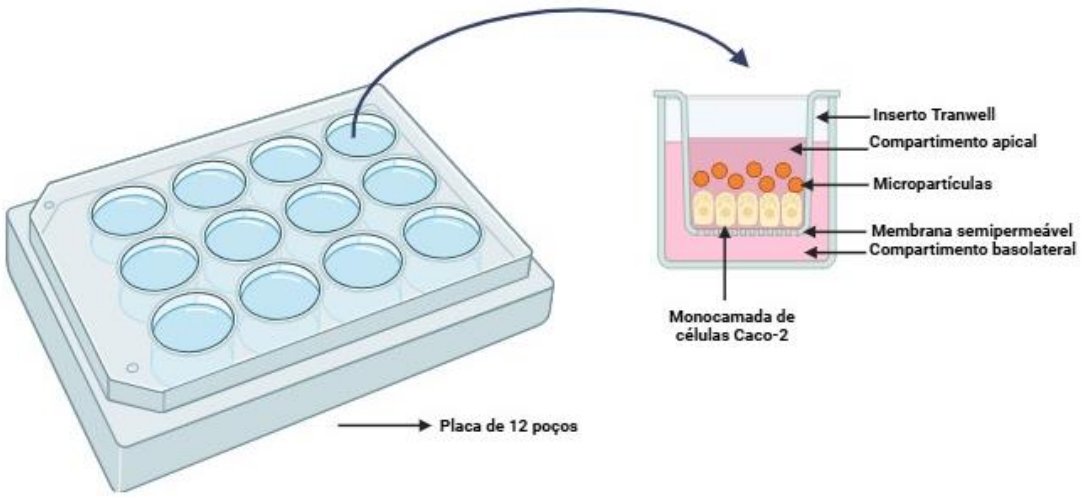
metodologia previamente validada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A TEER de cada poço foi medida no começo e após o fim do experimento. Os resultados foram expressos como coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e razão de aumento de absorção (R), como seguem nas Equações 6 e 7:

$$Papp = \frac{dQ}{dt}\ x\ \frac{1}{A\ x\ C0} \quad (eq.6)$$

onde dQ/dt é o fluxo da amostra através da monocamada (µg/s), C0 é a concentração inicial de 5-ASA no compartimento apical (µg/mL), e A é a área de superfície da monocamada (1,13 cm^2).

$$R = \frac{Papp\ amostra}{Papp\ 5ASA} \quad (eq.7)$$

Figura 15 - Representação esquemática do sistema Transwell® com monocamada de células Caco-2, utilizado para avaliação da permeabilidade de MPs



Fonte: Autoria própria (2025)

4.17. Obtenção de MPs pela técnica de *spray-drying*

Para os ensaios de internalização em macrófagos, foram produzidas MPs coradas com FITC por *spray drying* a fim de reduzir seu tamanho, garantindo compatibilidade com os receptores SR-A1 das células.

A secagem foi realizada em Mini Spray Dryer B-191 Büchi (Suíça) em regime de fluxo cocorrente, equipado com bomba peristáltica, bico de aspersão pneumática de 0,7 mm e ciclone para separação de sólidos. Inicialmente, 10 mL da dispersão AR/P/SD + 5-ASA (0,5% m/v) + FITC (12,5 µg/mL) foram homogeneizados durante 30 min, na ausência de luz. As soluções de

$AlCl_3$ e de AFD foram preparadas separadamente, seguindo as proporções descritas nos itens 4.4 e 4.5, sendo de 2% de $AlCl_3$ (25 mg) e 8% de AFD (125 mg) em relação à massa polimérica utilizada (1,25g de polímeros) (Muniyandy; Janarthanan; Sathasivam, 2020). Em seguida, 10 mL da solução de $AlCl_3$ foram gotejados sobre a dispersão, aguardando-se 5 minutos para reticulação física, seguidos pelo gotejamento de 10 mL da solução de AFD, com mais 5 minutos para reticulação química. Durante o processo de *spray drying*, o conjunto foi mantido sob agitação magnética a 1000 rpm para garantir homogeneização. As condições de secagem adotadas foram temperatura de entrada de 210 ºC, 70% de aspiração e taxa de alimentação de 0,05%, conforme Meneguin *et al.* (2021). As MPs foram caracterizadas quanto a EE% e MEV-FEG, como descrito nas seções 4.7 e 4.8.

4.18. Cultura celular de macrófagos RAW 264.7

Células de macrófagos RAW 264.7 (ATCC, Rockville, MD) foram mantidos em DMEM com 4,5 g/L de glicose e suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 2% (v/v) vitaminas, 2% (v/v) solução de aminoácidos não essenciais, 2% (v/v) L-glutamina e 2% (v/v) de uma solução antimicótica-antibacteriana, a 37°C em atmosfera umidificada de O_2/CO_2 (95:5, v/v). Todos os experimentos foram realizados quando os macrófagos exibiram máxima diferenciação. Anteriormente a cada teste, o meio foi removido e as monocamadas de células lavadas com PBS (3x).

4.18.1. Viabilidade celular

O estudo foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.14.1.

4.18.2. Habilidade de vetorização para macrófagos ativados

A capacidade de direcionamento das MPs para macrófagos RAW 264.7 ativados (que expressam SR-A) e não ativados foi observada usando o microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TE300. Após atingirem 80% de confluência, as células RAW 264.7 foram semeadas em uma placa de 96 poços (8.000 células/poço), cultivadas por 12 h e divididas em 3 grupos. Lipopolissacarídeos (LPS, Sigma-Aldrich) (1 μg/mL) foram adicionados aos grupos 1 e 2, incubando por 12 h para ativar os macrófagos. Em seguida, o grupo 1 foi cultivado *overnight* com meio de cultura celular contendo SD (10 μg/mL); e os grupos 2 e 3 foram cultivados com meio de cultura celular fresco. Após lavagem com PBS, as MPs contendo 5-ASA marcada com corante fluorescente (FITC) foram dispersas em DMEM, adicionadas a cada poço e incubadas

por 2 h. Por fim, as mesmas foram removidas através da lavagem com PBS (3x), seguido pela observação de fluorescência das células (Li *et al.*, 2021).

4.19. Análise estatística

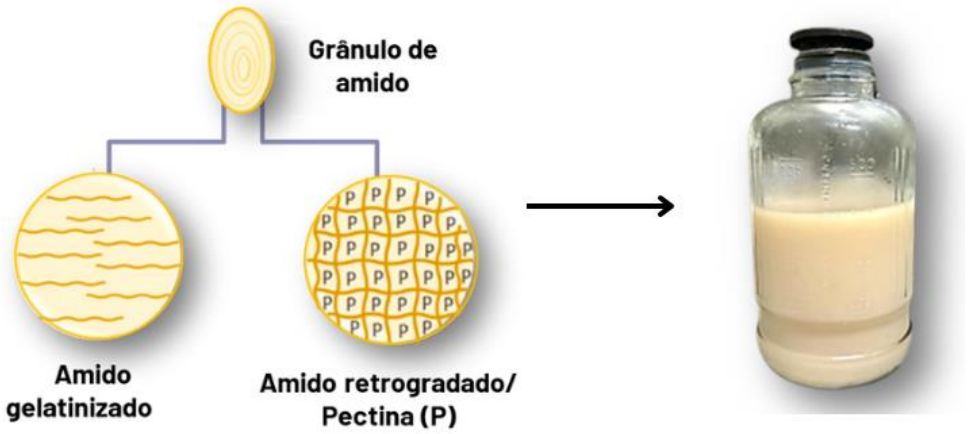
Todos os resultados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão de pelo menos três réplicas independentes. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., EUA). Esta abordagem estatística garante uma avaliação rigorosa da variabilidade entre formulações e apoia a reprodutibilidade e fiabilidade do comportamento de libertação desencadeado pela redox observado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Retrogradação do amido em associação à pectina

A retrogradação do amido foi realizada através de tratamento hidrotérmico na presença de pectina de baixo GE. O processo de retrogradação consiste em duas etapas: a etapa de gelatinização se dá pelo aquecimento e intumescimento do amido na presença de água, seguido de reassociação mais ordenada das cadeias de amilose e amilopectina, formando uma pasta de amido gelatinizada; já a etapa de retrogradação consiste em uma lenta recristalização dos componentes do amido através de armazenamento e resfriamento, formando uma rede tridimensional mais empacotada e protegida contra o ataque enzimático. Por fim, são verificadas diversas alterações físicas, como formação de gel, aumento de viscosidade, turbidez do meio, exsudação da água e aumento do grau de cristalinidade, como indicado na Figura 16 (Wang *et al.*, 2015).

Figura 16 - Esquema ilustrativo demonstrando o processo de obtenção do amido retrogradado e imagem fotográfica da dispersão de AR a 12,5% (m/v) com pectina de baixo GM na proporção 1:4



Fonte: Autoria própria (2024)

5.2. Microencapsulação do 5-ASA por geleificação ionotrópica e rendimento do processo

A microencapsulação do 5-ASA a partir da dispersão AR/P de baixo GE na proporção 1:4 juntamente com SD em diferentes concentrações foi realizada pelo método de geleificação ionotrópica (Figura 17). As MPs foram secas em estufa durante 24 horas e mantidas em dessecador até que a massa não sofresse mais alteração.

Figura 17 - Representação esquemática do método de geleificação ionotrópica para a formação de MPs

Fonte: Autoria própria (2025)

Conforme observado na Tabela 2, o processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica apresentou elevado rendimento, o qual variou entre 74,64 e 82,53% quando submetido à reticulação física, e rendimento entre 68,39 e 76,17% nos casos de dupla reticulação. Essa breve redução nos valores de rendimento do processo após dupla reticulação ocorreram devido ao maior tempo de contato das MPs com a solução reticulante, o que implica em maiores perdas inerentes do processo, além de perdas de fármaco e da própria dispersão polimérica, devido ao maior tempo em contato com a solução reticulante. Além disso, os aumentos na concentração de SD não interferiram significativamente no rendimento final do processo das amostras reticuladas fisicamente nem nas amostras submetidas à dupla reticulação ($p>0,05$).

Tabela 3 - Rendimento do processo (%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD e 5-ASA (0,5 e 1,0%) reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por geleificação ionotrópica (média ± desvio padrão, n =3).

Amostras	Média ± DP (%)
1:1F	74,64 ± 2,45
1:2F	82,53 ± 3,27
2:1F	79,91 ± 3,69
2:2F	81,28 ± 3,14
1:1D	68,39 ± 2,88
1:2D	76,17 ± 2,94
2:1D	70,69 ± 3,01
2:2D	75,86 ± 2,75

Fonte: Autoria própria *(*2025)

5.2.1. Otimização do tempo de reticulação

A reticulação física é um processo utilizado em compostos poliméricos para promover a formação de uma rede tridimensional que pode ocorrer através de interações supramoleculares entre os compostos em solução, como por exemplo forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou complexação iônica. Nesse caso, o reticulante iônico utilizado foi o $AlCl_3$, o qual interage com os grupos funcionais dos polímeros e do fármaco, formando ligações iônicas e implicando na formação das MPs. Esse processo é muito utilizado para modificações de polímeros visando a liberação controlada uma vez que melhora propriedades como propriedades mecânicas, estabilidade, durabilidade e características estruturais dos materiais em questão.

No sistema em questão, os cátions Al^{3+} em solução interagem por meio de ligações iônicas com as cadeias dos polímeros pectina (COO^-) e SD (SO^{3-}), bem como do 5-ASA (COO^-), os quais possuem cargas negativas devido ao pH reacional ajustado para 6,0. Este processo leva à formação de uma matriz tridimensional capaz de aprisionar as moléculas de fármaco em seu interior. Por outro lado, o SD não forma uma estrutura típica de "*egg box*" como a pectina (Fig. 8), pois sua estrutura química e organização espacial são diferentes. É sabido que o SD pode interagir com cátions metálicos polivalentes (como Ca^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, e Al^{3+}); porém, essas interações são mais difusas e distribuídas ao longo da cadeia polimérica, como discutido por Kim e Kang (2020) em suas pesquisas envolvendo o desenvolvimento de um nanocomplexo de bupivacaína com SD para liberação parenteral prolongada.

Considerando tais informações e sabendo que diferentes tempos de reticulação química podem influenciar em diversos fatores, como nos valores de EE%, na deposição de moléculas de fármaco na superfície da MP e na toxicidade do alumínio para o sistema, dois tempos de reticulação foram empregados, sendo eles 5 e 30 min, de acordo com o apresentado na seção de metodologia.

De acordo com a Tabela 3, de 14,59 a 38,70% de 5-ASA foram lixiviados para a solução reticulante, sendo que o maior tempo de reticulação ocasionou maior lixiviação do fármaco 5-ASA, resultados estes que impactam negativamente na EE%. Por essa razão, o tempo de 5 min foi selecionado para a produção das MPs. Além disso, de 1,83 a 24,58% de fármaco foram também lixiviados durante a etapa de lavagem, sugerindo que uma parte do fármaco se encontrava adsorvida à superfície das MPs e não microencapsulado. Esse fato demonstra a importância da etapa de lavagem de sistemas de liberação prolongada em desenvolvimento, uma vez que moléculas de fármaco livre na superfície podem impactar na performance dos sistemas desenvolvidos através da dissolução prematura de 5-ASA.

Tabela 4 - Valores do percentual (%) de 5-ASA presente na solução reticulante de $AlCl_3$ após 5 e 30 minutos de reticulação física, bem como presente na solução de lavagem das MPs recuperadas anteriormente à secagem em estufa e após 5 minutos de reticulação com AFD. Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± DP**).**

Amostra	Tempo de reticulação (min)	5-ASA na solução reticulante (%)	5-ASA na solução de lavagem (%)	5-ASA após reticulação química em AFD (%)	Total de 5-ASA lixiviado (%)
1:1F	30	37,80 ± 1,27	24,06 ± 1,72	-	61,86 ± 0,63
2:1F	30	38,70 ± 1,46	24,58 ± 1,03	-	63,28 ± 0,89
1:2F	30	22,29 ± 1,98	12,98 ± 0,89	-	35,27 ± 0,97
2:2F	30	22,96 ± 0,93	13,24 ± 1,36	-	36,20 ± 1,16
1:1D	5	20,12 ± 1,05	2,74 ± 2,01	4,47 ± 1,04	27,33 ± 1,48
2:1D	5	19,02 ± 1,22	2,20 ± 1,49	4,41 ± 0,87	25,63 ± 0,75
1:2D	5	14,88 ± 1,89	1,83 ± 0,99	3,27 ± 1,15	19,98 ± 1,09
2:2D	5	14,59 ± 1,59	2,15 ± 0,73	2,95 ± 1,26	19,69 ± 0,92

Fonte: Autoria própria *(*2025)

Considerando que o pH de síntese foi corrigido para próximo de 6, o 5-ASA se encontra majoritariamente na forma negativa, como pode ser observado na Fig. 4, o que faz com que mais moléculas de fármaco sejam atraídas pelas cargas positivas da solução reticulante. Esse fato explica o aumento da quantidade de 5-ASA presente na solução de $AlCl_3$ à medida que o tempo de reticulação das MPs aumenta.

A reticulação química, assim como a reticulação física, é um processo no qual as moléculas presentes no sistema se ligam entre si formando uma rede tridimensional. No entanto, diferentemente da reticulação física, onde as interações ocorrem por forças supramoleculares, a reticulação química envolve ligações covalentes. Isso resulta na formação de um material mais resistente, mais estável e menos flexível e que apresenta a capacidade de liberar de maneira mais controlada a substância ativa em um local específico (Froelich *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2021).

O AFD, reticulante químico utilizado neste trabalho, contém em sua estrutura dois grupamentos boronatos ligados a um anel benzeno. É um composto que possui atividade antioxidante e é capaz de eliminar a excessiva presença de EROs na região inflamada através de ligações carbono- boro e ligações entre ácido fenilborônico e hidroxilas (Hoang; Smith; Raines, 2017; Zhao *et al.*, 2019). Além disso, a dupla reticulação permite uma interação química do AFD com moléculas que possuem grupos hidroxila ou amina, como o 5-ASA, fazendo com que as MPs apresentem uma resposta sensível às EROs, garantindo uma liberação mais controlada e direcionada do fármaco (Zhu *et al.*, 2023).

Como era de se esperar, durante a reticulação química das MPs em solução de AFD também houve perda de fármaco, porém em uma extensão menor e que não ultrapassou 4,47% (Tabela 3).

Dessa maneira, a otimização dos tempos de reticulação física e química podem ser considerados fatores cruciais que irão determinar não somente o rendimento e a EE%, mas também e, principalmente, as propriedades físico-químicas e funcionais dos sistemas de liberação. Tempos insuficientes de reticulação podem originar partículas com forma heterogênea, além de uma rede polimérica mais fraca, a qual pode ser responsável por maior porosidade, aumentando a hidratação e intumescimento e, consequentemente, resultar em liberação prematura do fármaco. Todos esses fatores serão devidamente investigados nas próximas seções.

5.3. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) após reticulação física e dupla reticulação das MPs

A EE% é um parâmetro utilizado para avaliar a eficácia do processo de encapsulamento de fármacos em sistemas de liberação controlada de fármacos, medindo a quantidade de substância ativa que realmente foi encapsulada em relação à quantidade total utilizada. Em relação ao processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica, vários são os fatores que podem influenciar a EE%, como por exemplo o tempo de reticulação, a concentração dos cátions utilizados como reticulante físico, o uso de polímeros com maior afinidade pelo fármaco, propriedades físico-químicas do fármaco utilizado, temperatura, pH e a utilização de outros agentes de reticulação que auxiliem na estabilidade de formação da MP. Apesar das perdas de substância ativa devido à lixiviação para o agente reticulante e à lavagem das MPs, a padronização do tempo de reticulação, aliada ao controle na utilização dos cátions e à escolha de concentrações adequadas de fármaco e polímeros, resulta em elevados valores de EE% (Jana *et al.*, 2022).

No estudo de Jana *et al.* (2022), sobre o desenvolvimento de microbeads de goma gelana/ Al^{3+} para liberação controlada de diclofenaco de sódio, verificou-se que o aumento da concentração de polímeros no sistema microparticulado promoveu aumento nos valores de EE%, de 34,50 para 90,54%. Adicionalemnte, em seu estudo, Boni, Prezotti e Stringhetti (2015) relataram que cátions trivalentes, como o Al^{3+}, favorecem uma maior interação com os polímeros, além da formação de uma matriz mais rígida, mesmo que com menores tempos de reticulação. Consequentemente, foram observadas EE% mais favoráveis, devido à carga positiva extra desses cátions em comparação com íons bivalentes, como o Ca^{2+}, por exemplo.

Dessa maneira, visando otimizar a EE% do fármaco 5-ASA nas MPs, foram avaliados o efeito do tempo e do tipo de reticulação, bem como das concentrações de DS e de 5-ASA

adicionadas às formulações. Primeiramente, são apresentados os resultados de EE% para as amostras reticuladas fisicamente (Tabela 4).

Tabela 5 - EE(%) do 5-ASA em MPs de AR/P contendo diferentes concentrações de SD e fármaco após processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica (reticulação física das MPs). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão).

Amostras	Tempo de reticulação física (min)	EE(%)
1:1F	30	32,461 ± 2,073
2:1F	30	32,851 ± 0,622
1:2F	30	43,413 ± 1,551
2:2F	30	45,816 ± 0,993
1:1F	5	59,846 ± 1,642
2:1F	5	72,874 ± 2,026
1:2F	5	63,921 ± 4,122
2:2F	5	73,639 ± 1,495

Fonte: Autoria própria *(*2025)

Conforme apresentado na Tabela 4, o método de geleificação ionotrópica originou MPs com elevados valores de EE%, os quais variaram entre 32,46 e 73,63%, em função da concentração de SD/5-ASA e tempo de reticulação. Os maiores percentuais foram observados para as amostras reticuladas fisicamente por apenas 5 min, em concordância com os dados obtidos anteriormente através da quantificação indireta da concentração de 5-ASA lixiviada para a solução de $AlCl_3$. Tanto nas amostras reticuladas por 5 minutos quanto nas reticuladas por 30 minutos, apenas o 5-ASA exerceu influência sobre a EE%, ou seja, em ambos os casos, quanto maior a concentração de 5-ASA presente na amostra, maiores os valores de EE% ($p<0,05$). Por outro lado, o aumento da concentração de SD não influenciou significativamente a EE% em nenhum dos tempos de reticulação ($p>0,05$).

A partir desses dados, é possível afirmar que a redução do tempo de reticulação e o aumento da concentração de 5-ASA influenciaram positivamente o aumento dos valores de EE% ($p<0,05$).

Considerando que o tempo de reticulação física foi o responsável mais significativo na variação dos valores de EE%, e que a perda de fármaco durante a reticulação química foi de apenas 2,9 a 4,4% (Tabela 3), avaliou-se também outros tempos de reticulação química (5, 10 e 20 min) (Tabela 5). Isso se deve ao fato de que tempos maiores de reticulação química

promovem a formação de redes poliméricas mais densas, as quais devem oferecer um melhor controle de liberação do fármaco.

Tabela 6 - EE% do fármaco 5-ASA em MPs AR/P contendo diferentes concentrações de SD e fármaco após processo de microencapsulação por geleificação ionotrópica (reticulação física) e química das MPs (dupla reticulação). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão).

Amostras	Tempo de reticulação física (min)	Tempo de reticulação química (min)	EE(%)
1:2D	5	20	19,093 ± 1,015
2:2D	5	20	29,925 ± 2,702
1:2D	5	10	20,960 ± 0,813
2:2D	5	10	33,978 ± 2,695
1:1D-A	5	5	43,248 ± 0,952
2:1D-A	5	5	59,739 ± 0,588
1:2D-A	5	5	61,653 ± 0,938
2:2D-A	5	5	76,789 ± 0,762

Fonte: Autoria própria *(*2025)

Apesar da dupla reticulação ter ocasionado a redução dos valores de EE% ($p<0,05$) em relação à reticulação física, os resultados obtidos ainda demonstram a viabilidade do método, uma vez que foram alcançados valores de EE% entre 19 e 76%. Observou-se que o aumento da concentração de SD nas amostras reticuladas quimicamente durante 10 e 20 minutos influenciou significativamente o aumento de EE% ($p<0,05$). Contudo, a redução do tempo de 20 para 10 min não influenciou os valores de EE% em nenhuma das amostras ($p>0,05$). Por sua vez, ao comparar os tempos de 20 e 5 min, bem como 10 e 5 min, constatou-se que a redução do tempo de reticulação em ambos os casos resultou em aumento significativo da EE% ($p<0,05$). Entre as amostras reticuladas quimicamente durante 5 minutos, tanto o aumento de 5-ASA como o aumento de SD influenciaram significativamente o aumento da EE% ($p<0,05$). Esse efeito pode ser atribuído ao aumento de interações supramoleculares entre o fármaco, SD e demais polímeros, implicando na construção de uma rede polimérica mais estruturada, promotora de um maior aprisionamento de 5-ASA no interior da MP.

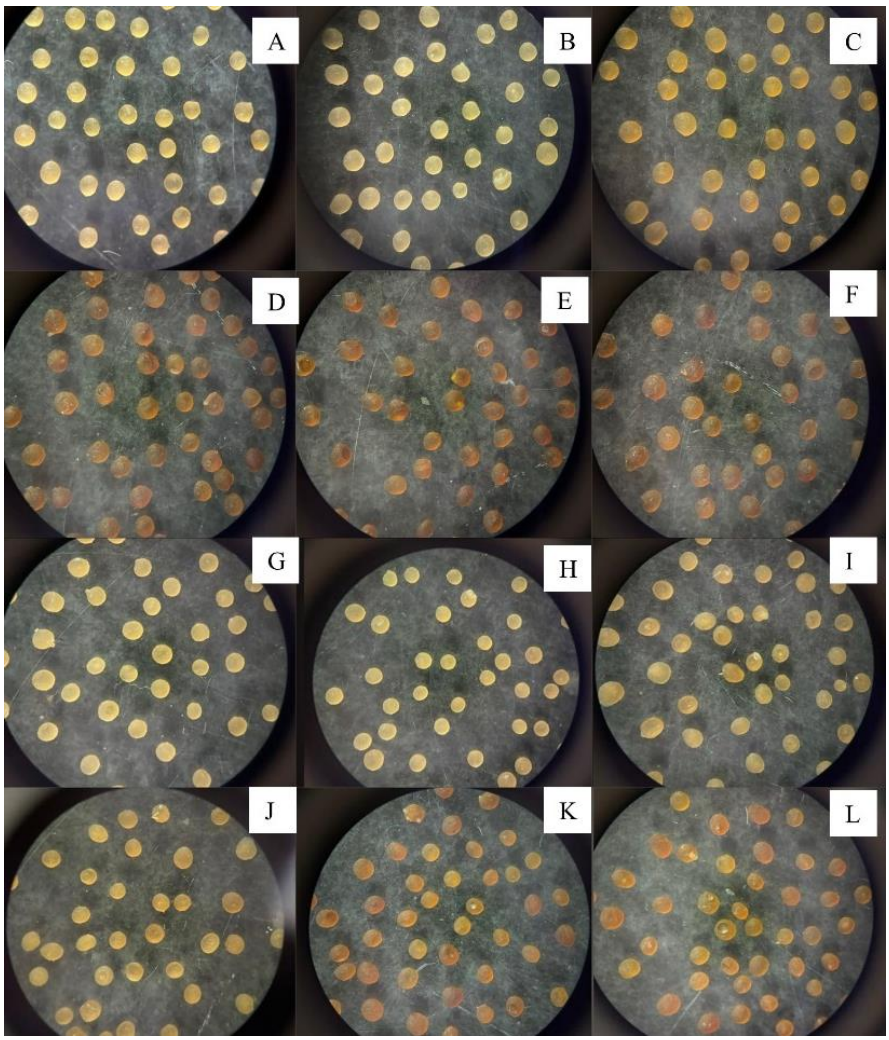
Considerando os resultados acima apresentados, os tempos de 5 minutos para reticulação física e química foram padronizados, e as próximas análises foram realizadas com as MPs obtidas a partir dessas variáveis.

5.4. Análise de tamanho, forma e morfologia das micropartículas

5.4.1. Análise de tamanho e forma

O controle do tamanho e da forma das MPs é extremamente importante durante a etapa de desenvolvimento, pois esses parâmetros interferem na reprodutibilidade de fatores como liberação, absorção e biodisponibilidade do fármaco, acelerando ou retardando tais processos, dependendo do tamanho e forma das partículas produzidas (Khafagy *et al.*, 2007). Para avaliação desses dois parâmetros, mediu-se o diâmetro de Feret e o grau de circularidade, a fim de avaliar a regularidade da partícula, sendo que valores iguais a 1,0 indicam um círculo perfeito (Barreiros; Ferreira; Figueiredo, 1996). As imagens das amostras controle (sem o fármaco), das contendo 5-ASA reticuladas fisicamente e por dupla reticulação, podem ser analisadas na Figura 18.

Figura 18 - Imagem das MPs reticuladas fisicamente (A-F), bem como obtidas por reticulação dupla (reticulação física e química) (G—L), obtidas em Esterioscópio Leica no aumento de 10x, sendo 1F (**A**); 2F (**B**); 1:1F (**C**); 2:1F (**D**); 1:2F (**E**); 2:2F (**F**); 1D (**G**); 2D (**H**); 1:1D (**I**); 2:1D (**J**); 1:2D (**K**); 2:2D **(L**)



Fonte: Autoria Própria (2025)

De acordo com as fotomicrografias apresentadas na Figura 18, pode-se observar claramente diferenças macroscópicas entre as MPs controle e contendo fármaco, bem como entre os tipos de reticulação. As MPs controle (Fig. 18A-C e G-I) apresentaram coloração amarelada, característica dos polímeros utilizados, enquanto as amostras contendo 5-ASA (Fig. 18D-F e J-L) apresentaram coloração mais amarronzada, o que é atribuído ao fármaco, sendo que, quanto maior a concentração de fármaco nas MPs, mais escura a amostra (Fig. 18E-F e K-L). Macroscopicamente, tanto as MPs obtidas por reticulação física como as obtidas por dupla reticulação não demonstraram diferenças significativas em seu formato.

A Tabela 6 apresenta os resultados da circularidade e diâmetro de Feret obtidos a partir da digitalização das fotomicrografias apresentadas anteriormente.

Tabela 7 - Valores de circularidade e diâmetro de Feret das MPs, obtidos a partir da digitalização das imagens obtidas em Esterioscópio Leica, no aumento de 10x.

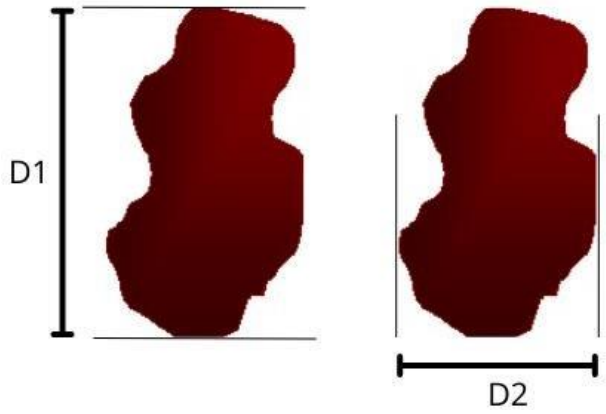
Amostra	Circularidade	Diâmetro de Feret (µm)
1F	0,937 ± 0,055	1332 ± 3,455
2F	0,933 ± 0,063	1367 ± 3,621
1:1F	0,942 ± 0,059	1425 ± 2,839
2:1F	0,949 ± 0,057	1398 ± 2,964
1:2F	0,931 ± 0,054	1441 ± 3,373
2:2F	0,952 ± 0,040	1440 ± 2,687
1D	0,939 ± 0,059	1388 ± 3,765
2D	0,931 ± 0,066	1353 ± 3,521
1:1D	0,947 ± 0,058	1426 ± 2,668
2:1D	0,929 ± 0,048	1419 ± 2,752
1:2D	0,937 ± 0,046	1432 ± 3,458
2:2D	0,934 ± 0,052	1448 ± 2,967

Fonte: Autoria Própria (2025)

Como partículas irregulares não possuem uma forma geométrica bem definida, a determinação de suas dimensões é dificultada. Ou seja, muitas vezes não há um único diâmetro ou comprimento que represente seu tamanho. Por isso, uma das estratégias adotadas é a medição em várias direções, utilizando ferramentas como o diâmetro de Feret. O diâmetro de Feret corresponde ao comprimento entre duas linhas paralelas tangentes à região externa de interesse da partícula, ou seja, à projeção da partícula (Bianconi; Fravolini; Palumba, 2023). Como pode

ser observado na Figura 19, com as distâncias mínima (D2) e máxima (D1) obtidas, calcula-se uma média, e o resultado desse cálculo é o diâmetro de Feret da partícula.

Figura 19 - Representação dos diâmetros Feret mínimo (D2) e Feret Máximo (D1)



Fonte: Autoria própria (2025)

Dessa maneira, as amostras reticuladas fisicamente apresentaram circularidade entre 0,933 e 0,952 e diâmetro de Feret entre 1332 µm e 1440 µm (Tab. 6). Já as amostras submetidas à dupla reticulação apresentaram circularidade entre 0,929 e 0,947, tendo o diâmetro de Feret se apresentado aproximadamente semelhante entre 1319 µm e 1448 µm. Com esses resultados, observou-se que as MPs submetidas à dupla reticulação tiveram uma leve redução da circularidade, como também observado no trabalho de Correa *et al.* (2021). Esses achados se relacionam com vários fatores, mas principalmente à contração diferencial da matriz polimérica devido à reticulação mais intensa promovida pela reticulação química, ocasionando retração superior e irregular da matriz, além de desidratação das MPs durante a filtração antes da reticulação química.

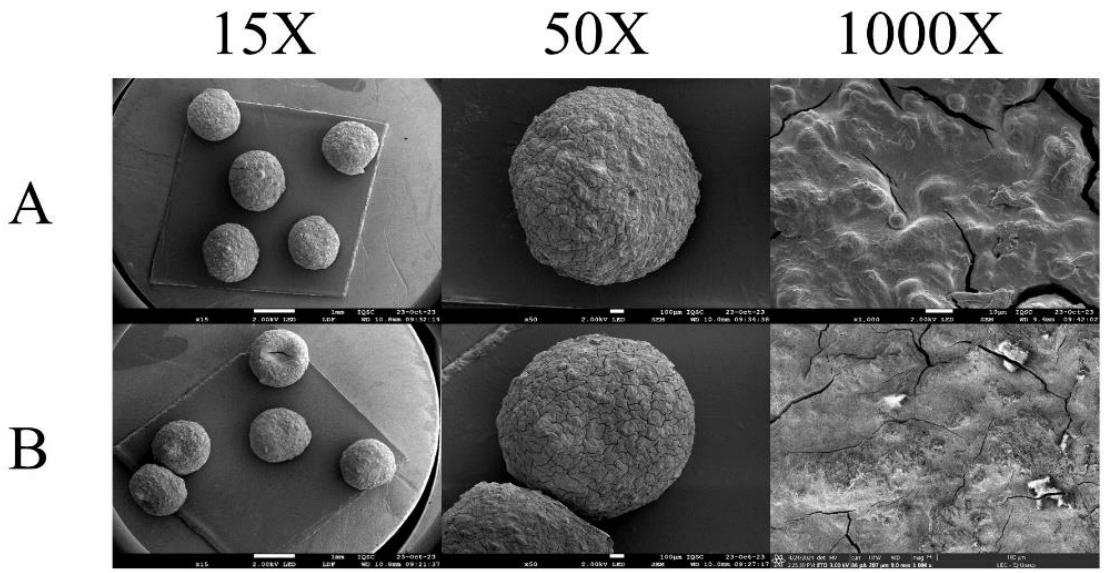
A adição de fármaco levou ao aumento de tamanho das MPs. Isso provavelmente está relacionado ao aumento da rede tridimensional formada, implicando em aumento de diâmetro das MPs.

5.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

Nas Figuras 20 e 21, referentes às fotomicrografias das MPs reticuladas fisicamente nos tempos de 30 e 5 min, respectivamente, e na Figura 22, relativo às fotomicrografias das MPs reticuladas física e quimicamente durante 5 minutos cada, pôde-se visualizar que as MPs obtidas apresentaram formato altamente esférico. A superfície de todas demonstrou rugosidade acentuada e características similares entre as diferentes amostras, mesmo naquelas submetidas à reticulação química. No entanto, é importante destacar que o maior tempo de reticulação física

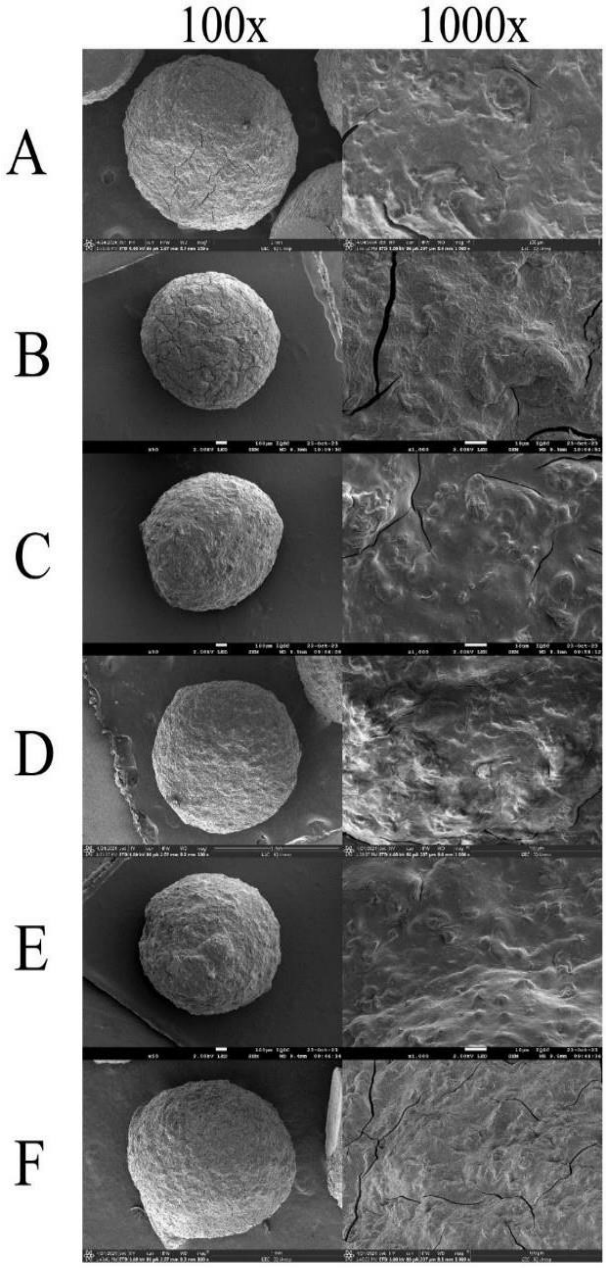
(30 minutos) implicou em maior quantidade de rachaduras na superfície das MPs (Fig. 20A-B), as quais também apresentaram maior abertura em relação àquelas ocasionadas pela reticulação de 5 minutos (Fig. 21A-F). Esse fato pode implicar na liberação prematura do fármaco, apesar da estrutura tridimensional mais densa promovida pelos maiores tempos de reticulação. Tal achado corrobora os resultados apresentados na seção 5.2.1, em que maiores quantidades de 5-ASA foram lixiviadas para a solução reticulante, reduzindo a EE%. Como já abordado anteriormente, tempos de reticulação mais longos são responsáveis pela reticulação mais intensa da rede polimérica, o que apesar de ser vantajoso do ponto de vista de estruturação tridimensional e performance, pode ocasionar falhas nas MPs como visto nesse trabalho. Isso porque durante o estabelecimento de ligações cruzadas mais intensas e maiores em número, a matriz pode sofrer contração, o que é proporcional ao tempo de reticulação. Assim, a estrutura polimérica encolhida e menos flexível gera tensões internas que favorecem a formação de rachaduras e poros.

Figura 20 - Fotomicrografia das MPs AR/P/SD reticuladas fisicamente durante 30 minutos, nos aumentos de 15x, 50x e 1000x, sendo **A)** 1:1F e **B)** 2:1F.



Fonte: Autoria Própria (2025)

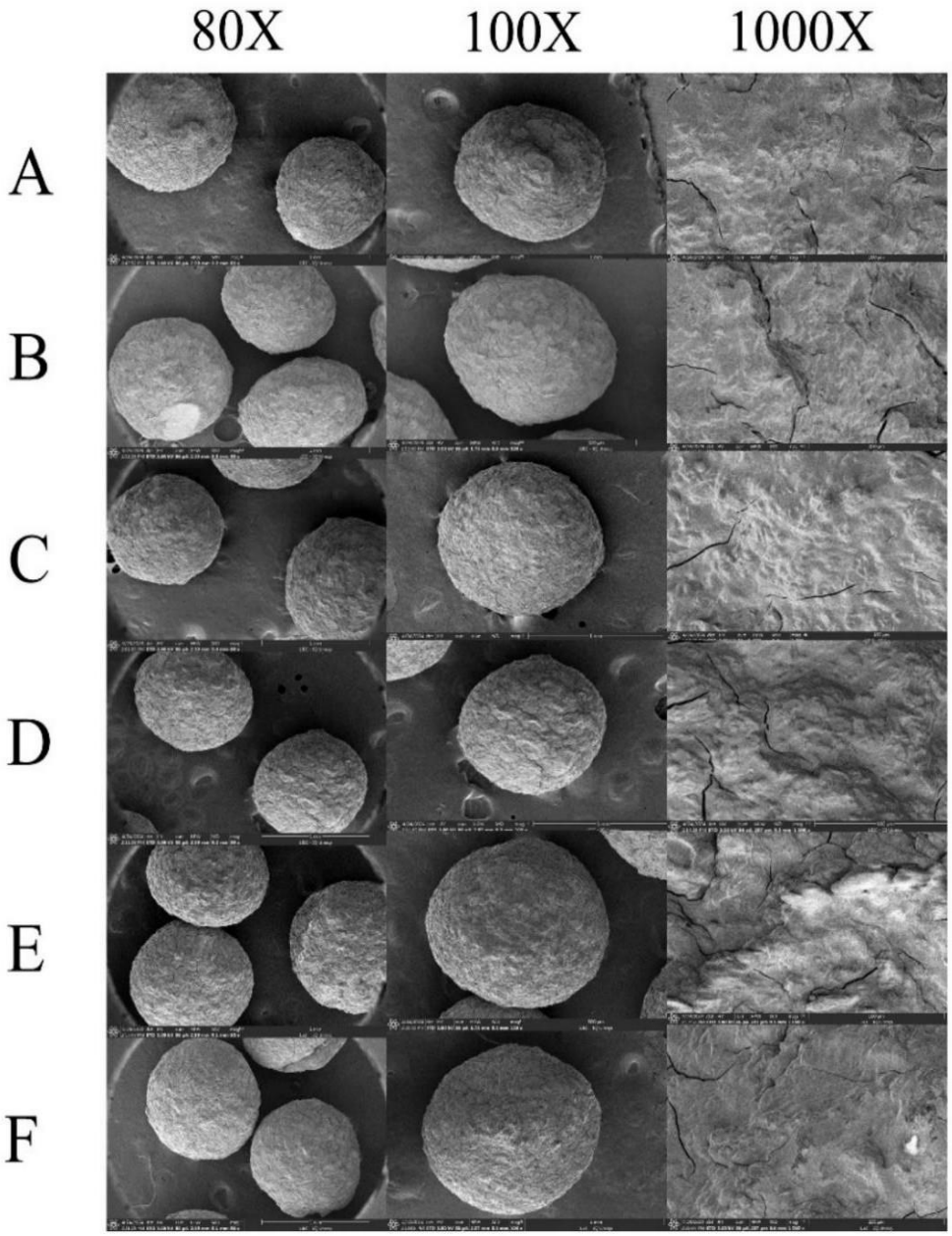
Figura 21 - Fotomicrografia das MPs AR/P/SD reticuladas fisicamente durante 5 minutos, nos aumentos de 100x e 1000x, sendo **A)** 1F; **B)** 2F; **C)** 1:1F; **D)** 1:2F; **E)** 2:1F e **F)** 2:2F.



Fonte: Autoria Própria (2025)

Jana *et al.* (2022) e Prezotti *et al.* (2014) desenvolveram em seus trabalhos MPs à base de goma gelana reticuladas ionicamente com Al^{3+} e em ambos os casos as microesferas obtidas apresentaram superfície bem rugosa, como observado no presente trabalho; isso pode estar relacionado ao colapso moderado da rede de gel durante a secagem das MPs. Já nos trabalhos de (BONI, 2014), comportamentos semelhantes aos ocorridos acima também foram observados, onde em ambos os casos o aumento da concentração de solução reticulante implicou em uma superfície mais rugosa e porosa das MPs obtidas.

Figura 22 - Fotomicrografia das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química), nos aumentos de 80x, 100x e 1000x, sendo A: 1D; B: 2D; C: 1:1D; D: 1:2D; E: 2:1D; F: 2:2D.



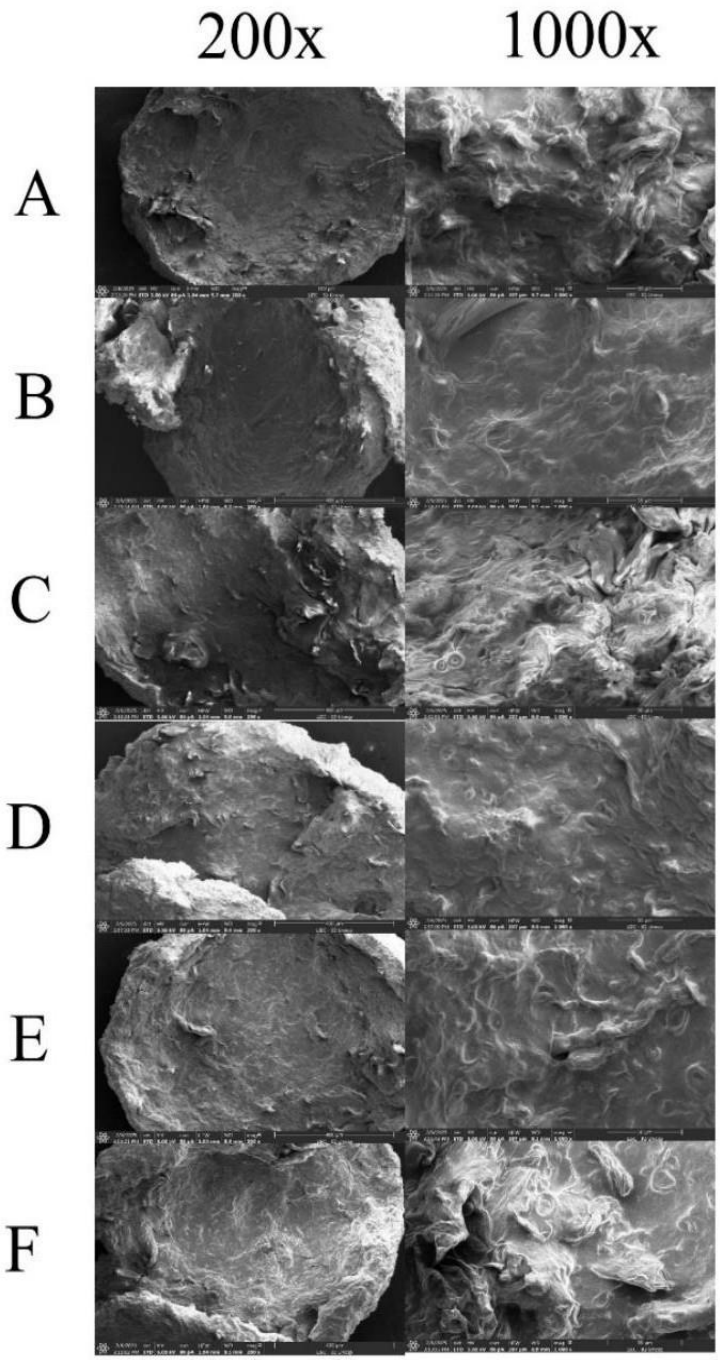
Fonte: Autoria Própria (2025)

Interessantemente, a reticulação química (Fig. 22) não alterou a superfície das MPs, nem a quantidade e espessura das rachaduras observadas em comparação às amostras reticuladas ionicamente por 5 minutos (Fig. 21).

A análise das seções transversais das amostras submetidas à dupla reticulação, apresentada na Figura 23, revela uma matriz contínua e rugosa em todas as formulações, sem a presença de um núcleo definido (característica típica de microcápsulas), assim como a ausência de fármaco na forma cristalina, poros ou rachaduras. Esses achados confirmam que o sistema

obtido trata-se de uma microesfera, e não uma microcápsula, uma vez que não há separação estrutural entre núcleo e revestimento.

Figura 23 - Fotomicrografia de secção transversal das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química) nos aumentos de 200x e 1000x, sendo **A)** 1D; **B)** 2D; **C)** 1:1D; **D)** 1:2D; **E)** 2:1D; e **F)** 2:2D.

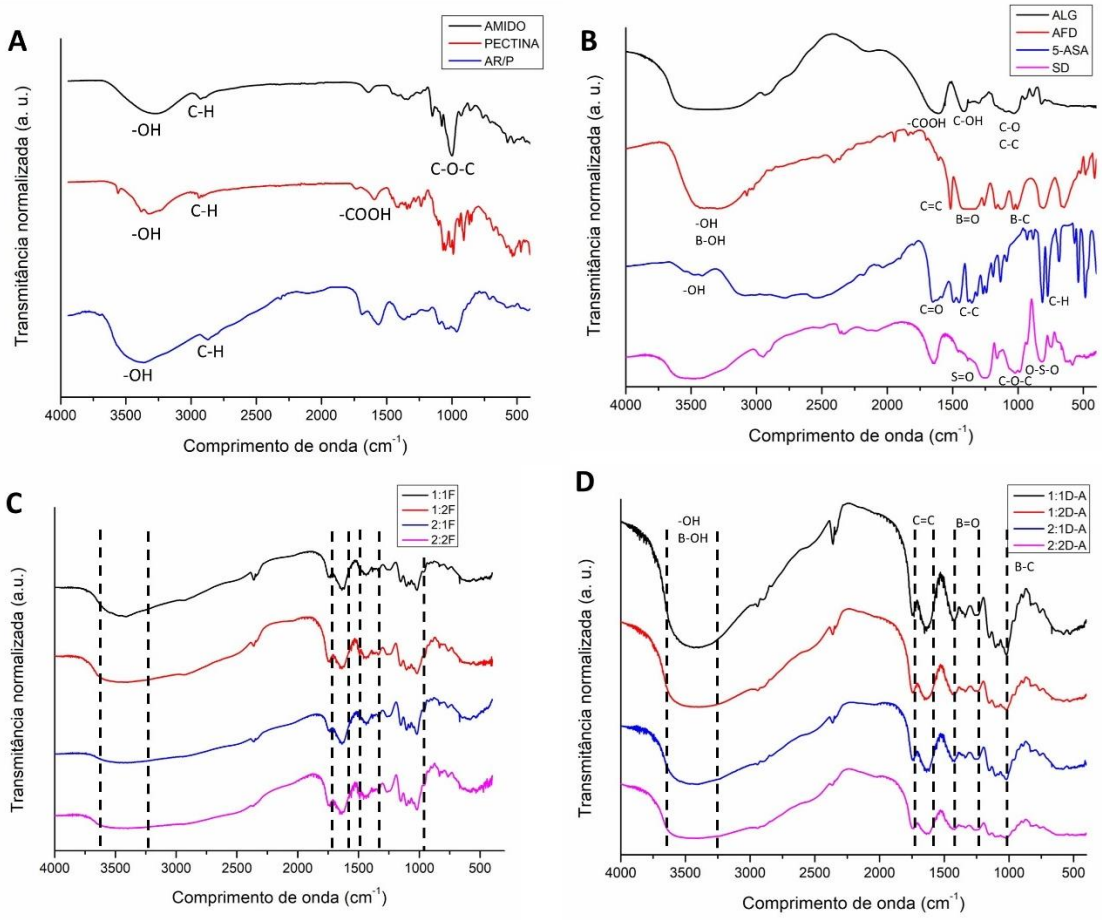


Fonte: Autoria Própria (2025)

5.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é utilizada para a identificação de substância e interação destas por meio da análise de estiramentos característicos dos grupos funcionais presentes. Para as MPs obtidas por geleificação ionótropica e reticuladas quimicamente com AFD, essa técnica é uma importante ferramenta para a avaliação das interações entre esses componentes, permitindo a detecção de possíveis ligações ou modificações nas estruturas químicas, como a formação de complexos ou alterações nos grupos funcionais, o que contribui para a compreensão do comportamento das partículas em sistemas de liberação controlada. Os espectros FTIR das amostras e de seus precursores estão representados na Figura 24 (A-D).

Figura 24 - Espectros FTIR das MPs e de seus componentes isolados



Fonte: Autoria Própria (2025)

As principais bandas observadas no espectro do amido (Fig. 24A) podem ser atribuídas ao estiramento de grupamentos –OH (3600-3000 cm^{-1}), estiramento C–H de grupos CH_2 e CH_3

(2926 cm^{-1}), grupo C–O–C pertencente à glicose do amido em 1040 cm^{-1}, e na região de 1648 cm^{-1}, indicando a presença de água fortemente ligada (Wang *et al.*, 2015).

A pectina (Fig. 24B) exibiu uma larga banda entre 3600 e 3100 cm^{-1}, que ocorre devido ao estiramento de grupamentos hidroxila (–OH), associados à presença de água e que podem formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Gnanasambandam; Proctor, 2000). O estiramento simétrico e assimétrico C–H de grupos CH_2 remete às bandas entre 3000 e 2800 cm^{-1}. Já as bandas vibracionais em 1740 e 1620 cm^{-1} são referentes aos estiramentos de grupamentos carboxílicos metil esterificados (C=O) e aos grupos carboxilatos (COO^-), respectivamente. Por fim, bandas em aproximadamente 1102, 1050 e 990 cm^{-1} são atribuídas à piranose e correspondem ao *fingerprint* de polissacarídeos (Meneguin *et al.*, 2024).

Por sua vez, ainda na Fig. 24A o espectro do AR/P possui semelhanças com os espectros do A e da P, como o estiramento entre 3600-3100 cm^{-1} referente aos grupamentos -OH; e estiramento C–H de grupos CH_2 e CH_3 em 2926 cm^{-1}. A fim de comprovar o processo de retrogradação, esse mesmo espectro apresenta alterações na banda de 1040 cm^{-1}, cuja intensidade aumenta, característica essa indicativa de reorganização das cadeias de amilopectina, indicativo de retrogradação. Além dela, também foi observado um aumento da intensidade da banda em 1650 cm^{-1}, que está relacionado às vibrações do grupamento O-H da água, uma vez que as interações entre moléculas de água e cadeias de amido podem ser alteradas durante a retrogradação (Wang *et al.*, 2015).

No espectro do 5-ASA (Fig. 24B), observam-se bandas em 3470 cm^{-1}, que remetem às ligações –OH e uma deformação em 2552 cm^{-1} referente ao grupamento NH_2. Já o estiramento na região entre 1620 e 1580 cm^{-1} ocorre devido à ligação C=O e C–C, respectivamente. Por fim, as deformações fora do plano de C–H em anéis aromáticos foram observadas nas regiões de 817, 769 e 680 cm^{-1} (Alves *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2018).

Já o SD (Fig. 24B) apresentou bandas características em 1220 cm^{-1} e 979 cm^{-1}, referentes à dupla ligação S=O; 1157 cm^{-1}, que indica a ligação C–O–C; 1014 cm^{-1}, o qual ocorre devido às ligações C–C e C=O; 931 cm^{-1} (ligação C–H); 802 cm^{-1} (ligação O–S–O); e em 742 cm^{-1}, indicativo de mais ligações C–H (Wu *et al.*, 2018).

No espectro do alginato (Fig. 24B) foi possível observar bandas características em 1600 cm^{-1}, referente ao ânion carboxilato (COO^-); em 1409 cm^{-1} indicando as ligações C–OH; em 1083 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} indicando, respectivamente, as ligações C–O e C–C pertencentes ao anel piranose; e por fim, as bandas 944 cm^{-1}, 878 cm^{-1} e 817 cm^{-1} referem-se aos picos relacionados

a resíduos ácidos presentes no alginato, sendo respectivamente os ácidos urônicos, ácidos betas manurônicos e ácidos manurônicos (Gómez-Ordóñez; Rupérez, 2011).

O AFD (Fig. 24B) apresentou uma banda larga entre 3420-3250 cm^{-1} relacionado às ligações O–H, bem como ao alongamento B–OH devido às ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos borônicos. Em 2930 cm^{-1} e 1630 cm^{-1}, atribuídos às ligações C–H e ao grupo carbonila, respectivamente; em 1614 cm^{-1} uma banda característica do alongamento C=C do anel aromático. Além destes, também foram observadas bandas vibracionais assimétricas das ligações B–O na faixa de 1400-1300 cm^{-1} e B–C entre 1200-800 cm^{-1}, que são característicos dos compostos bóricos, e uma flexão no plano de O–H em 1000 cm^{-1} atribuído ao estiramento B–O (Wang *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2023).

Para avaliar a reticulação química com o AFD, ou seja, o estabelecimento de ligações cruzadas por meio de ligações covalentes, é fundamental considerar que o AFD contém dois grupos borônicos ($–B(OH)_2$), conhecidos por sua capacidade de formar ligações covalentes reversíveis com dióis *cis*- vicinais. Com base nessa propriedade, levanta-se a hipótese de que o AFD pode formar ligações covalentes reversíveis com o amido e a pectina, enquanto o SD pode reduzir a disponibilidade de hidroxilas livres para complexação. Isso ocorre porque o amido é composto por unidades de glicose com ligações α-1,4 nas cadeias lineares de amilose e α-1,4 e α-1,6 nas cadeiras ramificadas de amilopectina, contendo vários grupos hidroxila *cis*-vicinais, que podem interagir covalentemente com o AFD, formando complexos boronato. Da mesma forma, a pectina contém unidades de ácido galacturônico, das quais menos de 50% estão metoxiladas, considerando que, neste estudo foi utilizada a pectina de baixo GE. Esse fator pode influenciar a reatividade, uma vez que as unidades não metoxiladas apresentam hidroxilas próximas, permitindo a interação com os grupos borônicos. Por outro lado, a dextrana é um polissacarídeo ramificado de glicose com ligações α-1,6 na cadeia principal e ramificações variáveis (α-1,3, α-1,4 ou α-1,2) dependendo da bactéria produtora.O SD contém grupos sulfato ($–OSO_3^-$), que podem reduzir a quantidade de hidroxilas livres disponíveis para a interação com o ácido borônico. Embora a dextrana pura possa interagir com o ácido borônico, a presença dos grupos sulfato pode dificultar essa ligação (Williams; Kedge; Fossey, 2021).

Sabendo disso e observando os espectros das amostras reticuladas com AFD, foi possível observar várias semelhanças quando estas foram comparadas aos espectros dos polissacarídeos naturais e dos outros constituintes das MPs, com algumas importantes diferenças. A fim de sugerir a reticulação química, foram observadas nas amostras reticuladas quimicamente (Fig. 24C) a banda característica em 1614 cm^{-1}, além de bandas mais evidentes

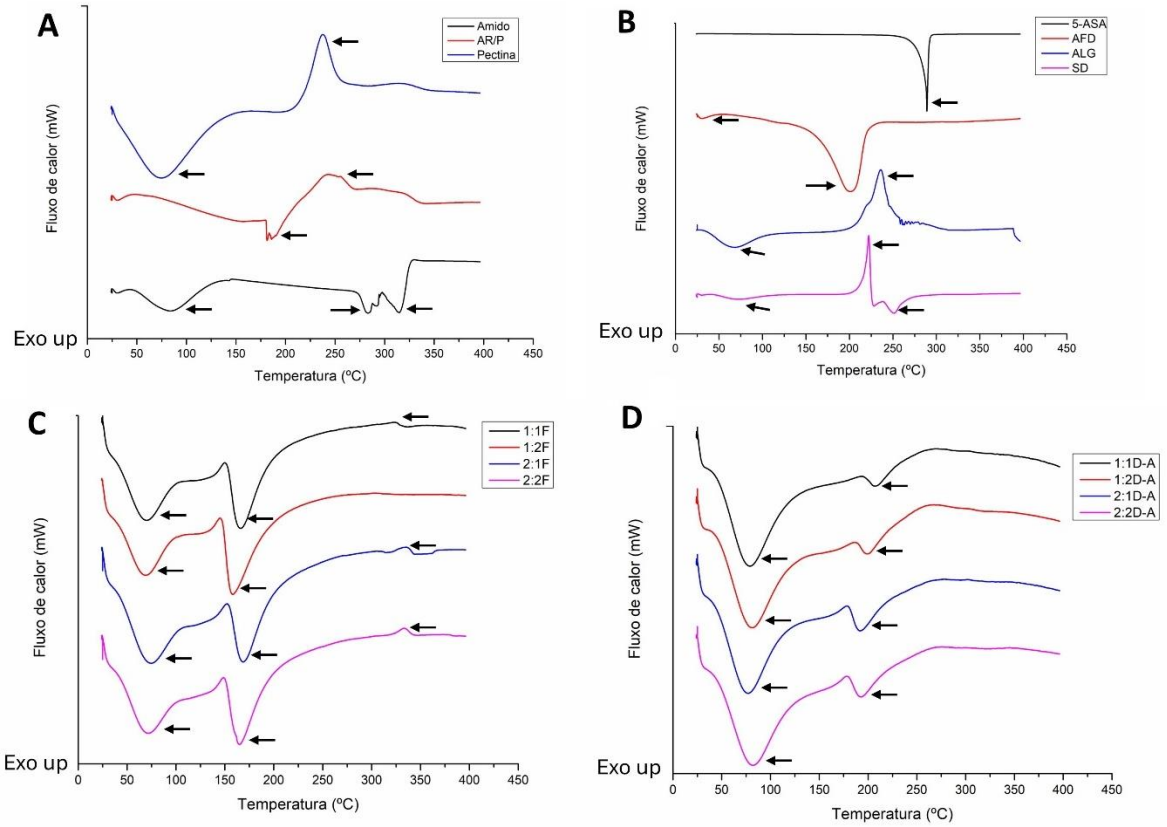
em 1400-1300 cm^{-1} e 1020 cm^{-1}, o que caracteriza a presença de grupos B–O e B–C, respectivamente (Zhu *et al.*, 2023). Quanto à banda em 1614 cm^{-1}, é possível observar que ela se encontra bem mais intensa na Fig. 24D, apesar de também existir nos espectros da Fig. 24C. Tal comportamento é semelhante ao verificado no trabalho de Zhu *et al.* (2023) após reticulação química com AFD dos polímeros PVA e alginato e acontece devido à sobreposição de bandas semelhantes dos outros componentes nessa mesma região.

Além disso, confirmando o que foi observado no trabalho de Williams; Kedge; Fossey (2011), observou-se nas Fig. 24C,D que a intensidade da banda em 3400 cm^{-1} diminui com o aumento da concentração de 5-ASA e SD; isso ocorre porque a complexação é reduzida, já que os grupamentos hidroxila são substituídos pelos grupamentos sulfato do SD e porque essa banda também coincide com a do 5-ASA.

5.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de DSC é uma técnica térmica muito utilizada para sistemas poliméricos com fármacos a fim de medir a diferença de fluxo de calor entre as amostras e os compostos isolados enquanto ocorre variação de temperatura. Além disso, essa análise fornece dados sobre as transições físicas e reações químicas que o sistema sofre, por meio de picos na curva devido à liberação ou absorção de calor pela amostra. As curvas de DSC das amostras e de seus componentes isolados estão representados na Figura 25.

Figura 25 - Curvas de DSC das MPs e de seus componentes isolados



Fonte: Autoria Própria (2025)

Na curva do amido (Fig. 25A), três picos endotérmicos foram observados. O primeiro deles ocorreu a uma temperatura de 84 ºC, indicando desidratação do composto. Posteriormente, o amido mantém-se estável até 283 ºC e um processo de decomposição térmica é visualizado a partir de dois picos endotérmicos em 283 ºC e 315 ºC (Meneguin *et al*, 2021). Já a curva da pectina (Fig. 25A) mostrou um primeiro pico endotérmico em 75 ºC, referente à perda de água adsorvida. Posteriormente, um pico exotérmico é visualizado em 237 ºC e indica a degradação deste polissacarídeo, como também foi encontrado por Horvat; Novak (2020). Além disso, picos exotérmicos em 316 ºC observados referem-se à despolimerização das cadeias de pectina, indicando que a degradação ocorre em temperaturas mais altas (Meneguin *et al*., 2021). Na mistura da AR/P (Fig. 25A), observou-se um pico endotérmico em aproximadamente 181 ºC, o qual refere-se à evaporação de água ligada à estrutura polimérica. Por sua vez, em 243 ºC foi encontrado um pico exotérmico, característico de degradação térmica com eventos relativos à despolimerização das cadeias de pectina e decomposição da amilose do amido (André *et al.*, 2025).

A curva de DSC do 5-ASA (Fig. 25B) indicou a presença de um pico endotérmico intenso e bem definido em 288 ºC, referente ao ponto de fusão do fármaco e que demonstra sua

elevada pureza (André *et al.*, 2025). Por outro lado, é possível observar a presença de um leve pico endotérmico em 30 ºC na curva do AFD (Fig. 25B), indicativo de perda de água que estava adorsvida. Já em 200 ºC, vê-se um nítido e definido pico endotérmico que corresponde ao ponto de fusão do composto.

Para o ALG (Fig. 25B), observa-se na região entre 40 e 100 ºC ocorre perda de água ligada ao composto, com pico endotérmico máximo em 64 ºC. Já na região de 235 ºC, o pico exotérmico indica a degradação das cadeias poliméricas do ALG (Soares *et al.*, 2004). Por sua vez, a curva de DSC do SD (Fig. 25B) apresentou três picos. O primeiro, endotérmico, a 70 ºC representa a perda de água adsorvida; o segundo pico, exotérmico, a 222 ºC e 237 ºC, refere-se à degradação da estrutura e um pequeno pico endotérmico a 251 ºC para a temperatura de fusão do composto.

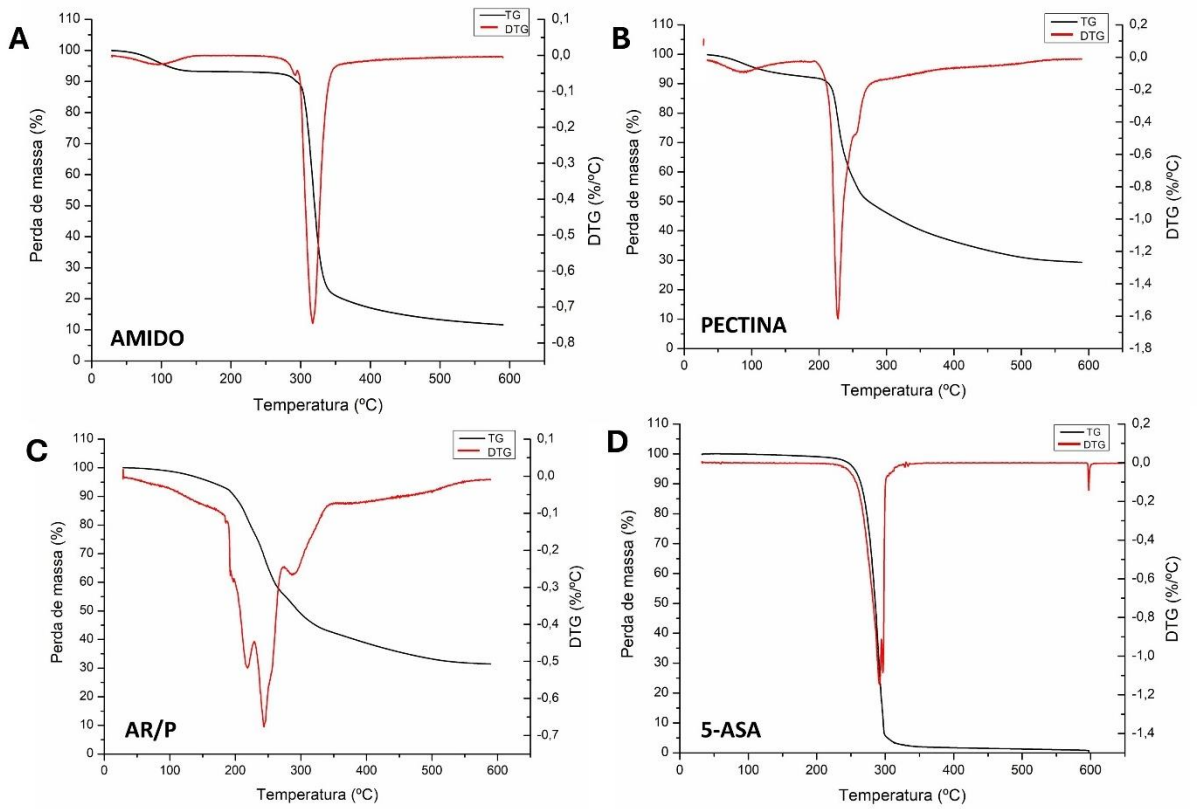
Na curva das amostras sem AFD (Fig. 25C), foi observado inicialmente um pico endotérmico entre 70 e 75 ºC referente à perda de água adsorvida à matriz polimérica, uma vez que os polímeros utilizados no sistema retêm água Outro pico endotérmico localizado próximo a 150 ºC nas amostras reticuladas fisicamente é observado, o qual deve estar relacionado à degradação polimérica, principalmente considerando que a pectina e o amido têm etapas de despolimerização e descarboxilação que começam em torno de 150 - 220 °C. Importantetemente, o pico de fusão do 5-ASA não foi observado nas MPs reticuladas com Al^{3+}, o que sugere seu encapsulamento efetivo nas MPs no estado molecular. Por fim, foram observados picos exotérmicos próximo à 335 ºC relacionados à degradação dos polímeros em temperaturas superiores ao verificado para os compostos isolados, sugerindo que a reticulação dos polímeros promoveu aumento de estabilidade térmica.

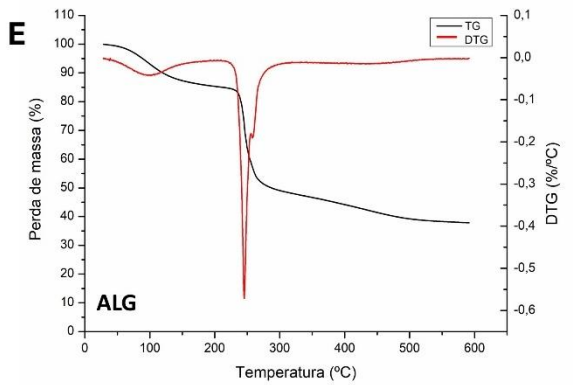
Na curva das amostras reticuladas duplamente (Fig. 25D), um pico endotérmico em 80 ºC foi observado e este indica a perda de água. Interessantemente, o pico próximo à 150 °C verificado para as amostras reticuladas fisicamente foi deslocado para temperaturas superiores, próximo à 200 °C, além de estar presente com menor intensidade, sugerindo uma rede polimérica termicamente mais estável e resistente, de modo que a quebra das cadeiras ocorre a temperaturas mais altas. Tal comportamento se deve a reticulação química com AFD que estabelece ligações adicionais (covalente), aumentando a coesão das cadeias e deslocando a decomposição para temperaturas superiores. Esse evento endotérmico também se refere, muito provavelmente, à dissociação parcial das ligações B-O ou reorganizações do complexo boronato, confirmando a ocorrência de reticulação covalente que altera a termofísica da matriz.

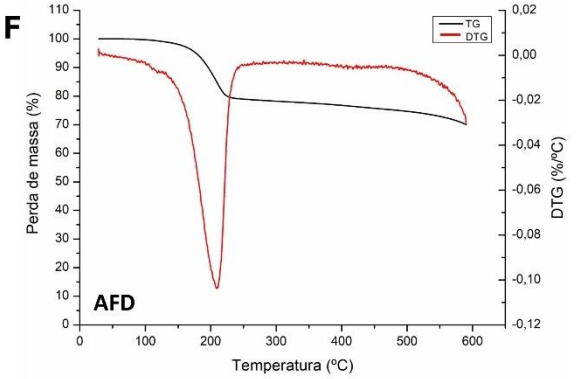
5.7. Análise termogravimétrica (TGA)

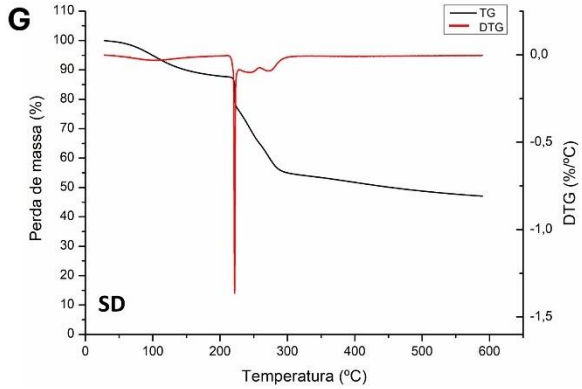
A TGA é uma técnica utilizada para caracterizar materiais através da variação da perda de massa em função da temperatura. Geralmente esse ensaio pode indicar a mistura polimérica em um sistema, através de diversas etapas de degradação; maior estabilidade térmica, por meio de maiores temperaturas de degradação; presença de um reticulante no sistema, devido ao deslocamento do sistema e perda de massa em temperaturas mais elevadas; e resíduo final mais alto, indicando que a estrutura reticulada foi formada. Sendo assim, a TGA demonstra o comportamento térmico de um sistema completo ou de seus compostos isolados, sugerindo sua estabilidade, pureza, reticulação e presença de interações químicas (Prime; Bair; Gallagher, 2009). Os termogramas de TGA das amostras e de seus componentes isolados estão representados na Figura 26.

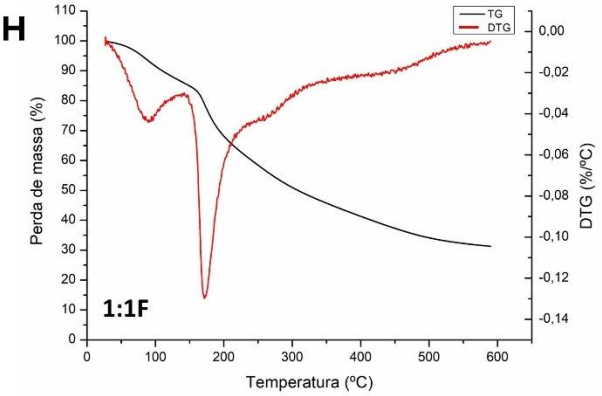
Figura 26 - Termogramas de TGA das MPs e de seus componentes isolados.

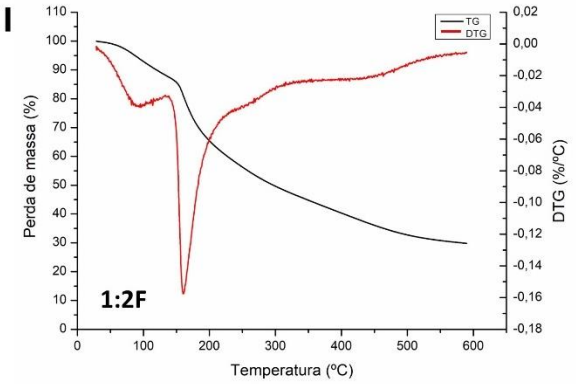


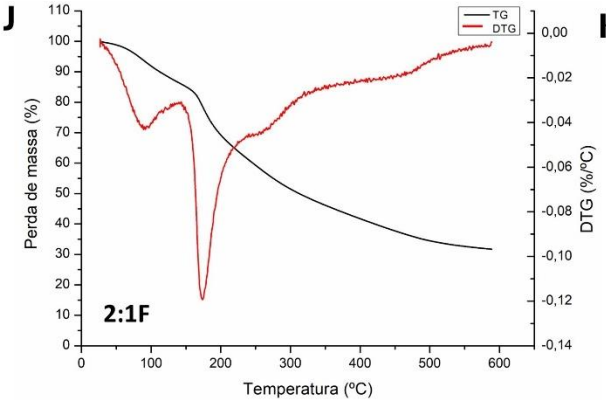

E
ALG
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)

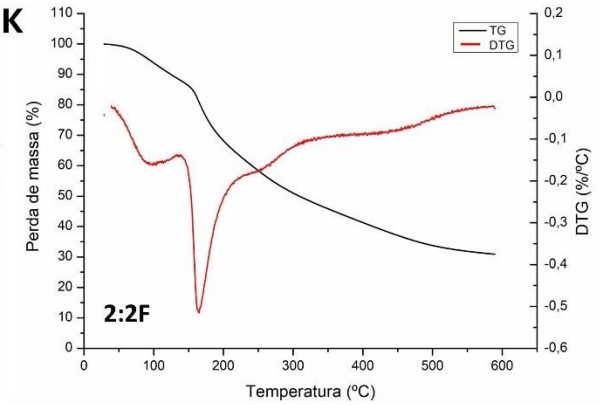

F
AFD
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)

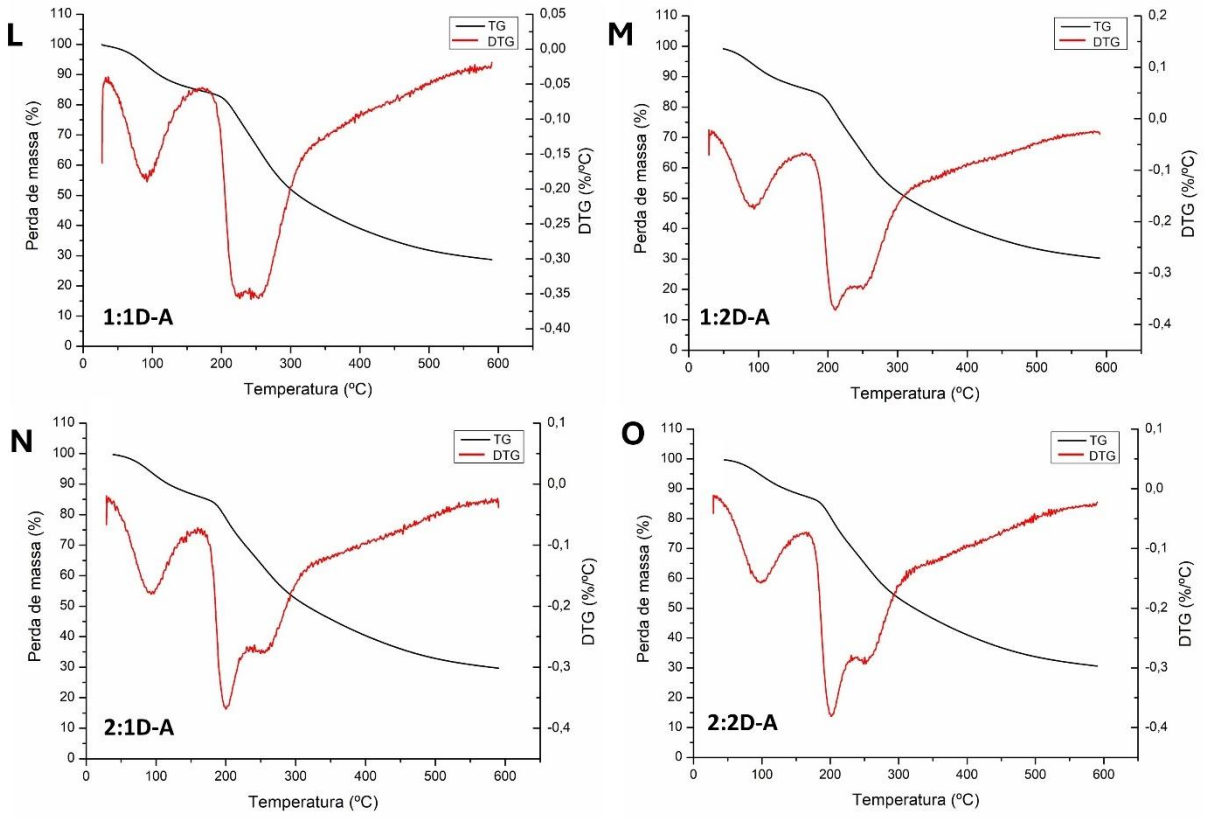

G
SD
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)


H
1:1F
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)


I
1:2F
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)


J
2:1F
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)


K
2:2F
TG
DTG
Perda de massa (%)
DTG (%/ºC)
Temperatura (ºC)



Fonte: Autoria Própria (2025)

O amido puro apresenta etapas de perda de massa bem definidas relacionada a sua estrutura e composição. Sendo assim, o termograma do amido (Fig. 26A) indicou uma queda inicial suave até 120 ºC e uma perda de massa de 7%, que está relacionado à evaporação de água livre, corroborando com o pico endotérmico a 84 ºC na Fig. 25A. Vale ressaltar que o amido é higroscópico e essa etapa demonstra a capacidade que esse composto apresenta de absorver água. Posteriormente, o amido demonstrou estabilidade até 280 ºC, onde ocorre uma queda acentuada até 350 ºC, resultando em 79% de perda de massa. Nessa temperatura ocorre a principal etapa de degradação do amido, que consiste na decomposição térmica das cadeias de amilose e amilopectina, quebra de ligações glicosídicas e liberação de compostos voláteis. Esse evento pode ser observado na Fig 26, onde a 315 ºC na curva de DTG vê-se um pico único indicativo de que degradação ocorreu em uma única etapa, demonstrando a pureza do material juntamente a uma boa estabilidade térmica. Na Fig 25A, observa-se um intenso pico endotérmico a 288 ºC que caracteriza esse evento (Carbinatto *et al.*, 2012; Meneguin *et al*, 2021).

A curva de TGA da pectina (Fig. 26B) apresenta uma leve queda até 120 ºC com 6% de perda de massa, que corresponde à perda de água livre e pode ser vista na Fig. 25A através do pico endotérmico em 75 ºC e um leve pico nessa mesma temperatura na curva de DTG. Seguido disso, a etapa principal de degradação da pectina ocorre entre 200 ºC e 400 ºC, na qual 55% de

massa é perdida e esse evento está relacionado ao pico endotérmico em 237 ºC (Fig. 25A) à ruptura das ligações glicosídicas e desmetoxilação dos grupamentos -$COOCH_3$. Esse pico de degradação coincide também na curva de DTG, onde em 228 ºC é possível vê-lo. (Carbinatto *et al.*, 2012; Meneguin *et al*, 2021).

Já o termograma do AR/P (Fig. 26C) é possível visualizar algumas diferenças, uma vez que durante a retrogradação ocorre reorganização das cadeias de amilose e amilopectina, reduzindo a mobilidade das cadeias de amido e retardando a degradação térmica. Sendo assim, a curva de TG mostra uma perda de água de 3% até 120 ºC, a qual é menor em relação aos polímeros puros devido a maior retenção de água na rede polimérica retrogradada. A decomposição principal desse composto foi observada entre 196 ºC e 300 ºC (75% de massa perdida), cujos eventos são a quebra das cadeias glicosídicas do amido com a pectina e liberação de compostos voláteis. Nesse caso, através da curva de DTG, é possível visualizar o alargamento de um pico principal com duas ondulações em 220 e 245 ºC, indicando a degradação conjunta do AR/P, cujo deslocamento para temperaturas mais altas refere-se à interação entre os polímeros e maior estabilidade térmica. Por fim, em 290 ºC observa-se um terceiro pico mais leve que sugere a degradação de regiões mais cristalinas ou produtos de carbonização, além de mais estabilização e menor perda de massa (Meneguin *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2011).

A curva de TGA do 5-ASA (Fig. 26D) apresenta 1% de perda de massa até 140 ºC, indicando a eliminação de água. A principal etapa da degradação se inicia em 230 ºC até 300 ºC, onde 95% de massa é perdida. Neste evento ocorre decomposição da estrutura aromática do 5-ASA e quebra do grupamento carboxílico, coincidindo com o pico de fusão do fármaco em 288 ºC (Fig. 25B). Por sua vez, na curva de DTG, esse evento é visto através de dois picos muito próximos e intensos em cerca de 295 ºC. Após 400 ºC, pequeno percentual de massa é perdido indicando a decomposição final do composto com um leve pico em 595 ºC na curva de DTG (Nassar; Khalile; Mohamed, 2014; Tapia *et al.*, 2010).

O termograma do ALG (Fig. 26E), por sua vez, apresentou um primeiro declive até 120 ºC envolvendo 12% de perda de massa e indicando o processo físico de evaporação de água, que pode também ser observado na curva de DTG em 100 ºC. Posteriormente, a principal perda de massa foi de 48% entre 200 ºC e 280 ºC, devido à decomposição dos grupamentos carboxilato e degradação da matriz polimérica, confirmado através de um pico principal em 250 ºC visto na curva de DTG. Por fim, em 400 ºC a curva tende a se estabilizar e pequena quantidade de massa ainda é perdida, indicando o processo de decomposição final e conversão em Na_2CO_3 (Flores-Hernández *et al.*, 2021).

A curva de TGA do SD (Fig. 26G) demonstra uma primeira perda de massa de cerca de 10% até 130 ºC, que indica perda de água adsorvida, uma vez que o SD é higroscópico e capaz de reter água em suas cadeias poliméricas sulfatadas. Após isso, a principal perda de massa (cerca de 38%) se deu de 200 ºC a 350 ºC, onde ocorreu degradação térmica das unidades de glicose, quebra das ligações glicosídicas e decomposição dos grupamentos sulfato. Na curva de DTG, é possível observar a presença de um pico intenso em 220 ºC, sugestivo de eliminação dos grupamentos sulfato e degradação da estrutura, seguido de picos mais leves próximos à 270 ºC, relacionado à decomposição da estrutura polissacarídica. Por fim, de 400 ºC a 600 ºC também foi identificada uma perda de massa, mas bem menor e que está associada à carbonização da estrutura e oxidação de resíduos (Moydeen *et al.*, 2018).

O AFD é um composto orgânico aromático e que apresenta comportamento diferente dos polissacarídeos. Seu respectivo gráfico de TGA (Fig. 26F) apresentou uma única etapa principal de decomposição, o que é característico de moléculas cristalinas e puras. Sendo assim, até 130 ºC, esse composto apresentou apenas 2% de perda de massa referente à evaporação de umidade. Posteriormente, entre 150 ºC e 230 ºC cerca de 20% de massa foi perdida, correspondente à decomposição térmica do anel aromático e das ligações B-O e B-C. Esse evento anterior pôde ser visto na curva de DTG, em que há a presença de um pico intenso e definido em 210 ºC. Por fim, a curva se estabilizou e apenas mais 10% de massa foram perdidos, pouco resíduo referente à oxidação dos compostos borônicos, o que também é visto no gráfico de DTG por meio de um declive entre 500 e 600 ºC. (Daniels *et al.*, 2023).

A Figura 26H-K traz os termogramas das amostras reticuladas ionicamente com Al^{3+}, cujas amostras apresentam comportamentos bem parecidos. Através dela, é possível observar algumas etapas de perda de massa, as quais estão relacionadas à água adsorvida, degradação dos polissacarídeos e decomposição do fármaco. Inicialmente, a perda de massa de 10% ocorrida entre 100 e 120 ºC está relacionada à perda de água adsorvida, uma vez que os polissacarídeos utilizados no sistema retêm água. A perda de água nessa temperatura também é observada no gráfico de DTG através de um leve pico. Posteriormente, entre 145 ºC e 350 ºC observa-se perda de 40% de massa, o que está relacionado à decomposição térmica dos polissacarídeos AR/P, ALG e SD, envolvendo ruptura de ligações glicosídicas e despolimerização, além de decomposição do 5-ASA. Na curva de DTG, em todas as amostras, é possível observar a presença de um pico intenso e definido entre 160 e 175 ºC que caracteriza essa etapa da degradação. Por fim, perto de 400 ºC a curva tende a se estabilizar e menor percentual de massa é perdida, devido à carbonização de resíduos.

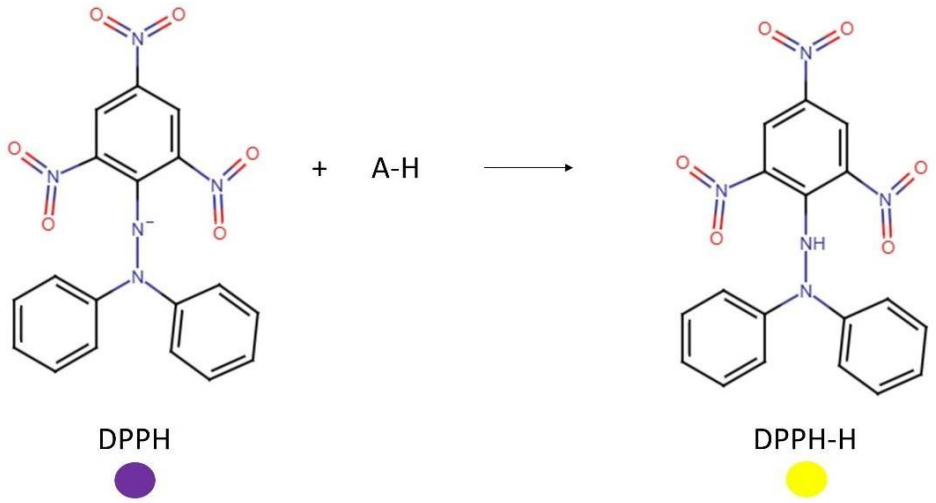
Finalmente, a Figura 26L-O mostra os termogramas das amostras reticuladas com AFD. Nesse caso, as amostras também apresentam perda de massa de cerca de 10% até 120 ºC referente à evaporação de água, observado também através de um pico na curva de DTG e mais intenso quando comparado às amostras reticuladas ionicamente. A maior intensidade do pico nas amostras reticuladas quimicamente pode ser explicado pelo fato de que a rede tridimensional formada pela reticulação química é mais densa e hidrofílica, uma vez que se dá por meio de ligações covalentes, logo, mais água é aprisionada dentro da rede e maior a energia requerida para a sua remoção, resultando em maior intensidade do pico.

A temperatura de maior degradação dos polímeros e do fármaco se encontra deslocada em relação às amostras anteriores. Enquanto nas MPs sem AFD o principal evento de degradação se iniciou por volta de 145 ºC, o início do mesmo nas MPs com AFD foi entre 185-205 ºC, com cerca de 45% de perda de massa. O deslocamento desse pico sugere um indicativo de maior estabilidade térmica formada pelo processo de reticulação dupla, uma vez que a rede reticulada quimicamente restringe a mobilidade da cadeia polimérica e torna sua quebra mais difícil, exigindo maior energia para que ocorra a decomposição (Daniels *et al.*, 2023). Esse evento também é observado em DTG, a qual se apresenta na forma de um pico menos definido, mais alargado e com eventos sobrepostos, típico de redes mais complexas. Por fim, a partir de 400 ºC a curva se estabiliza e perde pouca quantidade de massa, referente à material carbonáceo e resíduos.

5.8. Determinação da atividade antioxidante ou antirradicalar

O DPPH é um radical livre de oxigênio, estável e solúvel em diversos solventes orgânicos, mas não em água. Possui estrutura química cuja molécula apresenta um elétron desemparelhado, o que o torna reativo. Diferentemente das EROs, as quais são espécies reativas que possuem oxigênio em sua estrutura e são associadas ao estresse oxidativo e dano celular, o radical DPPH é utilizado em ensaios para avaliar o efeito antioxidante do composto em questão (Maria, 2010). Sendo assim, o teste de antioxidante por DPPH consiste em um teste de neutralização baseado na doação de elétrons a fim de neutralizar o radical DDPH, através de uma mudança de coloração (violeta para amarelo) indicativa da atividade antioxidante do sistema, como pode ser observado esquematicamente na Fig. 25 (Munteanu; Apetrei, 2021).

Figura 27 - Reação do radical DPPH



Fonte: Autoria Própria (2025)

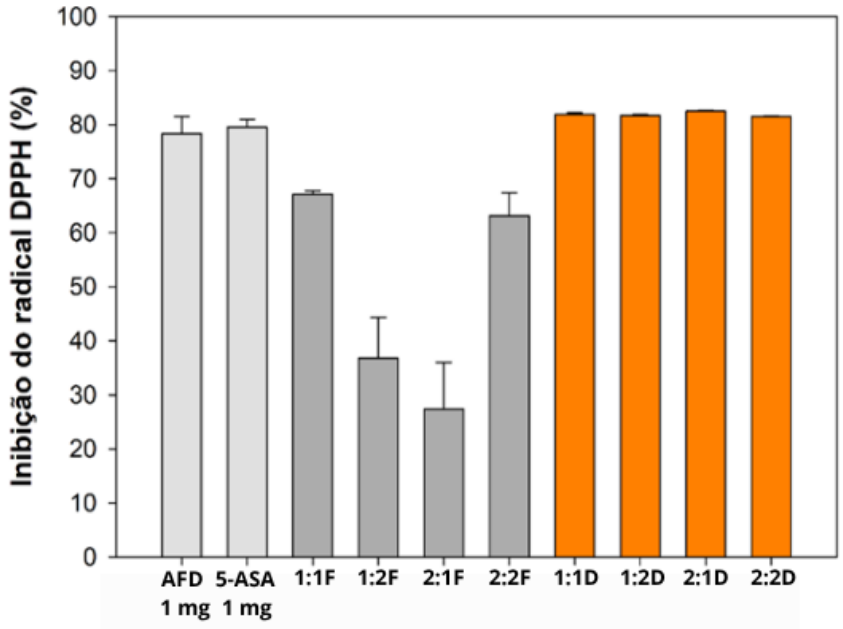
A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH proporcionou uma forma mais facilitada e rápida de determinar a atividade antioxidante das MPs. Muito embora o objetivo primário da reticulação química com AFD seja tornar as MPs responsivas às EROs, fornecendo um mecanismo triplo de vetorização para as áreas inflamadas, o conhecimento da atividade antioxidante do próprio sistema é fundamental. Isso se deve ao fato de que, além do AFD, há relatos que atribuem tal atividade ao 5-ASA.

Um estudo publicado por Moura *et al.* (2016) avaliou o efeito antioxidante do 5-ASA em um modelo experimental de colite induzida por ácido acético. Os resultados indicaram que o 5-ASA demonstrou eficácia na redução de lesões teciduais e de danos oxidativos e inflamatórios causados por enzimas oxidantes, restabelecendo a capacidade antioxidante e aumentando os níveis de pressão anal esfincteriana. Com isso, foi comprovado que essas melhorias foram atribuídas ao efeito antioxidante do 5-ASA.

Dessa maneira, a especulação sobre um possível efeito aditivo entre esses compostos (AFD + 5-ASA), visando não apenas a responsividade da liberação, mas também ação terapêutica, torna-se relevante.

Através dos resultados obtidos e apresentados na Figura 26, pode-se observar que o AFD e o 5-ASA apresentaram inibição do radical DPPH de 78,34% e 79,52%, respectivamente. Por outro lado, as amostras reticuladas ionicamente apresentaram inibição do radical DPPH entre 27,36 e 67,16%, provavelmente atribuído à atividade antioxidante do fármaco 5-ASA. Por outro lado, a reticulação das MPs com AFD promoveu substancial aumento de inibição do radical DPPH, a qual variou entre 81,50 e 82,48%, em comparação às amostras reticuladas fisicamente.

Figura 28 - Atividade antioxidante das MPs baseada na inibição do radical DPPH (%) após 2 h de incubação (média ± desvio padrão, n=3)



Fonte: Autoria Própria (2025)

Apesar do DPPH não ser uma ERO, ele reage de forma semelhante a um radical livre presente no organismo, significando que se uma substância consegue neutralizar o DPPH, ela pode ter potencial para neutralizar radicais livres no corpo. Dessa forma, fica claro que a utilização do reticulante químico (AFD) nas MPs é determinante para a inibição de DPPH, logo, essa substância possui atividade antioxidante (Zhu et al., 2023). Para exercer essa atividade, o AFD elimina as EROs por meio das ligações carbono-boro e pelas ligações covalentes entre ácido fenilborônico e hidroxilas (Hoang; Smith; Raines, 2017; Zhao *et al.*, 2019).

5.9. Estudo das propriedades mucoadesivas

O conceito de mucoadesão pode ser definido como a capacidade de fixação de substratos biológicos e/ou polímeros naturais ou sintéticos a uma camada mucosa, que reveste várias partes do corpo e inclui, o TGI, trato urogenital, vias aéreas, ouvido e olho, por exemplo (Singh; Rana, 2012). Por outro lado, a bioadesão se baseia apenas na adesão entre duas superfícies em um ambiente biológico ausente de muco (Wang; Fleming; Luo, 2023).

Diversas são as teorias envolvidas no fenômeno da mucoadesão, incluindo a teoria eletrônica, teoria da molhabilidade, teoria da adsorção, teoria da difusão, teoria mecânica e teoria da fratura. A teoria eletrônica sugere que as diferenças nas propriedades eletrônicas entre o polímero e a camada mucosa impulsionam a transferência de elétrons após o contato, criando forças atrativas que geram a atração. Por outro lado, a teoria da molhabilidade baseia-se na

capacidade do polímero em se espalhar sobre a superfície da mucosa, favorecendo o contato íntimo com a camada de muco. Já a teoria da adsorção sugere que a mucoadesão ocorre através de interações químicas secundárias, como ligação de hidrogênio, ligação hidrofóbica e forças de van der Waals. Por sua vez, a teoria da difusão afirma que gradientes de concentração promovem a interdifusão das cadeias de polímero e cadeias de mucina, criando uma ligação semipermanente. Em contrapartida, a teoria mecânica sugere que o polímero pode se ligar às irregularidades encontradas em superfícies mucosas, as quais promovem aumento de interações entre ambos devido ao encaixe mecânico. Por fim, a teoria da fratura define a mucoadesão em relação à intensidade da força necessária para separar o polímero e a camada de muco que aderiram entre si. Sendo a mucoadesão um fenômeno extremamente complexo, ela provavelmente é uma combinação entre todas as teorias citadas acima (Singh; Rana, 2012; Wang; Fleming; Luo, 2023).

Apesar da mucoadesão e a mucopenetração serem fenômenos distintos, frequentemente ambos são confundidos na literatura. A mucopenetração é uma estratégia que vem sendo explorada para permitir que os sistemas desenvolvidos penetrem pela camada de muco, sendo definida como a capacidade que as partículas possuem em atravessar a camada de muco e alcançar tecidos mais profundos (Taipaleenmäki; Städler, 2020). De acordo com a literatura recente, a escolha entre o desenvolvimento de sistemas mucoadesivas e mucopenetrantes depende de uma série de fatores. No trabalho de Netsomboon & Bernkop-Schnürch (2016) foi visto que a escolha do sistema depende do alvo terapêutico e das propriedades da mucosa alvo, incluindo a espessura da camada de muco, bem como sua taxa de renovação e o movimento da água dentro dele. Dessa forma, é importante ressaltar que a mucoadesão visa prolongar a permanência do fármaco no local de ação, enquanto a mucopenetração busca transpor a barreira mucosa para facilitar a absorção e biodisponibilidade.

5.9.1. Análise *in vitro* de interação com mucina

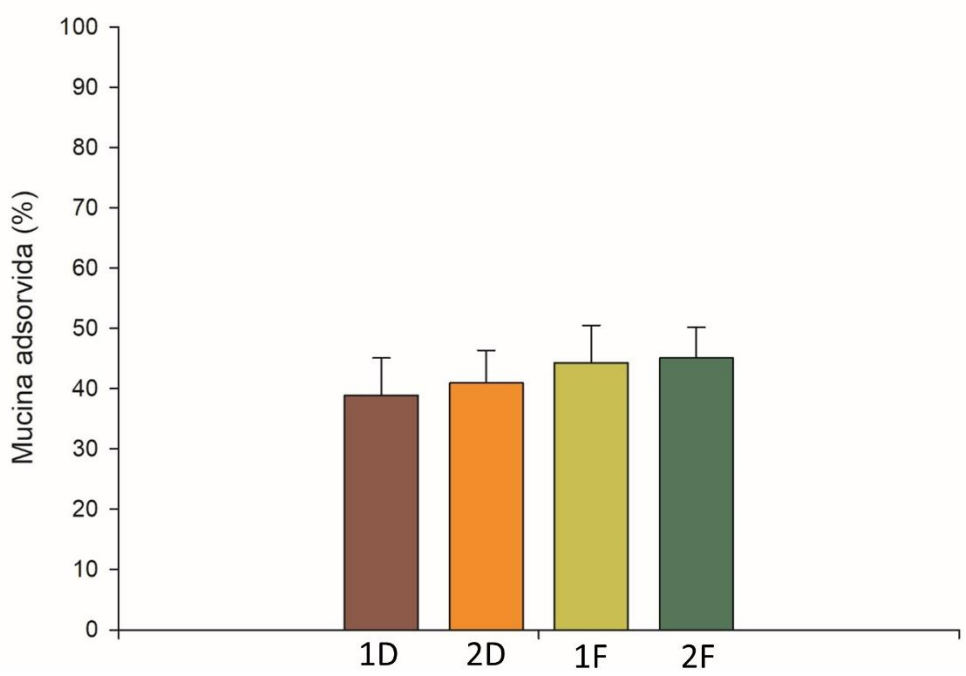
O ensaio *in vitro* de interação com a mucina foi realizado utilizando-se o reagente de Lowry para quantificação de proteínas, considerando a mucina como principal proteína do muco. É sabido que o reagente de Lowry baseia-se em duas reações químicas, sendo i) a reação do biureto, na qual o reagente tartarato cúprico alcalino complexa-se com as ligações peptídicas da proteína e ii) a redução do reagente fenol de Folin e Ciocalteu, produzindo uma coloração roxa para quantificação. No entanto, durante a execução do método, verificou-se que tanto as MPs contendo 5-ASA como o fármaco livre desenvolviam uma coloração azul de alta intensidade mesmo na ausência de mucina, indicando que este fármaco sofre alguma

reatividade com os reagentes do kit. Entre as hipóteses, acredita-se que as propriedades redutoras do 5-ASA podem intensificar a redução do reagente de Folin, aumentando a intensidade da coloração azul. Nesse sentido, o ensaio de mucoadesão pela adsorção de mucina foi conduzido somente com as amostras controle (sem fármaco).

A Figura 27 traz os resultados da porcentagem de adsorção de mucina apenas nas MPs controle, em que é possível observar cerca de 40 a 45% de mucina foi adsorvida nas amostras sem fármaco, o que sugere que as MPs possuem capacidade de interagir com o muco, favorecendo sua retenção no cólon inflamado.

O aumento da concentração de SD de 0,5% para 1,0% não influenciou significativamente a adsorção de mucina ($p>0,05$). Nas amostras reticuladas quimicamente, foi possível observar uma leve redução na adsorção de mucina, que pode ser explicado pelo fato de que a formação de uma rede mais intensa após dupla reticulação dificulta a interpenetração das cadeias de mucina, reduzindo suas porcentagens de adsorção.

Figura 29 - Porcentagem de mucina adsorvida nas MPs controle (AR/P) com diferentes concentrações de SD e dupla reticulação



Fonte: Autoria Própria (2025)

5.9.2. Ensaio *ex vivo* de mucoadesão por retenção em rampa

A camada de muco é uma estrutura complexa e permeável, cuja glicoproteína mais importante presente é a mucina, a qual atua na proteção e lubrificação do epitélio. Sendo assim,

a realização desse teste *ex vivo* tem como objetivo mimetizar ao máximo, quando comparado ao sistema biológico, as condições em que o sistema será exposto, a fim de avaliar as propriedades mucoadesivas que o sistema microparticulado possui de aderir ao muco que reveste o epitélio gastrointestinal e colônico (Carvalho *et al.*, 2010).

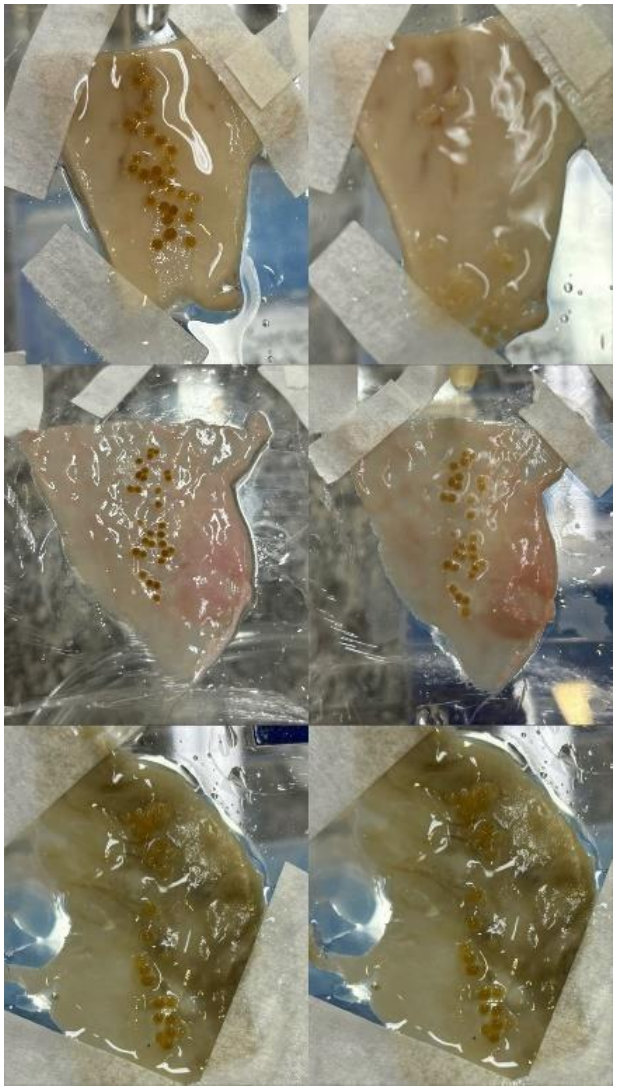
De acordo com a Tabela 8, as MPs desenvolvidas apresentaram elevada capacidade mucoadesiva, a qual se mostrou dependente do tipo de mucosa e do pH do meio de irrigação. Como pode-se observar na Figura 28, as MPs dispostas em mucosa gástrica suína não foram capazes de se manter aderidas após a instilação de FGS (pH 1,2), tendo todas as partículas sido lixiviadas até o término do experimento. Na mucosa intestinal, o FIS (pH 7,4) lixiviou aproximadamente 16,67 a 36,67% das MPs, resultando em mucoadesividade de cerca de 63,33 a 83,33%. Interessantemente, foi verificada uma mucoadesão de 100% para as MPs avaliadas em mucosa colônica instilada com FCS (pH 6,8).

Tabela 8 - Taxa de mucoadesividade (%) das MPs de AR/P/5-ASA/DS, avaliadas em mucosas gástrica, intestinal e colônica através do método da rampa, com instilação dos fluidos gástrico (FGS), intestinal (FIS) e colônico (FCS) simulados, respectivamente, durante 30 minutos.

	Taxa de mucoadesividade (%) das MPs fixadas		
Amostra	**Meio FGS (pH 1,2)**	**Meio FIS (pH 7,4)**	**Meio FCS (pH 6,8)**
1:1F	0 ± 0,00	76,67 ± 1,00	100 ± 0,00
1:2F	0 ± 0,00	80,00 ± 0,71	100 ± 0,00
2:1F	0 ± 0,00	80,00 ± 0,71	100 ± 0,00
2:2F	0 ± 0,00	83,33 ± 1,00	100 ± 0,00
1:1D-A	0 ± 0,00	80,00 ± 1,00	100 ± 0,00
1:2D-A	0 ± 0,00	73,33 ± 1,00	100 ± 0,00
2:1D-A	0 ± 0,00	66,67 ± 1,52	100 ± 0,00
2:2D-A	0 ± 0,00	63,33 ± 2,51	100 ± 0,00

Fonte: Autoria Própria (2025)

Figura 30 - Imagem fotográfica das amostras gastrointestinal suínas durante ensaio de mucoadesão *ex vivo* com instilação de FGS, FIS e FCS



Fonte: Autoria Própria (2025)

A significativa diferença na mucoadesividade entre o estômago e o cólon pode ser principalmente explicada pelas condições fisiológicas, como o pH e a composição do muco nesses distintos ambientes, além das propriedades do próprio sistema. Além disso, a composição do muco entre as diferentes partes do TGI varia. O muco gástrico, por exemplo, contém diversas enzimas digestivas e possui rápida taxa de renovação, enquanto que o muco colônico é mais espesso, possui maior quantidade de glicoproteínas e reduzida taxa de renovação; esses fatores fazem com que os sistemas mucoadesivos tenham capacidade de adesão mais eficaz no cólon (Puri *et al.*, 2022; Varum *et al.*, 2008).

De modo geral, as MPs com dupla reticulação apresentaram menor mucoadesividade no intestino delgado em comparação às MPs reticuladas ionicamente. Esse comportamento provavelmente está relacionado à estrutura tridimensional mais densa e compacta dessas

amostras, o que dificulta a interpenetração com as cadeias de mucina, principal proteína do muco. Evidência disso é o fato de que a amostra 2:2D-A ter exibido a menor mucoadesão (cerca de 63,33%), em contraste com os 83,33% alcançados por outras formulações.

Essa característica é particularmente relevante para o tratamento da RCU, representando uma importante prova de conceito da especificidade colônica dos sistemas desenvolvidos. O objetivo é que, após a administração oral, as MPs atravessem o estômago sem aderir à mucosa – como já observado – e apresentem maior adesão no cólon, a região mais afetada pelas DII´s. Essa área é caracterizada pelo trânsito acelerado, tecnicamente conhecido como diarreia, o que compromete a retenção das formas farmacêuticas convencionais e comercialmente disponíveis. Como resultado, há inúmeros relatos na prática clínica da visualização de comprimidos intactos nas fezes, indicando a eliminação do medicamento antes da liberação do fármaco e, consequentemente, comprometendo a eficácia do tratamento.

5.10. Estudos de performance

5.10.1. Otimização da formulação através de ensaios de liberação *in vitro* do 5-ASA

O ensaio de liberação *in vitro* é uma ferramenta de extrema importância na etapa do desenvolvimento farmacotécnico, uma vez que este participa de todo ciclo de vida do produto farmacêutico, desde a pesquisa e desenvolvimento até o controle de qualidade. Existem diversos aparatos farmacopeicos para serem utilizados no teste de liberação, e estes devem ser escolhidos de acordo com a forma farmacêutica, objetivo do teste e tipo de liberação do fármaco e do sistema em questão, visando padronização, reprodutibilidade, comparabilidade e mimetização ao máximo das condições *in vivo.*

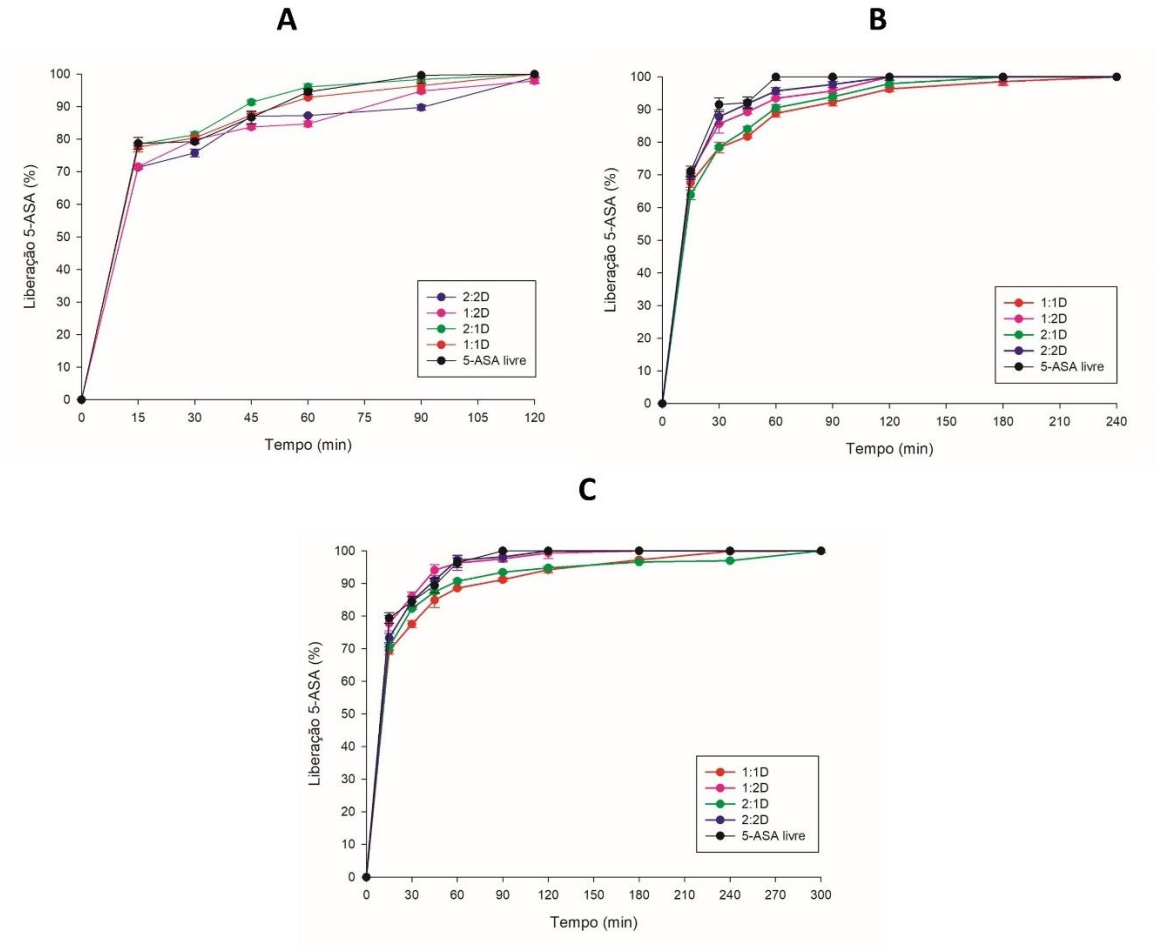
Diversas teorias e modelos cinéticos descrevem os mecanismos que diferenciam os sistemas de liberação convencionais dos de liberação modificada, além de explicar como e quais fenômenos afetam a liberação do fármaco. A interpretação dos perfis de liberação pode ser feita através do uso de modelos matemáticos que descrevem a dissolução do fármaco com base no tempo, o que varia de acordo com o sistema desenvolvido. Além disso, fatores como tipo de fármaco, tipo de partícula, solubilidade, concentração dos componentes utilizados e presença de polimorfismo influenciam a cinética de liberação e podem resultar em diversos comportamentos de liberação (Lobo; Costa, 2001).

Porém, no caso de formas farmacêuticas poliméricas de liberação modificada, que são as desenvolvidas no presente projeto, não existe um modelo teórico que expresse perfeitamente o perfil de liberação. Modelos empíricos são utilizados, como por exemplo, o de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixon-Crowell, Weibull e Baker-Lonsdale, cada um com suas peculiaridades.

Portanto, as MPs desenvolvidas foram submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* em três meios diferentes, inicialmente em relação ao pH para *screening* de formulação e conhecimento das propriedades de pH-dependência. O primeiro meio simulou o ambiente gástrico (FGS), durante 2h em pH 1,2; o segundo meio mimetizou o ambiente intestinal (FIS) durante 4h em pH 7,4; e, por último, o terceiro meio simulou o ambiente colônico (FCS) em pH 6,8 durante 5h.

Os gráficos dos ensaios de liberação *in vitro* do 5-ASA para definir sua taxa de liberação em função do tempo em FGS (A), FIS (B) e FCS (C) estão apresentados na Figura 29.

Figura 31 - Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs AR/P com dupla reticulação e contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%), nos meios gástrico pH 1,2 (A), intestinal pH 7,4 (B) e colônico pH 6,8 (C).



Fonte: Autoria Própria (2025)

Nos gráficos acima foi possível observar que nenhuma das amostras resistiu ao ambiente gástrico, ou seja, em 15 minutos de liberação em FGS, cerca de 80% do fármaco já havia sido liberado. Esse resultado não é o desejado para o sistema em questão, uma vez que almeja-se que as MPs resistam ao ambiente gástrico e cheguem quase intactas na região colônica, para que a liberação do 5-ASA ocorra majoritariamente nessa região. Sabendo dessa problemática, algumas estratégias foram exploradas a fim de contornar esse desafio, usando a MP 2:2D como modelo, para que não houvesse mais interferentes na análise, ou seja, para que cada componente do sistema (SD e 5- ASA) contribuísse de maneira semelhante na liberação.

A Figura 30 traz as porcentagens de liberação do 5-ASA em FGS em todas as estratégias aplicadas, as quais incluíram:

A) Alteração do tempo de reticulação química de 5 para 20 min a fim de avaliar se a reticulação mais intensa é responsável por um maior controle das taxas de liberação;

B) Reticulação das MPs secas (e não úmidas, como pré-estabelecido) para evitar a possibilidade de lixiviação do fármaco para a superfície das MPs;

C) Ajuste do pH das dispersões poliméricas contendo o fármaco para 6,0-6,5 antes da geleificação ionotrópica, considerando os valores de pKa do 5-ASA (2,3 e 5,69). Partindo do pressuposto de que a solubilidade do 5-ASA é dependente do pH, o pH de síntese anterior (~5,0) pode favorecer a formação de agregados insolúveis devido ao estado neutro da molécula (zwitteriônico). O aumento do pH para valores acima do pKa deve melhorar a solubilidade do fármaco, favorecendo seu aprisionamento na matriz, uma vez que, no estado insolúvel, ele é facilmente lixiviado;

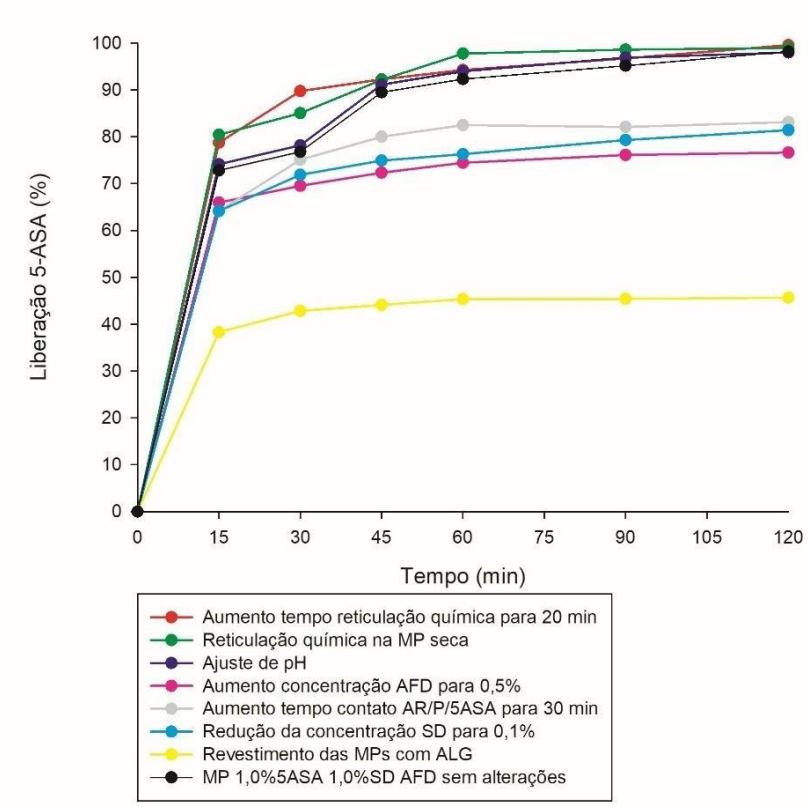
D) Aumento da concentração de AFD de 0,1 para 0,5%, a fim de propiciar o estabelecimento de maior número de ligações cruzadas entre os compostos e, consequentemente, propiciar um aprisionamento mais efetivo do fármaco na matriz;

E) Aumento do tempo de homogeneização entre dispersão polimérica e fármaco previamente à microencapsulação de 10 para 30 min visando otimizar o estabelecimento de interações entre tais componentes;

F) Redução da concentração de SD de 0,5 ou 1,0% para 0,1%. Apesar do SD sofrer metabolismo diferencial no cólon, dependendo do grau de sulfatização, sua solubilidade em água pode dificultar a formação de partículas gastroprotetoras;

G) Revestimento das MPs com alginato de sódio, considerando seu comportamento pH-dependente, com resistência à liberação gástrica e maior liberação em meios com pH mais elevado, como o cólon (pH 6,8).

Figura 32 - Perfis de liberação in vitro do 5-ASA em meio gástrico (pH 1,2), a partir de amostras MP 1,0SD/1,0/, sintetizadas de acordo com as estratégias elencadas de A à G



Fonte: Autoria Própria (2025)

O aumento do tempo de reticulação química de 5 para 20 minutos (estratégia A) não promoveu melhora significativa do controle da liberação, já que passados 120 minutos de contato das MPs com o meio gástrico, praticamente todo o fármaco já havia sido liberado. Além disso, o aumento do tempo de reticulação química implica na redução da EE%, como visto anteriormente na seção 5.3, sendo uma limitação importante do processo.

A estratégia B consistiu na alteração do processo de reticulação química, utilizando MPs secas em vez de úmidas, como previamente estabelecido. Essa abordagem poderia oferecer maior controle sobre a dissolução e ao intumescimento das partículas, mantendo sua integridade estrutural. Além disso, evitaria a lixiviação das moléculas de fármaco para a superfície, o que pode facilitar a liberação devido à diminuição do caminho difusional a ser percorrido pela partícula. No entanto, embora a reticulação das MPs secas pudesse reduzir sua eficiência, essa estratégia não se mostrou eficaz, uma vez que o fármaco foi completamente liberado após 120 minutos em FGS.

Apesar do ajuste do pH das dispersões poliméricas para 6,0-6,5 ter sido realizado com o objetivo de aumentar a solubilidade do 5-ASA e favorecer seu efetivo aprisionamento na matriz, essa estratégia não se mostrou eficaz. Mesmo com o aumento do pH para valores acima do pKa do fármaco, a liberação não foi controlada, indicando que o encapsulamento do fármaco no estado molecular, não foi suficiente para evitar a rápida dissolução do 5-ASA.

A primeira alternativa que se mostrou significativamente positiva foi o aumento da concentração do reticulante químico de 0,1% para 0,5% durante 5 minutos (estratégia D), resultando na redução da liberação de 5-ASA de 100% para 76%, transcorridos 120 minutos de ensaio. Provavelmente, a concentração anteriormente utilizada não estava sendo suficiente para promover uma reticulação eficiente de toda a matriz polimérica, resultando em uma rede estrutural menos densa. Consequentemente, o 5-ASA apresentava maior difusibilidade e era rapidamente solubilizado no meio ácido, favorecendo sua liberação prematura.

O aumento do tempo de homogeneização da dispersão polimérica e do fármaco antes da microencapsulação (estratégia E), também demonstrou influência sobre a taxa de liberação. Após 120 minutos de ensaio em meio gástrico, observou-se uma redução de 100% para 83% na liberação do 5- ASA. Esse efeito pode estar associado a uma maior interação entre os componentes da formulação através de ligações supramoleculares, promovendo maior aprisionamento do fármaco na matriz polimérica.

Apesar de não terem sido encontrados estudos na literatura que dizem a respeito da influência da concentração de SD na liberação de 5-ASA, essa estratégia foi avaliada (estratégia F). Sendo assim, foram sintetizadas MPs com menor concentração de SD (de 1,0 e 0,5% para 0,1%), as quais foram reticuladas ionicamente por 5 min e com AFD (0,1% por 5 min). A estratégia foi capaz de reduzir o *burst* de liberação para 65% nos primeiros 15 minutos, mas houve a liberação de 80% de 5-ASA após 120 minutos de teste.

Apesar das estratégias elencadas de A à F terem propiciado algum controle nas taxas de liberação, sabe-se que, para um sistema de liberação de fármacos ser considerado cólon-específico, a liberação do fármaco deve ser mínima no estômago e no intestino delgado, garantindo que a maior parte do fármaco chegue intacta ao cólon (Chourasia; Jain, 2003; Miguel; Souza, 2021; Wang *et al.*, 2015). No entanto, esse objetivo não foi alcançado, uma vez que ainda ocorre a liberação de cerca de 80% de 5-ASA em meio gástrico.

Apesar de inúmeros relatos na literatura demonstrarem que a blenda AR/P promove vetorização dos fármacos para o cólon (Meneguin *et al.*, 2014; Meneguin *et al.*, 2018; Meneguin *et al.*, 2021; Meneguin *et al.*, 2024), esse resultado não foi reproduzido ao sintetizar as MPs por geleificação ionotrópica. No trabalho de (Meneguin *et al.*, 2021) por exemplo, MPs

de AR/P e nanofibras de celulose obtidas pela técnica de *spray-drying* proporcionaram a entrega direta de 5-ASA às partes distais do TGI, afetadas pela DII. No estudo de (Meneguin *et al.*, 2014) foram obtidos filmes a partir da dispersão de AR/P que apresentaram alta resistência à digestão por enzimas gástricas e intestinais, além de baixa dissolução em meio ácido, o que indicou que eles podem ser uma estratégia promissora destinada ao revestimento de formas farmacêuticas sólidas para administração de fármacos diretamente no cólon.

Vários fatores poderiam ocasionar essa mudança de comportamento; no entanto, deve-se considerar somente àqueles que são referentes à mudança do método de síntese das MPs, já que a natureza química dos compostos é a mesma dos estudos anteriormente referenciados. Assim, cita-se a i) estabilidade da rede polimérica, já que em meio ácido os íons H^+ podem competir com os íons Al^{3+}, deslocando-os e enfraquecendo a matriz polimérica; ii) a porosidade elevada e/ou presença de rachaduras nas MPs, a qual poderia favorecer a absorção de meio gástrico com a consequente dissolução do fármaco (5-ASA é solúvel em meios ácidos); e iii) a distribuição do fármaco na matriz. Se o 5-ASA não foi eficientemente incorporado na matriz polimérica e ficou predominantemente na superfície das MPs, a dissolução pode ocorrer rapidamente no meio ácido, o que também parece ser provável, devido ao tamanho reduzido do 5-ASA (153 g/mol, diâmetro ≈ 6.8 Å).

Frente às hipóteses levantadas, as fotomicrografias obtidas por MEV (seção 5.4.2) mostram que a superfície das MPs apresenta uma quantidade expressiva de rachaduras. Embora seu número e abertura tenham sido reduzidos com a otimização do tempo de reticulação iônica, essas rachaduras podem ocasionar a liberação prematura observada para o 5-ASA, mesmo com o uso de uma blenda contendo AR, reconhecido por sua cólon-especificidade.

Nesse sentido, para melhorar a cólon-especificidade e evitar a liberação prematura no estômago, empregou-se o revestimento das MPs com alginato de sódio (estratégia G). Alginatos (ALG) são polissacarídeos hidrofílicos aniônicos extraídos de algas ou de fontes bacterianas compostos por copolímeros que contém resíduos dos ácidos gulurônico e manurônico, estes que dependendo de suas proporções irão influenciar as propriedades físicas dos ALG (Yong; Mooney, 2012). O ALG tem sido utilizado para revestimento de formas farmacêuticas convencionais e diferentes sistemas de liberação prolongada devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e versatilidade, juntamente com a sua propriedade única de formar géis estáveis em meios aquosos reagindo com cátions multivalentes (Dias *et al.*, 2017).

Além disso, o ALG apresenta características que tornam sua solubilidade pH dependente, ou seja, seu ponto de solubilidade depende do pH, sendo que em valores mais ácidos, como o do estômago, o ALG é menos solúvel. Essa propriedade evita sua liberação

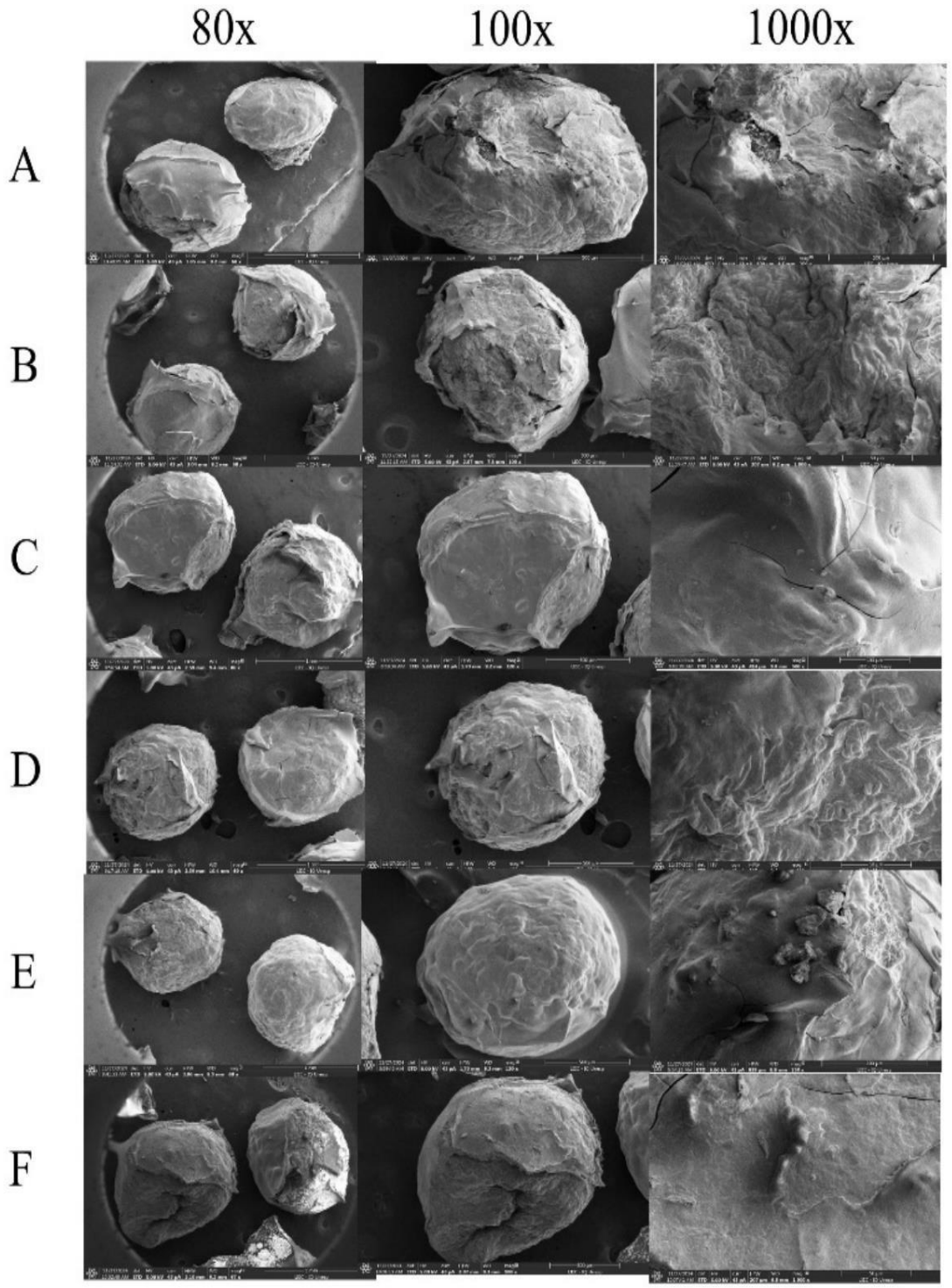
prematura e faz com que a liberação do fármaco ocorra na região colônica, fazendo do ALG um bom componente para sistemas de liberação controlada (Yong; Mooney, 2012). No estudo de Ling *et al.* (2019), MPs gastroprotetoras de ALG resistiram à incubação em meio gástrico e liberaram nanopartículas especificamente na região intestinal e colônica.

Como pode ser visto na Figura 30, o revestimento com ALG mostrou resultados altamente benéficos, uma vez que foi observada uma redução do *burst* de liberação para 40% nos primeiros 15 minutos. Além disso, o percentual de liberação se manteve praticamente constante até o final do ensaio, quando atingiu 45% de 5-ASA liberado, ou seja, somente 5% adicionais de fármaco foram liberados após o *burst.* Tal comportamento está associado à formação de um gel insolúvel em meio ácido, que reduz o intumescimento e dissolução das MPs, funcionando como uma barreira protetora contra a liberação do fármaco (Sanchez-Ballester; Bataille; Soulairol, 2021).

Além disso, as estratégias D, E e F foram incorporadas para superar a problemática da liberação prematura, consistindo no aumento da concentração de AFD; aumento do tempo de homogeneização da dispersão AR/P/5-ASA/SD; e revestimento das MPs com ALG.

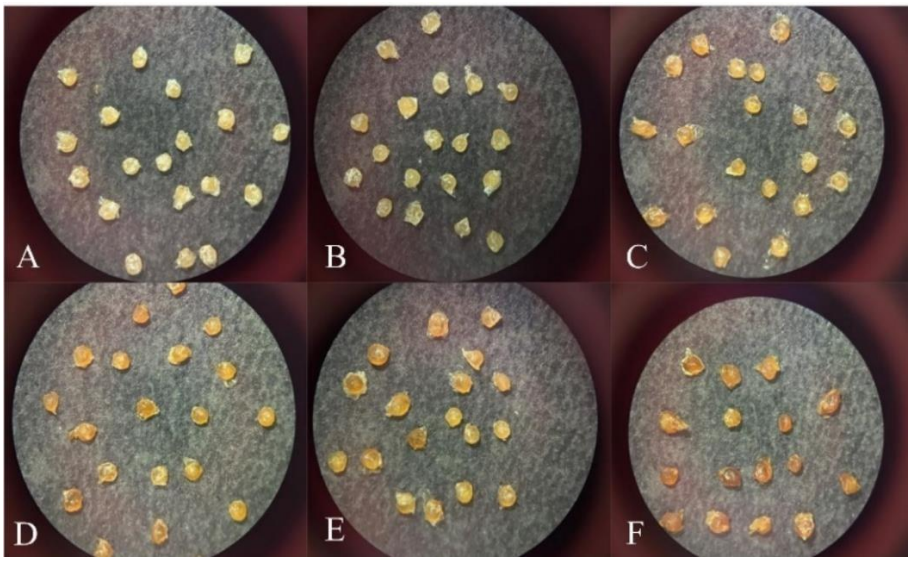
As MPs otimizadas foram analisadas microscopicamente por MEV-FEG, de acordo com a metodologia descrita na seção 4.8.2, e são apresentadas na Figura 31. Foi observado que essas amostras apresentaram uma leve diminuição da circularidade e a formação de uma película lisa e contínua recobrindo a superfície das MPs, e consequentemente, as rachaduras visualizadas anteriormente. Pequenos defeitos podem ser observados no revestimento, os quais são atribuídos principalmente ao método manual de revestimento *(deep coating)* e à secagem estática, empregados para prova de conceito.

Figura 33 - MEV das MPs com dupla reticulação (5 minutos de reticulação física e 5 minutos de reticulação química) e revestimento com alginato nos aumentos de 80x, 100x e 1000x, sendo **A:** 1D-A; **B:** 2D-A; **C:** 1:1D-A; **D:** 1:2D-A; **E:** 2:1D-A; **F:** 2:2D-A.



Fonte: Autoria Própria (2025)

Figura 34 - Fotomicrografias das MPs AR/P/DS/ALG obtidas por reticulação dupla (reticulação física e química), obtidas em Esterioscópio Leica no aumento de 10x, sendo 1D-A **(A)**; 2D-A **(B)**; 1:1D-A **(C)**; 2:1D-A **(D)**; 1:2D-A **(E)**; 2:2D-A **(F)**.



Fonte: Autoria Própria (2025)

Macroscopicamente, as MPs observadas na Figura 18 (seção 5.4.1) aparentam ser mais esféricas em comparação àquelas revestidas com ALG (Figura 32), as quais apresentaram formato mais irregular. Isso provavelmente aconteceu devido ao método de aplicação do revestimento por *deep-coating* manual (em comparação ao leito fluidizado), uma vez que se sabe que essa maneira de revestimento pode gerar espessuras irregulares ou falhas no filme. A maior irregularidade apresentada por essas amostras (Tabela 8) também implicou em discreta redução da circularidade (0,905 a 0,929) quando comparada às MPs da Tabela 6 na seção 5.4.1.

Tabela 9 - Valores de circularidade e diâmetro de Feret das MPs AR/P/SD/ALG obtidas por dupla reticulação.

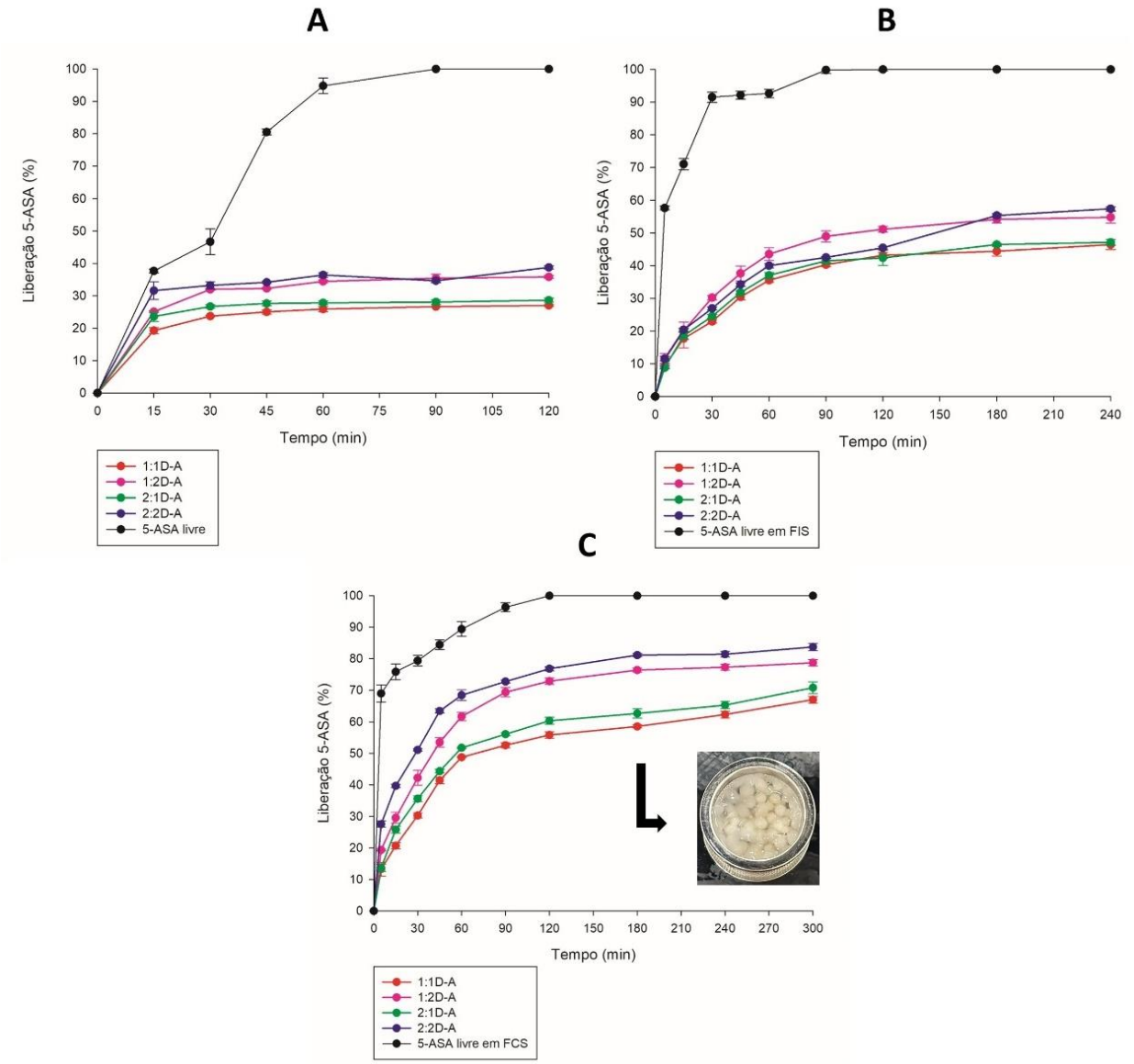
Amostra	Circularidade	Diâmetro de Feret (µm)
1D-A	0,929 ± 0,059	1388 ± 3,765
2D-A	0,921 ± 0,066	1353 ± 3,521
1:1D-A	0,917 ± 0,058	1426 ± 2,668
2:1D-A	0,909 ± 0,048	1319 ± 2,752
1:2D-A	0,914 ± 0,046	1432 ± 3,458
2:2D-A	0,905 ± 0,052	1448 ± 2,967

Fonte: Autoria Própria (2025)

5.10.2. Determinação do perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs otimizadas

Os gráficos dos novos ensaios de liberação *in vitro* do 5-ASA para definir sua taxa de liberação em função do tempo em FGS (A), FIS (B) e FCS (C) estão apresentados na Figura 35.

Figura 35 - Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs otimizadas e baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) nos meios gástrico pH 1,2 (A), intestinal pH 7,4 (B) e colônico pH 6,8 (C).



Fonte: Autoria Própria (2025)

Em FGS (pH 1,2), o 5-ASA livre alcançou 100% de dissolução após 90 minutos de ensaio, o que é coerente com sua estrutura química, que possui dois pKas, 5,69 (referente ao

ácido carboxílico) e 2,3 (referente à amina). Em meios com pH menor que o pKa, a amina se torna ionizada (carregada positivamente) e, portanto, mais solúvel, vide Figura 4.

A redução do *burst* de liberação de cerca de 40% (Fig. 31) para uma faixa entre 20 e 32% (Fig. 35), demonstra a efetividade das estratégias empregadas, bem como do sistema de liberação desenvolvido, considerando que ao final do estágio ácido foram liberados no máximo 38% de 5-ASA, contra 100% de dissolução do fármaco livre em 90 minutos. Todas as amostras tiveram comportamentos semelhantes, com destaque para as amostras 1:1D-A e 2:1D-A que foram mais resistentes ao ambiente gástrico, liberando respectivamente 27% e 28% após 120 minutos, em comparação a 35% liberados da amostra 1:2D-A e 38% da amostra 2:2D-A. Além disso, ao comparar as amostras 1:1D-A e 2:1D-A conclui-se que o aumento da concentração de SD não ocasionou o aumento das taxas de liberação; no entanto, ao comparar as anteriores com as amostras 1:2D-A e 2:2D-A, as quais possuem maior quantidade de fármaco (1,0%), é visto que o aumento da concentração de fármaco implicou em aumento de liberação, fato coerente com a literatura, já que o aumento do gradiente de concentração favorece a difusão (Conte, 2002).

Já em FIS (pH 7,4), observou-se um perfil de liberação gradual e contínuo, com a liberação do 5-ASA atingindo até 55% após 240 minutos, *i.e.,* aproximadamente 17% a mais de fármaco liberado em meio intestinal quando comparado ao gástrico. Esse comportamento foi associado à ionização do ALG (pH>pKa), o que torna os grupamentos carboxílicos carregados negativamente, levando à repulsão das cadeias poliméricas e, portanto, a dissolução do revestimento (Yong; Mooney, 2012).

Passados 240 minutos, as amostras com maior concentração de 5-ASA (1:2D-A e 2:2D-A) demonstraram uma taxa de liberação de 54% e 57%, respectivamente, enquanto as amostras com menor concentração de fármaco (1:1D-A e 2:1D-A) liberaram por volta de 46% e 47%, respectivamente. O fato de a liberação não ter alcançado 100% após a dissolução do revestimento em pH 7,4 se deve ao efeito da matriz composta por AR/P/SD no controle das taxas de liberação. A estrutura semicristalina do AR proporciona resistência à dissolução, permitindo que as MPs mantenham sua integridade por mais tempo (Meneguin *et al.*, 2014). Além disso, a modificação da pectina (grupos $-COO^-$) e do SD (grupos SO_4^{2-}) através da reticulação com íons Al^{3+} diminui a solubilidade aquosa desses componentes, contribuindo para o prolongamento das taxas de liberação (Ramasundaram *et al.*, 2023).

Por fim, a liberação de 5-ASA em meio colônico (pH 6,8) evidenciou uma alta porcentagem de fármaco liberada nesse meio. Tal achado mostra que o 5-ASA foi predominante liberado no cólon, o que permite o efeito localizado para o tratamento da colite ulcerativa.

Nesse caso, todas as amostras obtiveram comportamentos semelhantes, sendo a amostra 2:2D-A com maior taxa de liberação colônica (83%), seguida das MPs 1:2D-A (78%), 2:1D-A (70%), e 1:1D-A com 67% de liberação de 5-ASA.

Os modelos cinéticos proposto por Higuchi, Korsmeyers-Peppas, Baker and Londsdale, Hixon and Crowell, First Order e Weibull foram aplicados para definir qual mecanismo de liberação governou a liberação do sistema microparticulado desenvolvido. Vale ressaltar que o modelo de Korsmeyer–Peppas foi aplicado considerando os pontos experimentais até 60% da liberação de fármaco e o modelo de Weibull foi ajustado até 62,3% de liberação, limite determinado a partir dos dados obtidos neste estudo, de modo a assegurar melhor qualidade estatística do ajuste. Os demais modelos matemáticos foram aplicados considerando a totalidade dos dados experimentais de liberação, uma vez que não apresentam restrições específicas quanto à fração máxima de fármaco liberado a ser levada em conta.

Os resultados se encontram organizados nas Tabelas 9, 10 e 11, com os respectivos coeficientes de correlação (r^2) nos pHs gástrico (pH 1,2), intestinal (pH 7,4) e colônico (pH 6,8), respectivamente.

Tabela 10 - Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio ácido (pH 1,2) para os diferentes modelos matemáticos aplicados.

Meio gástrico (pH 1,2)				
	1:1D-A	**1:2D-A**	**2:1D-A**	**2:2D-A**
Higuchi	0,81	0,7955	0,7524	0,7980
Korsmeyer-Peppas	0,9524	0,9087	0,9267	**0,9238**
Baker and Longsdale	0,6793	0,6636	0,6250	0,7829
Hixon and Crowell	0,0393	0,0487	0,00008	0,0016
First Order	0,7033	0,7006	0,6403	0,7828
Weibull	**0,9545**	**0,9114**	**0,9280**	0,9205

Fonte: Autoria Própria (2025)

Tabela 11 - Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio intestinal (pH 7,4) para os diferentes modelos matemáticos aplicados.

Meio intestinal (pH 7,4)				
	1:1D-A	**1:2D-A**	**2:1D-A**	**2:2D-A**
Higuchi	0,8744	0,8491	0,8766	0,9601
Korsmeyer-Peppas	0,9304	0,9077	0,9312	0,9752
Baker and Longsdale	0,7043	0,6486	0,7036	0,819
Hixon and Crowell	0,2353	0,1514	0,2059	0,4963
First Order	0,7852	0,7667	0,7909	0,9297
Weibull	**0,9412**	**0,9283**	**0,9431**	**0,9835**

Fonte: Autoria Própria (2025)

Tabela 12 - Valores de r^2 dos dados de liberação de 5-ASA nas MPs 1:1D-A, 1:2D-A, 2:1D-A e 2:2D-A em meio colônico (pH 6,8) para os diferentes modelos matemáticos aplicados.

Meio colônico (pH 6,8)

	1:1D-A	1:2D-A	2:1D-A	2:2D-A
Higuchi	0,9009	0,8164	0,8957	0,8443
Korsmeyer-Peppas	0,9661	**0,9989**	0,9918	**0,9039**
Baker and Longsdale	0,6497	0,5523	0,6636	0,5415
Hixon and Crowell	0,2759	0,2215	0,2915	0,1605
First Order	0,8477	0,7907	0,8625	0,8228
Weibull	**0,9679**	0,9966	**0,9932**	0,9022

Fonte: Autoria Própria (2025)

O coeficiente de correlação (r^2) é uma medida de qualidade dos modelos cinéticos, além de ser capaz de determinar corretamente os valores obtidos. Quanto mais próximo de 1, maior é a correlação com os dados que estão sendo analisados. Em meio ácido (Tabela 9), é possível observar que o modelo cinético que mais se correlacionou com os dados do ensaio de liberação foi o modelo de Weibull (exceto para a amostra 2:2D-A), a qual teve liberação regida pelo modelo de Korsmeyer-Peppas). Em meio intestinal, o modelo cinético que melhor correlacionou com os dados de liberação também foi o modelo de Weibull, porém em todas as amostras. No entanto, em meio colônico, o modelo de Weibull foi o que melhor correlacionou com os dados das amostras 1:1D-A e 2:1D-A, enquanto o modelo proposto por Korsmeyer-Peppas melhor correlacionou com as amostras 1:2D-A e 2:2D-A.

Uma vez que foram observados valores de r^2 muito próximos entre os modelos cinéticos de Weibull e Korsmeyer-Peppas, foi necessário comparar os mecanismos envolvidos nos dois casos, a fim de determinar qual modelo racionalmente melhor se aplica ao sistema desenvolvido.

O modelo cinético de Weibull (Equação 6) foi desenvolvido nos anos 50 e adaptado para os processos de dissolução e liberação. Ele é baseado em uma equação empírica que pode ser aplicada por quase todas as curvas de dissolução. Nos sistemas farmacêuticos de liberação de fármacos onde esse modelo de cinética é aplicado, a equação expressa a fração acumulada de fármaco dissolvida em determinado tempo. Nessa escala, o parâmetro *b* define o formato da curva através de um valor; se menor que 1 a curva é definida como parabólica, se igual a 1 a curva é denominada exponencial, e se maior que 1 ela é caracterizada como sigmoide (Lobo; Costa, 2001). O valor de *b* também está relacionado com o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica (Papadopoulou *et al*., 2006). Desta forma, valores de $b \leq 0,75$ indicam liberação através de difusão Fickiana (Caso I); $0,75 < b < 1$ corresponde a uma difusão Fickiana associada ao Caso-II e $b > 1$ a um mecanismo de liberação complexo (Papadopoulou *et al*., 2006).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - exp(-\alpha t^b) \quad (eq. 6)$$

onde *Mt/M∞* é a quantidade cumulativa de fármaco liberado no tempo *t* e no tempo infinito, respectivamente; α é o parâmetro de escala e *b* é o parâmetro de forma.

Por sua vez, o modelo proposto por Korsmeyer-Peppas, em 1985, é definido como semi-empírico e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco ao tempo decorrido, de acordo com a equação abaixo:

$$\int = at^n \qquad (eq.\ 7)$$

Onde, *a* representa uma constante de incorporação estrutural e características geométricas da forma farmacêutica; *n* se refere ao expoente de liberação, indicando o mecanismo de liberação do fármaco em questão; e, por fim, a função de *t* corresponde à massa de MP em determinado tempo e em seu estado de equilíbrio.

Ao propor o modelo, Peppas utilizou o exponente de liberação (*n*) para caracterizar distintos mecanismos de liberação e definiu que valores de *n* = 0,43 seguem a lei de difusão de Fick e valores de *n* entre 0,43 e 0,85 seguem modelos não-Fickianos, sendo que se estiverem nesse intervalo indicam transporte anômalo, se iguais a 0,85 indicam transporte Caso-II e se maiores que 0,85 indicam transporte Super Caso-II, caracterizados por mecanismos como o relaxamento de caideia polimérica ou inchaço.

Tabela 13 - Valores do parâmetro b do modelo cinético de Weibull nas MPs AR/P/SD/AFD revestidas com ALG em pH 1,2, 7,4 e 6,8, respectivamente.

	Valores de *b*		
Amostras	**pH 1,2**	**pH 7,4**	**pH 6,8**
1:1D-A	0,9485	1,4207	1,5532
1:2D-A	0,8285	1,4420	1,3194
2:1D-A	0,7302	1,3915	1,2866
2:2D-A	0,5628	1,3367	1,0233

Fonte: Autoria Própria (2025)

A análise dos valores de *b* revelou que, em meio ácido, a liberação do 5-ASA das formulações 1:1D-A e 1:2D-A seguiu um mecanismo de difusão não Fickiano associada ao Caso II, que envolve a difusão simultânea e o relaxamento da cadeia polimérica, embora o intumescimento seja limitado neste pH. Em contrapartida, as MPs 2:1D-A e 2:2D-A, apresentaram um mecanismo puramente Fickiano ($b < 0,75$), o que está em concordância com os valores de *n* obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas (Tabela 14) para essas formulações.

Em meio intestinal (pH 7,4), a liberação de todas as MPs foi governada pelo modelo de Weibull, com $b > 1$ (Tab. 12), indicando um mecanismo de liberação complexo, ou seja, combinações de difusão, dissolução, erosão, intumescimento, entre outros processos, o que está em consonância com as modificações poliméricas esperadas nesse valor de pH. Por fim, em meio colônico, as amostras 1:1D-A e 2:1D-A apresentaram liberação governada pelo modelo de Weibull, com $b > 1$, enquanto as amostras 1:2D-A e 2:2D-A mostraram uma correlação maior, embora discreta, com o modelo de Korsmeyer-Peppas, com $0,45 < n < 0,89$, sugerindo transporte anômalo (Tabela 13). Embora o modelo de Korsmeyer-Peppas apresente valores de r^2 mais elevados para essas amostras, uma análise das propriedades físico-químicas do sistema desenvolvido indica que a pequena redução do pH de 7,4 para 6,8, experimentada pelo sistema, não deve alterar seu mecanismo de liberação, visto que ambos os valores são consideravelmente próximos e superiores aos pKas dos polímeros que compõem as MPs. Assim, conclui-se que, em meio colônico, todas as amostras apresentaram a liberação governada por um mecanismo complexo.

Isso corrobora com o estado macroscópico das MPs observado após o ensaio de liberação, onde após 2h em meio ácido elas ainda permaneciam intactas, provavelmente devido à proteção fornecida pelo ALG e ausência de ionização. Por sua vez, após contato com os meios intestinal e colônico, as MPs se mostraram gelatinosas e intumescidas, o que era esperado devido ao sistema polimérico que as compõe, confirmando o transporte complexo.

Tabela 14 - Valores do expoente n obtido através do modelo cinético de Korsmeyer-Peppas nas MPs AR/P/SD/AFD revestidas com ALG em pH 1,2, 7,4 e 6,8, respectivamente.

	Valores de *n*		
Amostras	**pH 1,2**	**pH 7,4**	**pH 6,8**
1:1D-A	0,2155	0,5076	0,6263
1:2D-A	0,2168	0,5597	0,5350
2:1D-A	0,1222	0,5012	0,5016
2:2D-A	0,0947	0,4867	0,5049

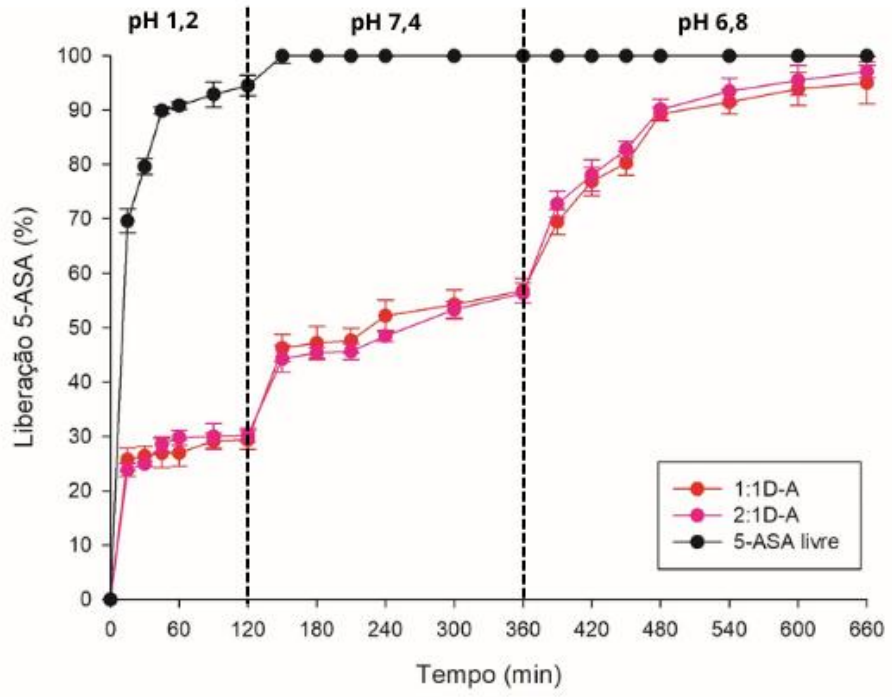
Fonte: Autoria Própria (2025)

5.10.3. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA em presença de conteúdo enzimático

As amostras 1:1D-A e 2:1D-A foram as que proporcionaram maior controle sobre as taxas de liberação do fármaco (Fig. 33), apresentando os perfis de liberação mais adequados para o sistema proposto. Por esse motivo, foram selecionadas para o ennsaio de liberação *in vitro* na presença de conteúdo enzimático, nos meios gástrico (pH 1,2, acrescido de pepsina), intestinal

(pH 7,4, acrescido de pancreatina) e colônico (pH 6,8, contendo α-amilase, pectinase e dextranase), cujos perfis estão apresentados na Figura 36.

Figura 36 - Perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA a partir de MPs otimizadas. O perfil foi obtido pelo método de dissolução com troca sequencial de meio diretamente na cuba, utilizando meios gastrintestinais simulados contendo enzimas: meio gástrico (pH 1,2, com pepsina), meio intestinal (pH 7,4, com pancreatina) e meio colônico (pH 6,8, com α-amilase, pectinase e dextranase)



Fonte: Autoria Própria (2025)

O presente teste visou simular o ambiente real do cólon, no qual existe intensa atividade microbiana e enzimática. Dessa forma, com a adição de conteúdo enzimático, espera-se observar aumento e maior velocidade da liberação do 5-ASA, devido à digestão dos polímeros naturais (A, P e SD), utilizados como matriz do sistema de liberação desenvolvido.

O modelo de liberação utilizando troca sequencial de meios diretamente na cuba de dissolução foi selecionado, uma vez que oferece várias vantagens em comparação aos ensaios feitos em meios isolados. Dentre eles, destaca-se o fato de simular mais adequadamente as condições fisiológicas *in vivo*, já que o TGI é um sistema dinâmico onde os medicamentos passam sequencialmente por ambientes com diferentes pHs, força iônica, enzimas e características químicas. A troca sequencial de meio reflete essa transição, permitindo observar como o sistema responde à mudança gradual do ambiente.

Por meio da Figura 34, foi possível observar que a liberação de 5-ASA foi maior na presença de conteúdo enzimático em todos os meios testados. Em FGS, aproximadamente 30%

do fármaco foi liberado em 2 horas com pepsina, contra cerca de 25% no ensaio sem enzimas. Em FIS, a liberação atingiu cerca de 55% em 4 horas com pancreatina, enquanto a liberação sem enzimas foi de aproximadamente 45%. Já no meio colônico, a liberação foi praticamente completa na presença de enzimas, alcançando 100% após 5 horas, contra 65 a 70% em meio colônico sem conteúdo enzimático. Esses resultados indicam que os polímeros presentes nas MPs apresentam alguma resistência à digestão pelas enzimas nos ambientes gástrico e intestinal, mas são significativamente digeridos pelas enzimas do ambiente colônico. Especificamente, a MP 1:1D-A apresentou 95% de liberação de 5-ASA ao final do experimento, enquanto a MP 2:1D-A liberou cerca de 97% de fármaco. Ao comparar esses dados com os resultados obtidos na ausência de enzimas (Fig. 33), confirma-se que as MPs desenvolvidas são degradadas pelas enzimas colônicas, caracterizando a liberação sítio-específica do fármaco.

No estudo de Talukder & Fassihi (2008), foi desenvolvido um sistema de liberação controlada contendo 5-ASA e com matriz de pectina. Os ensaios de liberação *in vitro* foram feitos nos meios FGS e FCS com presença e ausência de enzimas pectinolíticas e foi observado que a presença das mesmas aumentou significativamente a liberação do fármaco em meio colônico, confirmando a importância da degradação enzimática para a liberação específica no cólon.

Butte; Momin; Deshmukh (2014) também comprovaram a maior liberação de fármaco na presença de enzimas em um sistema de comprimidos de curcumina com revestimento de pectina e Eudragit, evidenciando a eficácia do sistema em liberar o fármaco especificamente na região colônica.

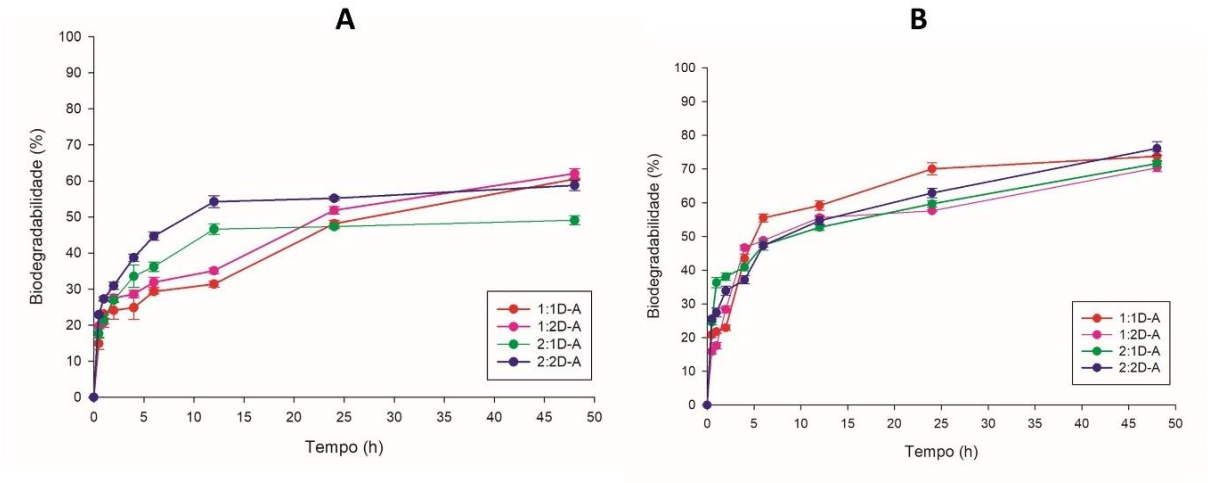
Por fim, no estudo de Bisharat *et al.* (2019) foram desenvolvidos filmes de zeína com amido de alta amilose para liberação cólon-específica de paracetamol e esse estudo também foi feito em condições simuladas do ambiente gástrico e cólon. Foi comprovado que, após a adição de conteúdo enzimático, a liberação do fármaco se mostrou reduzida no meio gástrico e aumentada na região colônica. Com isso, pode-se inferir que a presença de enzimas é essencial para a liberação eficaz do fármaco.

5.10.4. Avaliação da responsividade da erosão das MPs e da liberação *in vitro* do 5-ASA à presença de EROs

O perfil de erosão das MPs, tanto na ausência quanto na presença de EROs, está apresentado na Figura 35. Na ausência de H_2O_2 (Fig. 35A), as MPs tiveram uma biodegradabilidade entre cerca de 45 e 67%, sendo que após a adição de 1 mM de H_2O_2 (Fig. 35B), a biodegradabilidade das amostras variou entre aproximadamente 67 e 78%. Assim, foi

possível observar que a degradabilidade das MPs em meio colônico aumentou com o tempo, bem como com a adição de H_2O_2, o que pode ser considerado uma medida indireta e sugestiva da responsividade do AFD às EROs. Além disso, tal comportamento confirma que o fármaco encapsulado poderia se liberar rapidamente e localmente do sistema desenvolvido para a área inflamada concentrada em EROs, além de que as MPs poderiam ser metabolizadas do corpo, atuando como um transportador de fármacos seguro e eficiente com considerável redução de efeitos adversos, quando comparados a sistemas tradicionais (Zhu *et al.*, 2023).

Figura 37 - Taxa de biodegradabilidade das MPs AR/P com reticulação dupla e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) em FCS (pH 6,8) na ausência (A) e na presença de H_2O_2



Fonte: Autoria Própria (2025)

O AFD contém grupos borônicos (-$B(OH)_2$) que são altamente reativos com espécies oxidantes, como o H_2O_2, transformando-o em subprodutos menos reativos. De acordo com Zhu e colaboradores (2023) (Fig. 36), o AFD sofre oxidação na presença de H_2O_2, eliminando as EROs por meio da quebra das ligações carbono-boro e inserção de um átomo de oxigênio entre os átomos de carbono e boro para formar ligações boro-oxigênio. O borato ($B(OH)_4^-$) resultante é hidrolisado e o grupo fenol sofre rearranjo, formando consequentemente hidroquinona (um antioxidante secundário que pode continuar a eliminar EROs no meio reacional), cadeias poliméricas livres e ácido borônico (Zhu *et al*., 2023; Hoang *et al*., 2017; Li *et al.,* 2019; Zhao *et al.,* 2019). As reações químicas envolvidas são apresentadas abaixo:

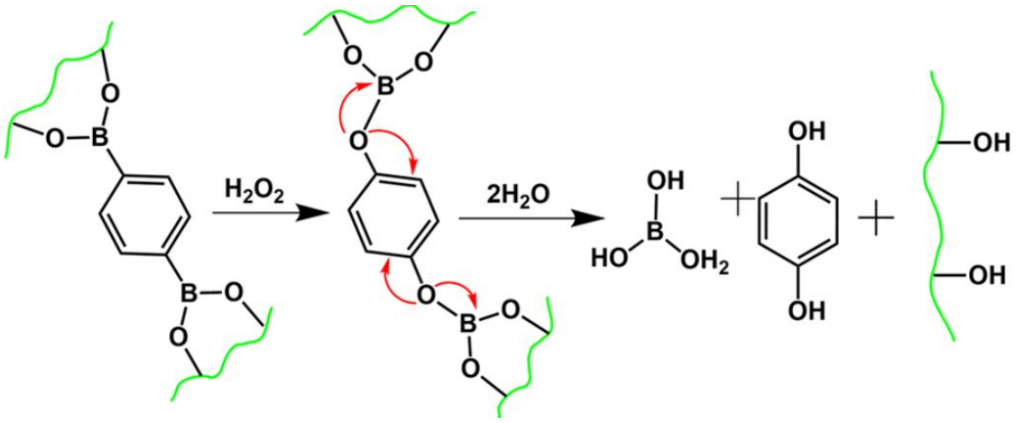
1. **Oxidação do AFD:**

$$Ph{-}B(OH)_2 + H_2O_2 \rightarrow Ph{-}B(OH){-}O + H_2O$$

2. **Hidrólise do intermediário borato:**

$$Ph{-}B(OH){-}O + H_2O \rightarrow Ph{-}OH\ (\text{hidroquinona}) + B(OH)_3\ (\text{ácido borônico})$$

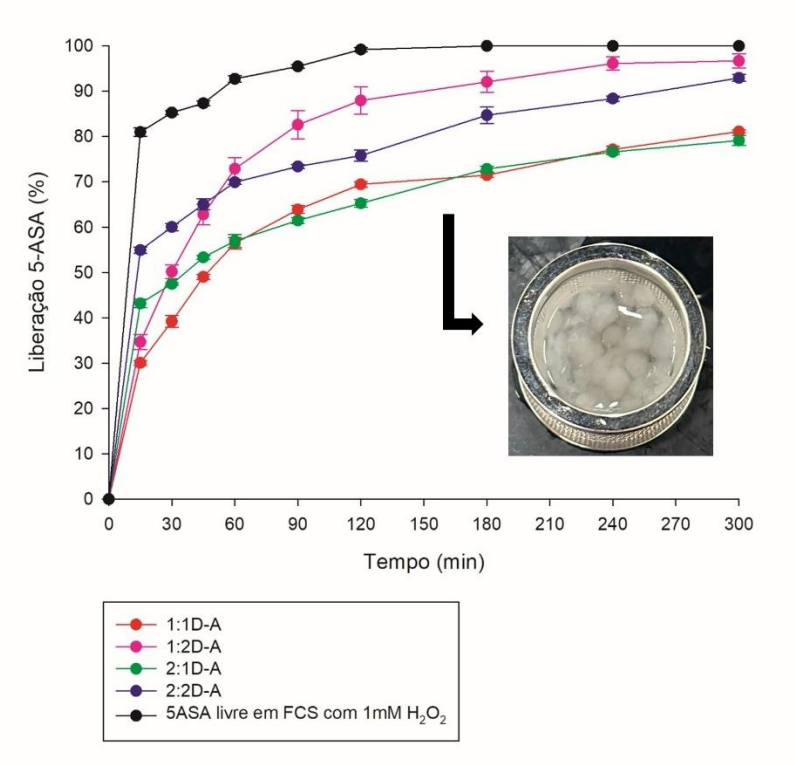
Figura 38 - Ilustração esquemática do mecanismo de eliminação de EROs pelo AFD



Fonte: Adaptado de Zhu *et al*. (2023)

Complementando os resultados de erosão obtidos acima, o perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA na presença de EROS, simulado com a adição de 1mM de H_2O_2 em FCS está apresentado na Figura 37. Observa-se que, ao final dos 300 minutos de ensaio, a liberação cumulativa variou entre 79% e 96% na presença de H_2O_2, em comparação a 67% e 83% na sua ausência (Figura 33C). Além disso, a sensibilidade do sistema às EROs foi mais acentuada nos primeiros 15 minutos, período em que a liberação atingiu entre 30% e 54% com o agente oxidante (Figura 37), enquanto sem ele a liberação ficou entre 20% e 39% (Figura 33C). O aumento da degradação das MPs expostas ao oxidante foi confirmado visualmente por meio do aspecto gelatinoso dessas amostras, em contraste com a morfologia mais íntegra observada nas amostras não expostas.

Figura 39 - Perfil de liberação in vitro do 5-ASA a partir de MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 5-ASA (0,5% e 1,0%) no meio colônico pH 6,8 com adição de 1mM de H_2O_2.



Fonte: Autoria Própria (2025)

Os resultados demonstram que as MPs desenvolvidas apresentam um sistema de liberação com responsividade múltipla, respondendo tanto à presença de enzimas específicas do TGI quanto à ação de EROs, o que confere um mecanismo duplo para otimizar a liberação do fármaco. Primeiramente, a liberação significativamente maior em meio colônico contendo enzimas sugere que a digestão enzimática é um fator-chave para a liberação sítio-específica do 5-ASA, permitindo que o fármaco seja protegido nos ambientes gástrico e intestinal e liberado predominantemente na região alvo da colite. Por outro lado, a resposta aumentada à presença de EROs, especialmente nos estágios iniciais do ensaio, indica que as MPs também são sensíveis a condições inflamatórias, nas quais a concentração de radicais livres está elevada. Essa característica é particularmente relevante, pois a RCU e outras DII´s são marcadas por estresse oxidativo local, sugerindo que a liberação do fármaco pode ser ainda mais eficiente em locais de inflamação ativa.

5.11. Estudos celulares em células de adenocarcinoma colônico humano (Caco-2)

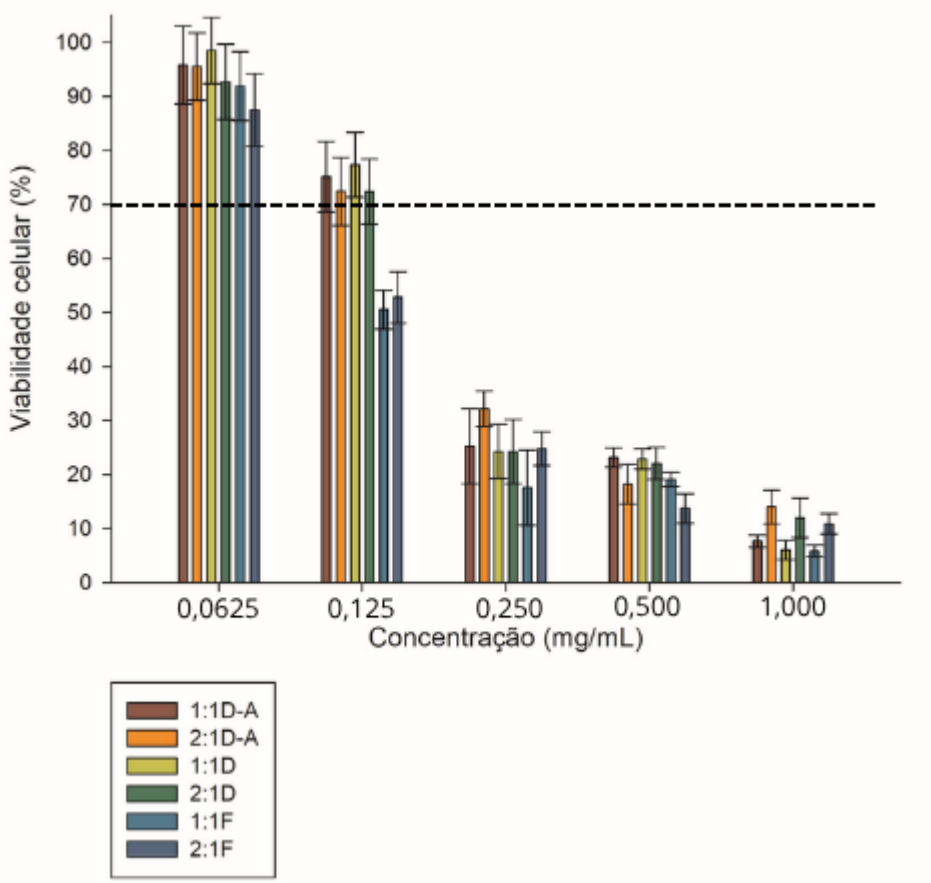
5.11.1. Viabilidade celular

Segundo a Organização Internacional de Padronização (International Standard Organization – ISO), a norma ISO 10993 estabelece que o ensaio de citotoxicidade deve ser o

primeiro a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial destinado a fins clínicos, confirmando a ausência ou presença de toxicidade (Rogero; Ikeda, 2003).

Para avaliar a biocompatibilidade e a segurança das MPs desenvolvidas para administração oral cujo local de ação é o cólon, foram realizados estudos *in vitro* de viabilidade celular utilizando células intestinais Caco-2, pelo método de Alamar Blue®. Como observado na Figura 38, o ensaio revelou que as células Caco-2 apresentaram viabilidade entre 5,80 e 98,50% após 6h de contato com as amostras. As MPs nas concentrações de 62,5µg/mL e 125 µg/mL podem ser consideradas biocompatíveis, pois as porcentagens de viabilidade variaram entre 72,50 e 98,50%, exceto para as amostras 1:1F e 2:1F, cujas viabilidades, na concentração de 125 µg/mL foram de 50,50 e 52,80%, respectivamente (valor de referência para biocompatibilidade: ≥70 %) (Boni *et al.*, 2018). Para essas amostras, a redução na viabilidade celular pode estar associada a uma maior quantidade residual de íons Al^{3+} adsorvidos na superfície das MPs, decorrente da ausência dos processos de imersão em soluções de AFD e ALG. Tal condição possivelmente resultou em menor remoção ou complexação desses íons, promovendo maior exposição aos íons de alumínio e, consequentemente, aumento da citotoxicidade do sistema. Meneguin *et al.* (2024), em seu estudo, demonstraram que os polímeros e o 5-ASA também eram desprovidos de toxicidade, já que suas porcentagens de viabilidade foram em torno 90 a 95% para ambos na faixa de concentração de 0,0625 a 1,000 mg/mL.

Figura 40 - Viabilidade das células Caco-2 após tratamento com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA durante 24h a várias concentrações (0,0625 a 1 mg/mL) (média ± desvio padrão, n=3)



Fonte: Autoria Própria (2025)

Nas maiores concentrações utilizadas no ensaio, a grande quantidade de MPs em um único poço provavelmente afetou as células por diferentes mecanismos. A formação de uma camada densa sobre elas pode ter dificultado as trocas gasosas entre o meio e as células. Além disso, a adsorção de proteínas, íons e nutrientes pelas partículas reduz a disponibilidade desses elementos essenciais. A alteração do microambiente no poço também pode ter criado condições desfavoráveis, enquanto a pressão física exercida pelas MPs pode ter causado danos celulares. Esses fatores, somados, podem ter levado à morte celular, mesmo considerando a biocompatibilidade intrínseca das MPs (Almeida *et al.*, 2019; Alvarez-Paino *et al.*, 2019; Miles *et al.*, 2022)

O IC_{50} é um parâmetro muito utilizado em ensaios de viabilidade celular e que indica a menor concentração de substância necessária para inibir 50% da atividade biológica ou da viabilidade das células. De acordo com a ISO 10993, valores de IC_{50} acima de 100ug/mL, quando analisados em ensaios de viabilidade celular, são considerados seguros e ausentes de

toxicidade (Rogero; Ikeda, 2003). Como observado na Tabela 14, todas as amostras apresentaram valores de IC_{50} acima de 100ug/mL, logo, as mesmas podem ser consideradas seguras.

Tabela 15 - Valores de IC_{50} obtidos nas diferentes formulações de MPs após exposição em células Caco-2

Amostra	IC_{50} (µg/mL)
1:1D-A	165,12
2:1D-A	197,47
1:1D	186,15
2:1D	172,99
1:1F	120,70
2:1F	123,52

Fonte: Autoria Própria (2025)

5.11.2. Medida da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

A resistência elétrica transepitelial (TEER, do inglês *Transepithelial Electrical Resistance*) é uma técnica quantitativa utilizada para medir a resistência elétrica oferecida pela monocamada ao fluxo de íons, ou seja, é o indicativo da formação, integridade e abertura das junções intercelulares (*tight junctions*) antes de serem avaliadas para transporte de fármacos. A medida de TEER é expressa em $\Omega.cm^2$ e valores considerados adequados para experimentos de transporte dependem do tipo celular utilizado. Por exemplo, em células Caco-2, valores entre 300 e 500 indicam a formação de uma monocamada intacta e com junções bem formadas, em boas condições para conduzir o experimento, sendo que quanto mais elevado o valor de TEER, mais estreitas estão as junções e menor a permeabilidade paracelular (Shuler; Hickman, 2016).

Nesse sentido, a medição de TEER foi empregada como ferramenta para monitorar a integridade das monocamadas celulares antes e após o ensaio de permeabilidade. Com base na Tabela 15, foi visto que todos os valores iniciais de TEER (405 a 435 $\Omega.cm^2$) indicam que as monocamadas estavam bem formadas, com junções paracelulares intactas, adequadas para a condução do experimento. Após 180 minutos de incubação com as diferentes formulações, observou-se uma discreta redução nos valores de TEER (de 4,9 a 14,6%), embora sem significância estatística ($p > 0,05$), sugerindo que nenhuma formulação comprometeu substancialmente a integridade epitelial. Além disso, tal redução pode ainda indicar que as MPs desenvolvidas induzem um discreto afrouxamento transitório das junções intercelulares, permitindo a permeação do fármaco pela via paracelular, o que também foi verificado por Meneguin e colaboradores (2018) com MPs de insulina revestidas com AR/P.

Tabela 16 - Valores de TEER inicial e TEER final obtidos nas diferentes formulações de MPs após remoção no compartimento apical

Amostras	TEER inicial ($\Omega.cm^2$)	TEER final ($\Omega.cm^2$)	Redução de TEER (%)
5-ASA livre	410 ± 4,72	350 ± 4,77	14,6
1:1D-A	430 ± 4,16	385 ± 3,49	10,5
2:1D-A	410 ± 4,10	390 ± 4,29	4,9
1:1D	405 ± 3,63	380 ± 4,54	6,2
2:1D	435 ± 4,27	380 ± 3,55	12,6
1:1F	405 ± 4,41	355 ± 4,56	12,3
2:1F	415 ± 4,81	360 ± 4,63	13,2

Fonte: Autoria Própria (2025)

5.11.3. Permeabilidade do 5-ASA em monocamadas de células Caco-2

A avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos por meio de modelos celulares é considerada uma etapa crucial no desenvolvimento de novas formulações. Considerando os modelos baseados em cultivo celular estão as monocamadas de células Caco-2, as quais se destacaram devido sua capacidade de simular a absorção intestinal. Essas células se originam de um adenocarcinoma de cólon humano, porém, quando se diferenciam, formam monocamadas semelhantes a enterócitos, com diversas características típicas do epitélio intestinal, como microvilosidades, junções paracelulares, borda em escova definida, enzimas digestivas e sistemas de transporte de nutrientes e fármacos mediados por transportadores específicos. Tais características possibilitam uma avaliação fidedigna do transporte do fármaco e a predição de sua absorção (Meneguin *et al.*, 2024).

Apesar da via oral ser preferencialmente escolhida por sua praticidade, segurança e melhor aceitação do paciente, diversos fatores fisiológicos do TGI superior aliados às limitações do transporte de fármacos pelas células intestinais, podem comprometer significativamente a biodisponibilidade oral dos princípios ativos. Essa biodisponibilidade é fortemente modulada por fatores como solubilidade do fármaco, taxas de dissolução e permeabilidade intestinal, os quais determinam a velocidade com que o fármaco atinja os fluidos intestinais e atravesse o epitélio intestinal. Dessa forma, contornar essas barreiras se torna um ponto chave na eficácia do desenvolvimento de sistemas de liberação orais (Amidon *et al*., 1995; Smetanová *et al.*, 2013).

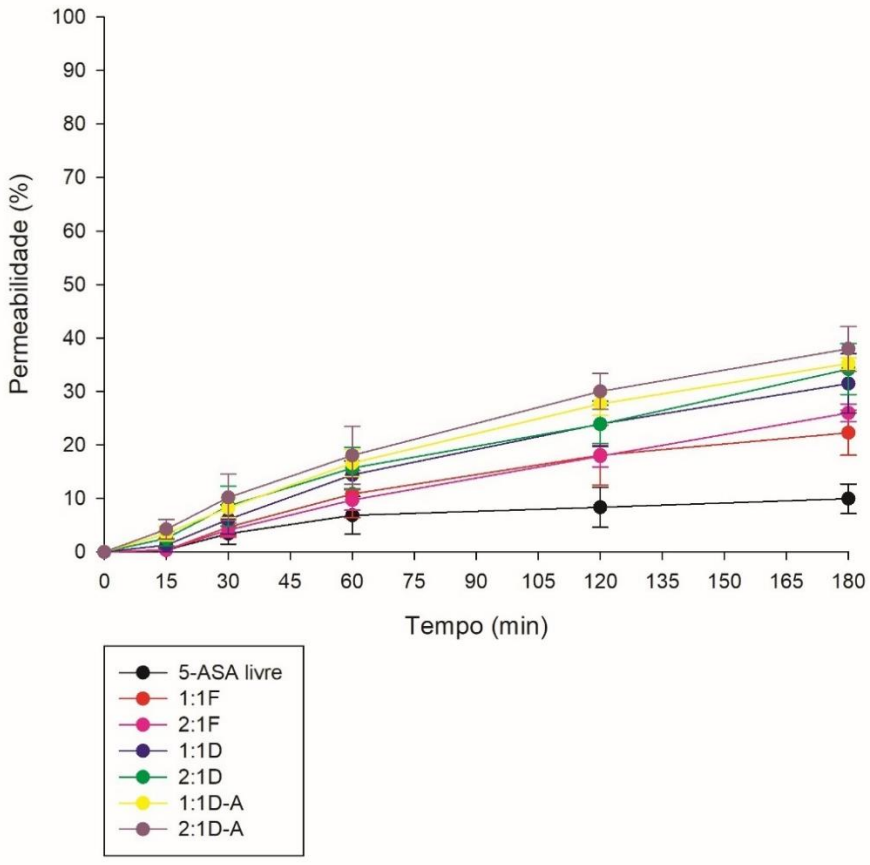
De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), proposto por Amidon e colaboradores (1995), o 5-ASA é classificado como um fármaco de classe IV, uma vez que apresenta, simultaneamente, baixa solubilidade e baixa permeabilidade. No trabalho de Kumar *et al.* (2018), o 5-ASA apresentou biodisponibilidade aproximada de 25% após administração oral, representando uma absorção limitada. Este fármaco possui solubilidade pH-dependente e biodisponibilidade bem variada, considerando a variação de pH ao longo do TGI e a forma farmacêutica em questão. Em formulaçãoes convencionais, observa-se uma alta absorção do fármaco nas porções superiores do TGI, o que acarreta em redução expressiva da concentração

de 5-ASA no cólon, principal sítio terapêutico, além do aumento da incidência de efeitos adversos indesejados (Colombel, 2018; Nakagawa *et al.*, 2018).

Diante dessas limitações, destaca-se a relevância do desenvolvimento de sistemas de liberação inovadores que promovam o direcionamento de 5-ASA ao cólon, visando elevar sua concentração local em áreas inflamadas e modular as propriedades físico-químicas para restringir a absorção sistêmica e favorecer efeito terapêutico localizado (Meneguin *et al.*, 2024).

Com base nessa abordagem, foi conduzido um ensaio de permeabilidade intestinal *in vitro* utilizando monocamadas de células Caco-2, cujos resultados estão apresentados na Figura 39. Conforme demonstrado, o 5-ASA livre apresentou 9,80% de permeabilidade no sentido apical-basolateral após 180 min de exposição, indicando permeação limitada e confirmando sua classificação como fármaco de classe IV no BCS. Esse comportamento é corroborado por seu baixo valor de permeabilidade aparente (Papp = 1,75 x 10^{-6} cm s^{-1}, Tab. 16), indicativo de baixa capacidade de absorção intestinal (Smetanová *et al.*, 2013).

Figura 41 - Permeabilidade in vitro do 5-ASA (%) através de monocamadas de células Caco-2 após incubação com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA (média ± desvio padrão, n=3)



Fonte: Autoria Própria (2025)

Tabela 17. Valores do coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) e razão de aumento de absorção (R) das MPs após exposição em células Caco-2

Amostra	P_{app} (x 10^{-6} cm s^{-1})	R
5-ASA livre	1,75 ± 1,43	-
1:1D-A	18,64 ± 1,50	10,63
2:1D-A	20,85 ± 0,83	11,91
1:1D	25,18 ± 2,39	14,39
2:1D	26,25 ± 2,11	15,01
1:1F	26,42 ± 1,34	15,11
2:1F	28,79 ± 1,47	16,45

Fonte: Autoria Própria (2025)

Em contraste com o comportamento do fármaco livre, a incorporação de 5-ASA nas MPs resultou em um aumento significativo da permeabilidade intestinal ($p < 0,05$), com taxas variando entre 22,28 e 37,99%, em comparação aos apenas 9,80% observados para o 5-ASA livre. De acordo com Meneguin *et al.* (2018), esse aumento pode estar relacionado à interação da blenda AR/P com proteínas e receptores nas junções paracelulares, promovendo sua abertura e, consequentemente, favorecendo o transporte do fármaco.

Ao comparar as formulações 1:1D-A e 2:1D-A com as amostras 1:1F e 2:1F observou-se que as MPs reticuladas apenas por ligação iônica apresentaram os menores percentuais de permeação do 5-ASA, enquanto as formulações quimicamente reticuladas e/ou revestidas com ALG exibiram maior absorção. Embora a reticulação química tenha contribuído para o prolongamento da liberação do fármaco, e o revestimento com ALG atue como barreira física adicional, os resultados indicam que a taxa de liberação não foi o fator limitante da permeação intestinal. De fato, as amostras que liberaram menos fármaco foram as que apresentaram maior permeabilidade (como evidenciado pelos valores mais elevados de P_{app} para as amostras revestidas com ALG).

Considerando-se a diferença estatística significativa entre as amostras revestidas com ALG e aquelas reticuladas ionicamente sem revestimento ($p < 0,05$), e a ausência de diferenças significativas entre as formulações com diferentes tipos de reticulação (química vs. iônica; $p > 0,05$), infere-se que os componentes AFD e SD não exerceram efeito relevante sobre a permeabilidade intestinal. Assim, o aumento de permeação observado pode ser atribuído predominantemente ao ALG. Esse efeito é corroborado por Déat-Lainé *et al.* (2013) que relataram em estudos com MPs à base de *whey protein* e ALG para administração oral de insulina, que o ALG possui a capacidade de modular a permeabilidade paracelular por meio da abertura reversível das junções paracelulares.

Cabe ressaltar que o objetivo principal das formulações desenvolvidas neste trabalho é garantir a liberação controlada e localizada do 5-ASA no cólon, promovendo ação tópica sobre a

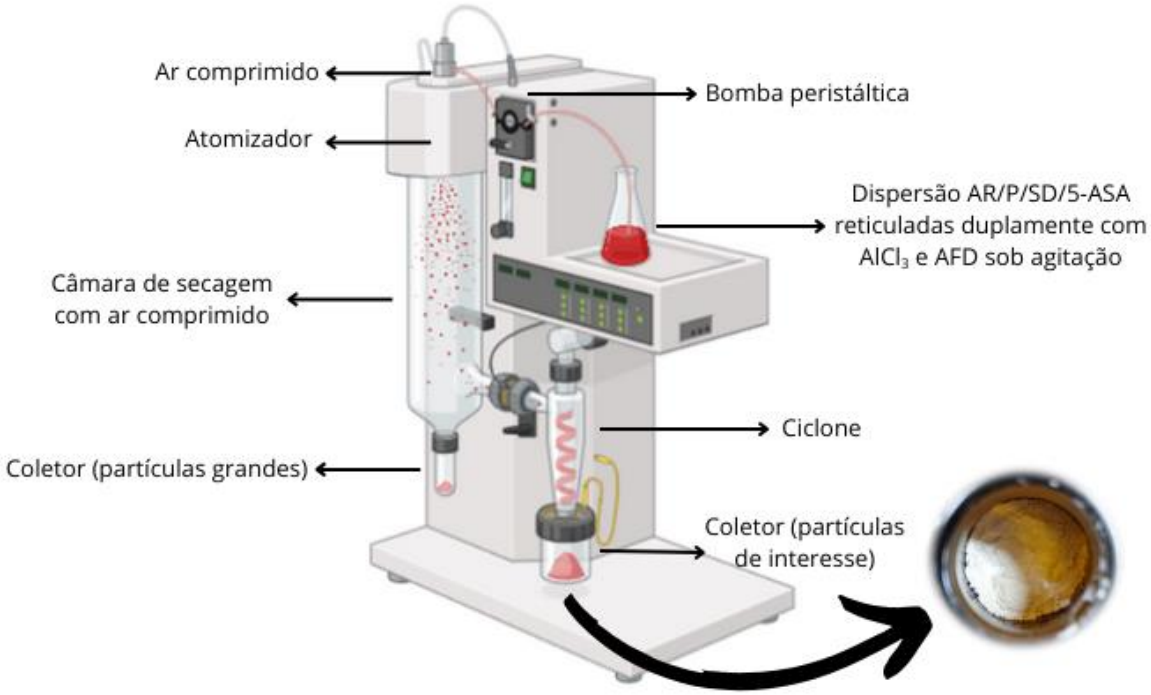
mucosa inflamada e minimizando a absorção sistêmica precoce, a qual poderia comprometer a eficácia terapêutica local e potencializar os efeitos adversos. Sob essa perspectiva é relevante destacar que, mesmo na formulação com maior taxa de permeação (~39%), uma fração substancial do fármaco (aproximadamente 61%) permanece disponível para exercer seu efeito local no cólon.

5.12. Obteção de MPs pela técnica de spray-drying

Como é esperado com o ensaio de habilidade de vetorização para macrófagos ativados que as MPs sejam internalizadas pelos receptores, foi necessária uma otimização no tamanho das MPs, uma vez que as mesmas obtidas por geleificação ionotrópica apresentavam tamanho maior que o receptor, e assim, não seriam internalizadas.

Dessa forma, a microencapsulação do 5-ASA a partir da dispersão AR/P de baixo GE na proporção 1:4 juntamente com SD em diferentes concentrações foi realizada pelo método de *spray-drying*, conforme observado na Figura 42.

Figura 42 - Representação esquemática do método de spray-drying para a formação de MPs



Fonte: Autoria própria (2025)

Conforme observado na Tabela 17, o processo de microencapsulação por *spray-drying* apresentou bom rendimento para as amostras com fármaco, o qual variou entre 53,70 e 62,60%. Já para as amostras controle, foi observada uma redução no rendimento para 29,26%. Tal fato pode ser explicado por diversos fatores, mas principalmente pelo menor teor de sólidos incorporado à dispersão, que resulta na formação de partículas de diâmetro reduzido e maiores perdas no exaustor; e redução nas interações poliméricas com o 5-ASA e Al^{3+}-5-ASA, o que pode dificultar a formação da MP e implicar em maiores perdas durante o processo. Além disso, o aumento na concentração de SD não interferiu significativamente no rendimento final do processo ($p>0,05$).

Tabela 18 - Rendimento do processo (%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por por spray-drying.

Amostras	Média ± DP (%)
1D	29,26 ± 1,88
1-1D	62,60 ± 1,29
2-1D	53,70 ± 2,04

Fonte: Autoria própria (2025)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 18, o método de *spray-drying* originou MPs com elevados valores de EE%, os quais variaram entre 67,03 e 72,85%. Além disso, o aumento da concentração de SD não influenciou significativamente a EE% ($p>0,05$).

Tabela 19 - EE(%) das amostras AR/P contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA reticuladas física e quimicamente com Al^{3+} e AFD, respectivamente, após microencapsulação por spray-drying.

Amostras	Média ± DP (%)
1:1D	72,85 ± 1,49
2:1D	67,03 ± 2,01

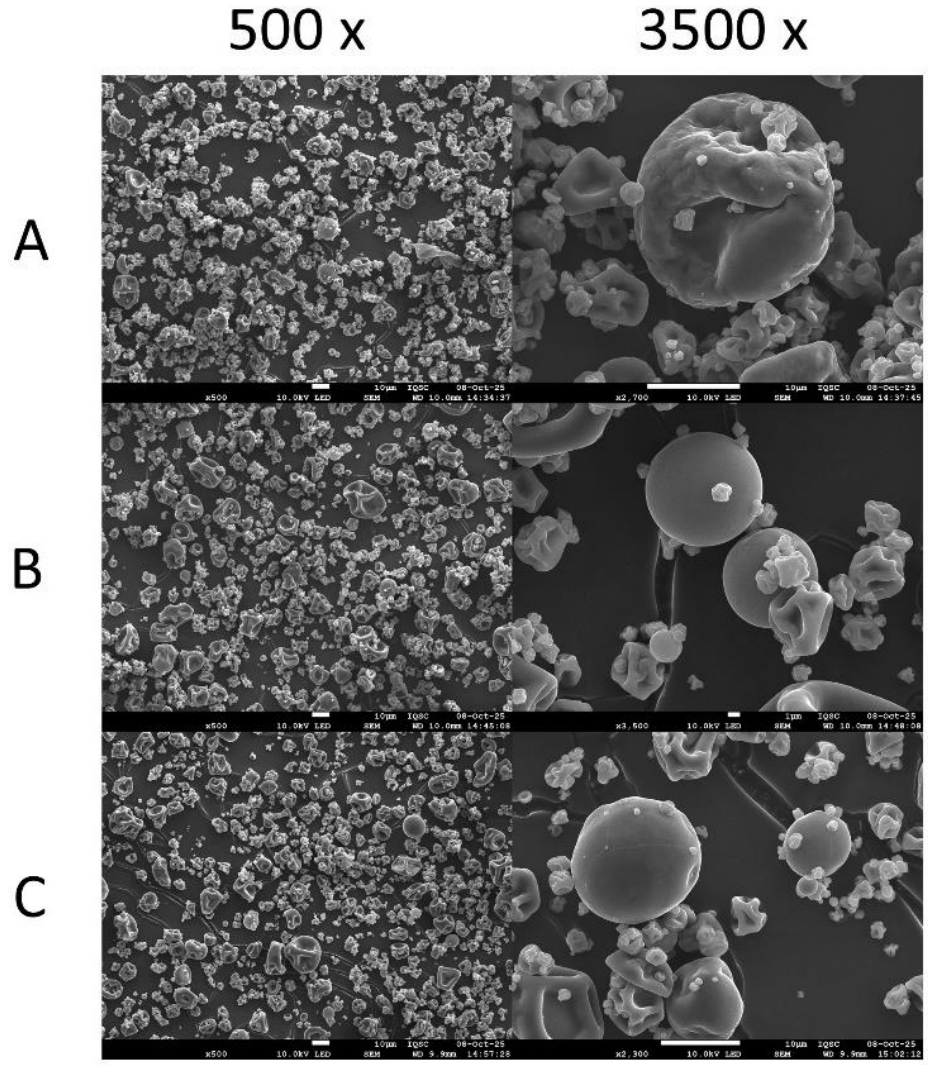
Fonte: Autoria própria (2025)

5.13. Microscopia eletrônica de varredura das MPs obtidas por *spray-drying*

A Figura 43 mostra as fotomicrografias das MPs AR/P/SD reticuladas ionicamente com cloreto de alumínio e quimicamente com AFD, obtidas por *spray-drying*. Através dela, é possível observar um conjunto heterogêneo de MPs, com tamanhos variando entre 2 e 14 μm, aproximadamente, mas com predominância no intervalo entre 4 e 6 μm. Todas as amostras apresentaram um formato esférico característico de MPs obtidas por *spray-drying,* no qual a

solução polimérica é atomizada em gotículas com alta área superficial que rapidamente são transformadas em gotículas secas. Algumas MPs apresentam maior presença de rugosidades e deformações, o que é característico em formulações de polissacarídeos devido à retração da matriz polimérica durante o processo de secagem. Outra característica observada é a presença de MPs menores aderidas às maiores, o que pode ser indicativo de aglomeração eletrostática decorrente do processo de reticulação (Meneguin *et al*, 2021).

Figura 43 - Fotomicrografia das MPs AR/P/SD obtidas por spray-drying, nos aumentos de 500x e 3500x, sendo **A)** 1:1D; **B)** 2:1D; e **C)** 2D.



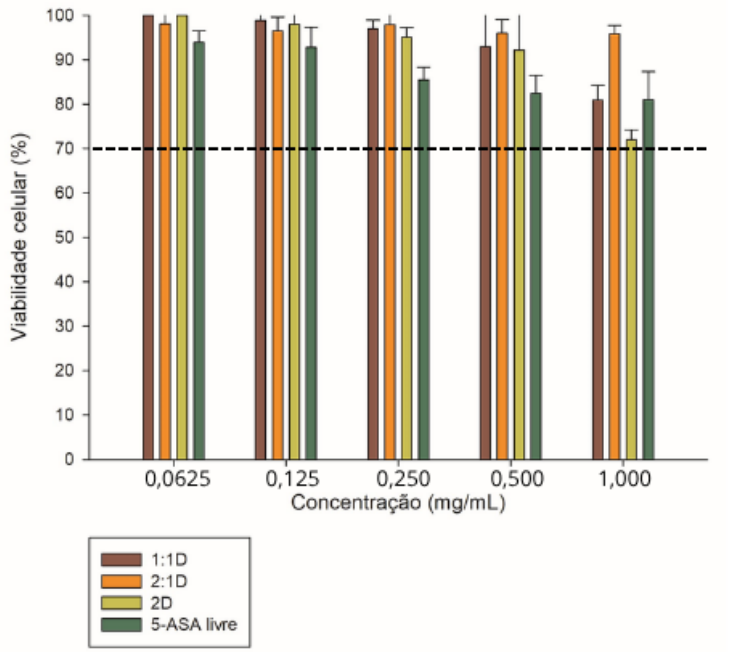
Fonte: Autoria própria (2025)

5.14. Estudos celulares em células de macrófagos RAW 264.7

5.14.1. Viabilidade celular

Como observado na Figura 41, o ensaio de viabilidade celular em células RAW 264.7 revelou que, após 6h de contato com as MPs, as células de macrófagos apresentaram viabilidade entre 71,94 e 100,00% nas concentrações entre 62,5µg/mL e 1000 µg/mL, logo, as mesmas podem ser consideradas biocompatíveis (valor de referência para biocompatibilidade: ≥70 %) (Boni *et al.*, 2018).

Figura 44 - Viabilidade das células de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com MPs baseadas em AR/P com AFD e ALG contendo diferentes concentrações de SD (0,5 e 1,0%) e 0,5% de 5-ASA durante 24h a várias concentrações (0,0625 a 1 mg/mL) (média ± desvio padrão, n=3)

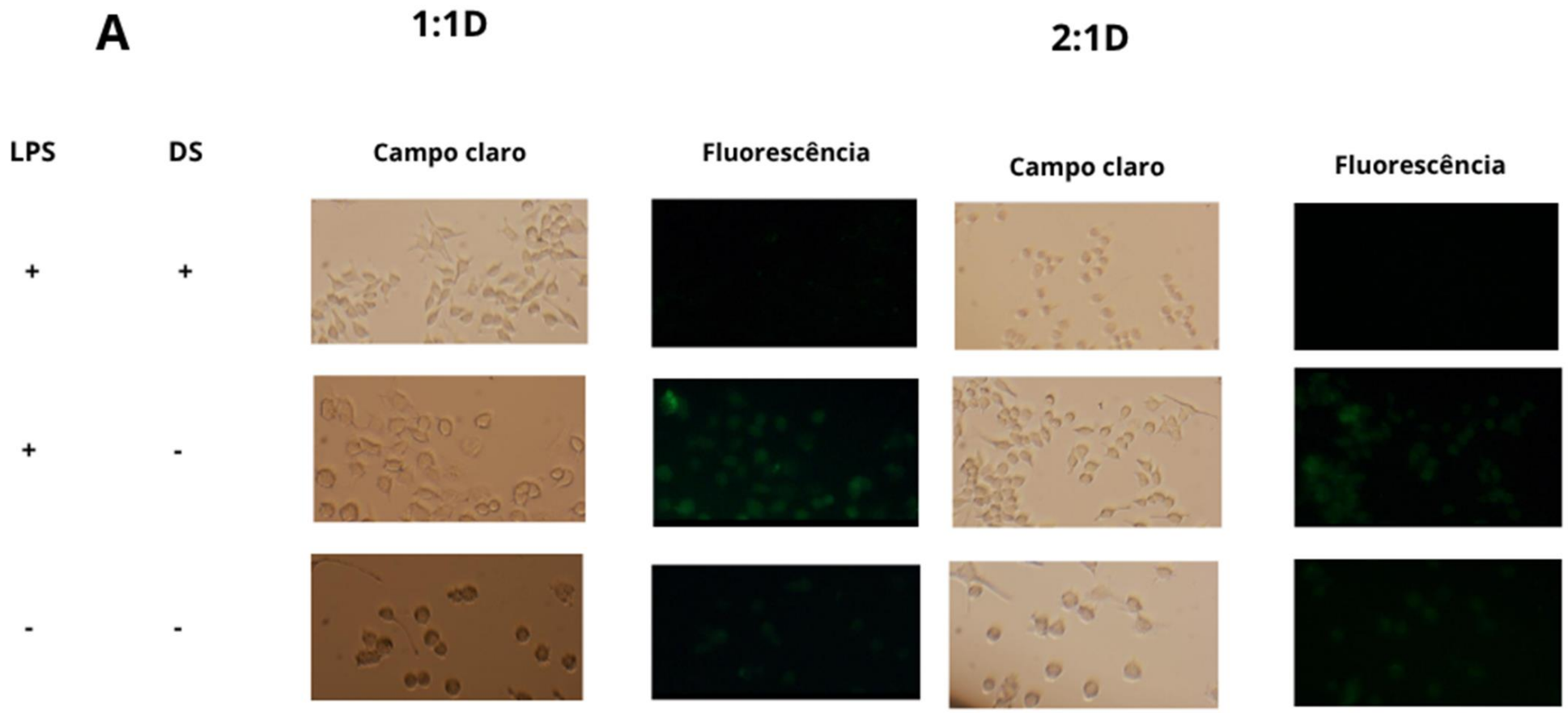


Fonte: Autoria Própria (2025)

5.14.2. Habilidade de vetorização para macrófagos ativados

O SD é um ligante de receptores SR-A1 superexpressos em macrófagos e o LPS foi utilizado para estimular as células de macrófagos RAW 264.7 a fim de verificar a habilidade de direcionamento do sistema desenvolvido a essas células. Foram avaliadas as MPs 1:1D e 2:1D, com base nos melhores resultados de liberação *in vitro* e permeabilidade de 5-ASA. As imagens obtidas em microscópio de fluorescência estão descritas na Figura 44. Previamente e como detalhado na Seção 4.17, as dispersões poliméricas (AR/P/SD) contendo 5-ASA foram reticuladas física e quimicamente e, em seguida, secas pelo processo de *spray-drying.* Isso porque as MPs produzidas por esse método apresentaram diâmetro médio compatível com a fagocitose por macrófagos (10 a 20 µm), possibilitando a internalização real e não apenas adesão superficial. As imagens obtidas em microscópio de fluorescência estão descritas na Figura 45.

Figura 45 - Capacidade de direcionamento das MPs 1:1D (A) e 2:1D (B) para as células RAW 264.7, sendo LPS(+) e SD (+); LPS (+) e SD(-); LPS (-) e SD (-). As MPs foram marcadas com corante fluorescente verde



Fonte: Autoria Própria (2025)

Como pode ser observado na Figura 45, para ambas as amostras, a ativação das células de macrófagos e a presença de SD livre promoveu uma baixa intensidade de fluorescência verde, o que sugere que o SD presente em sua forma livre se ligou aos receptores SR-A1, bloqueando-os e não permitindo o *uptake.* Por sua vez, as células de macrófagos que foram ativadas com LPS e com ausência de SD livre apresentaram alta intensidade de fluorescência verde, o que indica que a presença de SD nas MPs é capaz de direcioná-las para o receptor SR-A1 e promover o *uptake*. Por fim, a ausência de ativação das células com LPS e de SD livre também promoveu baixa intensidade de fluorescência verde, sugerindo baixo *uptake*, ocorrendo por outros mecanismos que não mediado por receptor.

No estudo de Li *et al.* (2021), MPs contendo SD foram desenvolvidas e as mesmas foram coradas com rodamina a fim de avaliar a capacidade de vetorização para macrófagos ativados. Nesse caso, também foi observada maior intensidade de coloração vermelha nas amostras ativadas com LPS e com ausência de SD livre, logo, o SD presente nas MPs realmente pode direcioná-las para os macrófagos ativados, contribuindo para a vetorização da liberação em regiões inflamados para otimização do efeito terapêutico.

6. CONCLUSÕES

O sistema microparticulado desenvolvido, composto por blendas de amido retrogradado (AR), pectina (P) e sulfato de dextrana (SD), reticuladas física e quimicamente com íons Al^{3+} e ácido fenilborônico (AFD) e revestidas com alginato (ALG), demonstrou desempenho altamente promissor para a liberação colônica do 5-ASA. A combinação racional de quatro mecanismos de responsividade, enzimática, redox e direcionamento biológico ativo via SD, sugere ao sistema um comportamento antifalhas, capaz de manter a eficácia terapêutica mesmo diante das variações fisiopatológicas típicas das doenças inflamatórias intestinais. Em pacientes com DII, alterações na microbiota, no pH luminal e na produção de espécies reativas de oxigênio podem comprometer sistemas de liberação convencionais que dependem de um único estímulo. No presente sistema, entretanto, os mecanismos atuam de forma complementar, garantindo que ao menos um deles seja ativado no ambiente inflamatório, assegurando a liberação controlada e seletiva do 5-ASA.

A alta eficiência de encapsulação obtida assegura maior retenção do fármaco no interior das partículas, permitindo reduzir a dose administrada e, consequentemente, os efeitos adversos sistêmicos. A dupla reticulação conferiu estabilidade estrutural e resistência à acidez gástrica, garantindo que o 5-ASA alcance o cólon em sua forma ativa. As análises espectroscópicas e térmicas confirmaram a reticulação covalente, indicando robustez e previsibilidade da formulação, atributos essenciais para sua reprodutibilidade industrial.

A presença do AFD promoveu sinergia terapêutica, elevando a atividade antioxidante para 82% de inibição do radical DPPH e contribuindo para atenuar o estresse oxidativo, componente-chave da fisiopatologia da colite ulcerativa. Paralelamente, a alta mucoadesividade seletiva ao cólon assegura maior tempo de residência e contato do fármaco com o tecido-alvo, favorecendo a ação localizada mesmo diante do trânsito intestinal acelerado.

O revestimento com ALG atuou como barreira protetora frente ao pH ácido, garantindo liberação sítio-específica e proteção da mucosa gástrica. A responsividade enzimática e redox foi confirmada pelos ensaios de liberação e erosão, demonstrando que a liberação do fármaco é intensificada em presença de enzimas colônicas e EROs, ou seja, o sistema é ativado apenas em ambientes inflamatórios.

Os ensaios em células Caco-2 confirmaram a biocompatibilidade e ausência de toxicidade das MPs, além de evidenciarem permeabilidade controlada, favorecendo ação predominantemente local. Já os estudos de captação celular em macrófagos RAW 264.7 confirmaram o direcionamento ativo mediado pelo SD aos receptores SR-A1, o que reforça a seletividade para regiões inflamadas e o potencial de amplificação do efeito terapêutico.

Em conjunto, esses resultados demonstram que o sistema desenvolvido alia estabilidade físico-química, sensibilidade biológica e direcionamento celular, configurando uma estratégia terapêutica de nova geração para o tratamento da colite ulcerativa. A tecnologia proposta representa um avanço significativo em relação às formulações convencionais de 5-ASA, oferecendo potencial de maior eficácia clínica, menor toxicidade e melhor adesão terapêutica no manejo crônico das doenças inflamatórias intestinais.

REFERÊNCIAS

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ALVES, V. M. O. *et al.* Xylan microparticles for controlled release of mesalamine: Production and physicochemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 1-9, 2020.

AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDRÉA, F. *et al.* Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.

BARREIROS, F. M.; FERREIRA, P. J.; FIGUEIREDO, M. M. Calculating Shape Factors from Particle Sizing Data. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 13, n. 6, p. 368–373, 1996.

BONI, F. I. **Microesferas de goma gelana reticulada para liberação controlada de fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2014.

BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; STRINGHETTI, B. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 8, 2015.

CARVALHO, F. C. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1– 18, 2010.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 33–66, 2003.

CONTE, C. M. **Transporte através de membranas biológicas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, 2002.

CRISTINA, A. *et al.* Evaluation of retrograded starch as excipient for controlled release matrix tablets. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 40, p. 83-94, 2017.

DEMARTINO, P.; COCKBURN, D. W. Resistant starch: impact on the gut microbiome and health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 66–71, 2020.

DEV, R. K.; BALI, V.; PATHAK, K. Novel microbially triggered colon specific delivery system of 5-Fluorouracil: Statistical optimization, in vitro, in vivo, cytotoxic and stability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 142–151, 2011.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004.

DIAS, M. L. *et al.* Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, 2017.

DOBRANOWSKI, P. A. Resistant starch, microbiome, and precision modulation. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2021.

FROELICH, A. *et al.* Ionotropic Gelation and Chemical Crosslinking as Methods for Fabrication of Modified-Release Gellan Gum-Based Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, 2023.

GASALY, N.; GOTTELAND, M. Interference of dietary polyphenols with potentially toxic amino acid metabolites derived from the colonic microbiota. **Amino Acids**, v. 54, n. 3, p. 311-324, 2021.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterication by dif f use reflectance fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 327–332, 2000.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1514–1520, 2011.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Blockade of IL-6 and TNF-a inhibited oxLDL-induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 249–254, 2012.

HOANG, T. T.; SMITH, T. P.; RAINES, R. T. A Boronic Acid Conjugate of Angiogenin that Shows ROS-Responsive Neuroprotective Activity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 10, p. 2619-2622, 2017.

HTOON, A. K. *et al.* The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 140–149, 2010.

HRACS, L. *et al*. Global evolution of inflammatory bowel disease across epidemiologic stages. **Nature**, v. 642, n. 1, p. 458-466, 2025.

ITURMENDI, A.; MONKOWIUS, U.; TEASDALE, I. Oxidation Responsive Polymers with a Triggered Degradation via Arylboronate Self-Immolative Motifs on a Polyphosphazene Backbone. **ACS Macro Letters**, v. 6, n. 2, 2017.

International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease. **Global IBD visualization of epidemiology studies in the 21th century – GIVES-21**, 2025. Disponível em: https://kaplan-gi.shinyapps.io/GIVES21/. Acesso em: 20 mar. 2025.

JANA, S. *et al.* Gellan gum (GG) -based IPN microbeads for sustained drug release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 69, 2022.

KHAFAGY, E. *et al.* Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521–1546, 2007.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307-317, 2011.

KOTLA, N. G. *et al.* Bioresponsive drug delivery systems in intestinal inflammation: State-of-the-art and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 146, p. 248–266, 2019.

LAUTENSCHLÄGER, C. *et al.* Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 58–76, 2014.

LE BERRE, C.; HONAP, S.; PEYRIN-BIROULET, L. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 402, p. 571-584, 2023.

LI, J. *et al*. Broad-spectrum reactive oxygen species scavenging and activated macrophage-targeting microparticles ameliorate inflammatory bowel disease. **Biomacromolecules,** v. 22, p. 3107-3118, 2021.

LING, K. *et al.* Alginate / chitosan microparticles for gastric passage and intestinal release of therapeutic protein nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 295, p. 174–186, 2019.

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

LOBO, M. S.; COSTA, P. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2001.

LOPES, S. A. *et al*. Dual-action microparticles for ulcerative colitis: cellulose nanofibers-enhanced delivery of 5-ASA and probiotics. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 291, p. 1-13, 2025.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of yerba mate antioxidants from corn starch-alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 150-157, 2014.

LUTZ, R *et al.* Structure and physical properties of pectins with block-wise distribution of carboxylic acid groups. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 786–794, 2009.

MARIA, S. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Microbiologia Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

MARTINS, A. *et al.* Understanding the role of colon-specific microparticles based on retrograded starch / pectin in the delivery of chitosan nanoparticles along the gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 158, p. 371–378, 2021.

MENEGUIN, A. *et al.* Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140–149, 2014.

MENEGUIN, A. B. *et al.* Retrograded starch / pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 123, p. 84–94, 2018.

MENEGUIN, A. *et al.* Cellulose Nanofibers Improve the Performance of Retrograded Starch / Pectin Microparticles for Colon-Specific Delivery of 5-ASA. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, 2021.

MENEGUIN, A. *et al.* Nanofiber-boosted retrograded starch / pectin microparticles for targeted 5-Aminosalicylic acid delivery in inflammatory bowel disease: In vitro and in vivo non-toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 346, 2024.

MÉYER-DERU, L.; DAVID, G.; AUVERGNE, R. Chitosan chemistry review for living organisms encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 295, p. 1-22, 2022.

MINUZZO, R. *et al.* Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid. **Journal of Coloproctology**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2016.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 2021.

NETSOMBOON, K.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 98, p. 76–89, 2016.

NOJAVAN, S. *et al.* Analytica Chimica Acta Electromembrane extraction of zwitterionic compounds as acid or base: Comparison of extraction behavior at acidic and basic pHs. **Analytica Chimica Acta**, v. 745, p. 45–52, 2012.

PREZOTTI, F. G. *et al.* Mucoadhesive beads of gellan gum / pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.

PURI, V. *et al.* Recent advances on drug delivery applications of mucopenetrative / mucoadhesive particles: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 75, 2022.

RAMASUNDARAM, S. *et al.* Dextran Sulfate Nanocarriers: Design, Strategies and Biomedical Applications. **International Journal Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 2023.

ROGERO, S. O. *et al*. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROQUE BORDA, C. A.; TEIXEIRA, A. S.; DELADINO, L. Evaluación de la actividad antioxidante y polifenoles totals en *Avena sativa* proveniente de la ciudad de Arequipa. **Véritas**, v. 16, n. 1, p. 79-82, 2015.

SAID, N. S.; OLAWUYI, L. F.; LEE, W. Y. Pectin Hydrogels: Gel-Forming Behaviors, Mechanisms, and Food Applications. **Gels**, v. 9, n. 732, p. 1–28, 2023

SANCHEZ-BALLESTER, N. M.; BATAILLE, B.; SOULAIROL, I.. Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. **Carbohydrate Polymers**, v. 270, 2021.

SARDO, H. S. *et al.* A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 558, p. 367–379, 2019.

SHEN, C. *et al.* Smart responsive quercetin-conjugated glycol chitosan prodrug micelles for treatment of inflammatory bowel diseases. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 3, p. 1419-1430, 2021.

SINGH, I.; RANA, V. Techniques for the Assessment of Mucoadhesion in Drug Delivery Systems: An Overview. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 26, n. 18-19, p. 2251-2267, 2014.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 3–18, 2003.

SMETANOVÁ, L. *et al*. Transintestinal transport mechanisms of 5-aminosalicylic acid (*in situ* rat intestine perfusion, Caco-2 cells) and biopharmaceutics classification system. **General Physiology and Biophysics**, v. 32, p. 361-369, 2013.

SOLITANO, V. *et al.* Shaping the future of inflammatory bowel disease: a global research agenda for better management and public health response. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 438-452, 2025.

SOUTO, A. *et al.* Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 184–194, 2008.

SBCP. Maio roxo: estudo aponta que prevalência de doenças inflamatórias intestinalis no Brasil aumentou 15% ao ano em 9 anos. **Sociedade Brasileira de Coloproctologia**, 03 mai. 2024. Disponível em: https://sbcp.org.br/medico/maio-roxo-estudo-aponta-que-prevalencia-de-doencas-inflamatorias-intestinais-no-brasil-aumentou-15-ao-ano-em-9-anos/. Acesso em: 21 mar. 2025.

TAIPALEENMÄKI, E.; STÄDLER, B. Recent Advancements in Using Polymers for Intestinal Mucoadhesion and Mucopenetration. **Macromolecular Bioscience**, v. 20, n. 3, p. 1–9, 2020.

TALUKDER, R. M.; FASSIHI R. Development and in-vitro evaluation of a colon-specific controlled release drug delivery system. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 10, p. 1297-1303, 2008.

TANG, P. *et al.* Mesalazine / hydroxypropyl- β -cyclodextrin / chitosan nanoparticles with sustained release and enhanced anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 418–425, 2018.

VARUM, F. O. *et al.* Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, 2008.

WANG, L. *et al.* Dynamic Boronic Ester Cross-Linked Polymers with Tunable Properties via Side-Group Engineering. **Polymers**, v. 16, n. 24, 2024.

WANG, S. *et al.* Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, 2015.

WANG, T.; FLEMING, E.; LUO, Y. An overview of the biochemistry, synthesis, modification, and evaluation of mucoadhesive polymeric nanoparticles for oral delivery of bioactive compounds. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 2023.

WHISTLER, R. L. **Industrial gums: Polysaccharides and their derivates**. 3ª ed. San Diego: Academic Press, 1993.

WILLIAMS, C. *et al.* Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. **Therapeutics Advances in Gastroenterology**, v. 4, n. 4, p. 237–248, 2011.

WILLIAMS, G. T.; KEDGE, J. L.; FOSSEY, J. S. Molecular Boronic Acid-Based Saccharide Sensors. **ACS Sensors Journal**, v. 6, n. 4, p. 1508-1528, 2021.

WU, Linfeng *et al.* Sustained release of minocycline from minocycline-calcium-dextran sulfate complex microparticles for periodontitis treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 12, p. 3134–3142, 2018.

YANG, J. *et al.* Effect of crosslinking processing on the chemical structure and biocompatibility of a chitosan-based hydrogel. **Food Chemistry**, v. 354, n. 30, 2021.

YONG, K.; MOONEY, D. J. Progress in polymer science alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

ZHAO, J. *et al.* Nanozyme-mediated catalytic nanotherapy for inflammatory bowel disease. **Theranostics,** v. 9, n. 10, 2019.

ZHU, Y. *et al.* Living Probiotics - Loaded Hydrogel Microspheres with Gastric Acid Resistance and ROS Triggered Release for Potential Therapy of Inflammatory Bowel Disease. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 5, n. 1, 2023.