



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

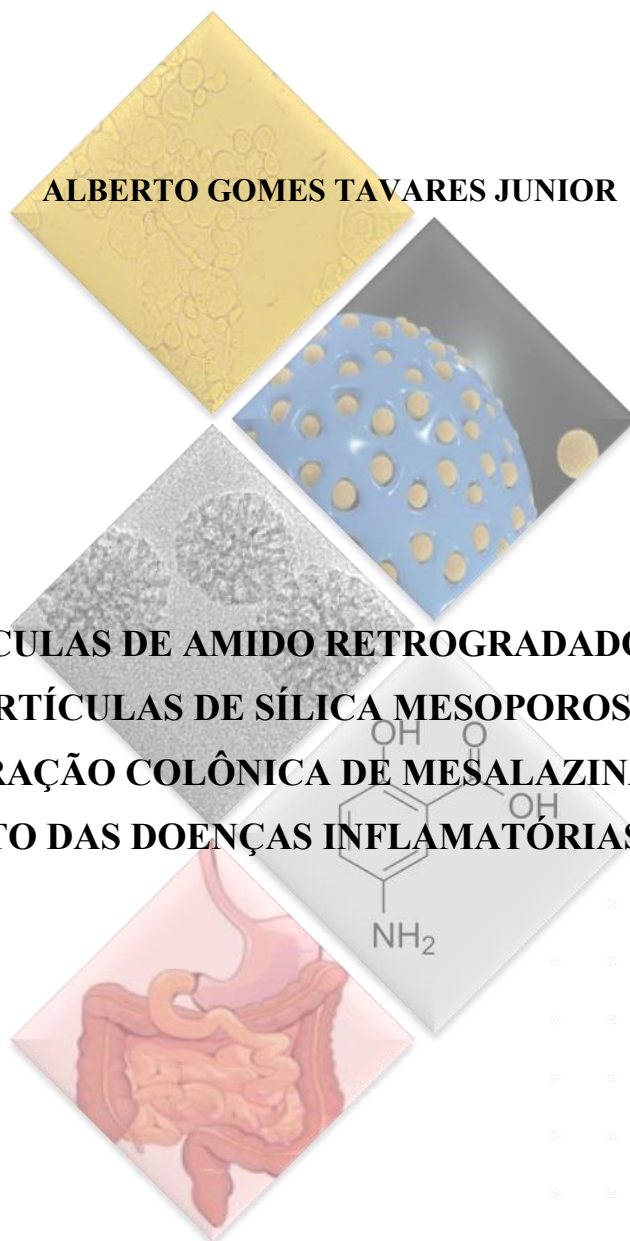
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Campus de Araraquara

ALBERTO GOMES TAVARES JUNIOR

**MICROPARTÍCULAS DE AMIDO RETROGRADADO CARREGADAS
COM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSAS DESTINADAS
À LIBERAÇÃO COLÔNICA DE MESALAZINA PARA O
TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**



Araraquara, SP

2024

ALBERTO GOMES TAVARES JUNIOR

**MICROPARTÍCULAS DE AMIDO RETROGRADADO CARREGADAS COM
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSAS DESTINADAS À LIBERAÇÃO
COLÔNICA DE MESALAZINA PARA O TRATAMENTO DAS DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências,
área de pesquisa em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Prof. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim

Araraquara, SP

2024

T231m Tavares Junior, Alberto Gomes.
Micropartículas de amido retrogradado carregadas com nanopartículas de sílica mesoporosas destinadas à liberação colônica de mesalazina para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais / Alberto Gomes Tavares Junior. – Araraquara, 2024.
101 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientadora: Andréia Bagliotti Meneguín.

1. Micropartícula. 2. Nanopartículas de sílica mesoporosas. 3. Liberação cólon-específica. 4. 5ASA. 5. Doenças inflamatórias intestinais.
I. Chorilli, Marlus, orient. II. Meneguín, Andréia Bagliotti, coorient. III. Título.

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

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Micropartículas de amido retrogradado carregadas com nanopartículas de sílica mesoporosas destinadas à liberação colônica de mesalazina para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais

AUTOR: ALBERTO GOMES TAVARES JUNIOR

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

COORIENTADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. RUBIANA MARA MAINARDES (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

Prof. Dr. RICARDO NEVES MARRETO (Participação Virtual)
Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Goiás (UFG)

Profa. Dra. FERNANDA ISADORA BONI (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP)

Araraquara, 28 de junho de 2024

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, **Vanja e Alberto**, que respeitaram e acreditaram junto comigo que a Farmácia e a pesquisa científica eram o caminho certo para o meu futuro. Aos meus irmãos, **Vitor e Ana Karoliny**, se hoje sou um adulto melhor é por causa deles. À minha amada esposa **Jennifer**, minha companheira de vida, que sempre esteve ao meu lado me compreendendo e apoiando nos momentos em que mais precisei. Amo vocês!

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à **Deus**, pois durante toda a minha jornada me deu saúde, força e sabedoria.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, agradeço imensamente por ter me aceitado como seu aluno em pleno período de pandemia, pelos inúmeros suportes e orientações durante o estudo e por ter acreditado no meu potencial. Acima de tudo, obrigado pela amizade e por ser minha inspiração profissional.

Minha coorientadora, **Prof. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim**, agradeço por todo apoio científico durante o desenvolvimento do projeto e por estimular o meu lado pesquisador e professor a ser cada vez melhor.

Aos meus amigos que me acompanham desde o início dessa jornada, **Jonatas, Victor, Fernanda, Bruna, Suzana, Jessyca, Amanda, Geanne, Mariana, Bruno**, sou eternamente grato pela amizade e apoio de todos.

Aos pesquisadores **Dr. Rafael Sábio, Dra. Marcela Tavares e Dra. Aline Martins**, agradeço o apoio técnico-científico, incentivos e compartilhamento de conhecimentos e experiências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, pela oportunidade de ingressar na pós-graduação, em especial a **equipe da seção técnica de pós-graduação**, que me ajudou com muita paciência e profissionalismo em meio as dificuldades do doutorado.

À equipe do **Laboratório de pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica** (UNESP), agradeço por todo suporte técnico e incentivo.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara** (UNESP), em

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

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado
é alguém que acredite que ele possa ser realizado”*

Roberto Shinyashiki

Resumo

O ácido 5-aminosalicílico (5ASA), é um anti-inflamatório não esteroide, considerado o tratamento de primeira escolha para os estágios leves a moderados de doenças inflamatórias intestinais. Geralmente, são necessárias doses muito altas de 5ASA devido à absorção sistêmica rápida e quase completa na porção intestinal superior, dificultando o alcance dos níveis locais do fármaco na mucosa colônica inflamada. Nesse trabalho, sistemas para a via oral, baseados em nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs) carregadas com 5ASA e incorporadas em micropartículas de amido retrogradado/pectina (MPs AR/P) foram desenvolvidos como um sistema para a liberação cólon-específica de 5ASA, visando uma alternativa para o tratamento local de doenças intestinais inflamatórias. As NSMs contendo 5ASA (NSMs@5ASA) apresentaram diâmetro médio de $109\pm 4,80$ nm, índice de polidispersão de $0,2177\pm 0,003$, potencial zeta (PZ) de $-25\pm 0,781$ mV e forma esférica. A eficiência de encapsulação do 5ASA nas NSMs variou entre 85,52 e 93,19%. Ensaios de mucoadesão demonstraram que as NSMs@5ASA apresentaram capacidade mucoadesiva, evidenciado pela mudança nos valores de PZ em contato com a mucina. Os ensaios de viabilidade celular indicaram que as NSMs com e sem fármaco não foram tóxicas para células da linhagem Caco-2. As NSMs e NSMs@5ASA foram caracterizadas com sucesso por análise físico-química, as análises térmicas sugeriram melhora na estabilidade do fármaco incorporado no sistema. As MPs AR/P carregadas com NSMs@5ASA foram obtidas pelo método de reticulação iônica utilizando o Ca^{2+} . Os sistemas nano-em-micro apresentaram diâmetro na faixa de 1386 a 1565 μm e elevada circularidade. O formato esférico das micropartículas e a eficiência na incorporação das NSMs@5ASA confirmados. Os estudos de liberação *in vitro* do 5ASA revelaram que o sistema de encapsulamento nano-em-micro proporcionou um controle mais preciso das taxas de liberação do 5ASA, com uma redução significativa da liberação em meio estomacal. Esse resultado é especialmente promissor, pois sugere uma proteção eficaz do fármaco contra a degradação no estômago. Com base nesses dados, as micropartículas compostas de amido retrogradado e pectina mostram-se promissoras para direcionar as NSMs@5ASA ao cólon, quando administradas por via oral. Os resultados deste trabalho oferecem uma contribuição valiosa para o avanço no tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

Palavras-chave: micropartícula; nanopartículas de sílica mesoporosas; liberação cólon-específica; 5ASA; doenças inflamatórias intestinais.

Abstract

5-Aminosalicylic acid (5ASA) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug considered the first-line treatment for mild to moderate stages of inflammatory bowel disease. Very high doses of 5ASA are usually required due to rapid and nearly complete systemic absorption in the upper intestinal portion, making it difficult to achieve local drug levels in the inflamed colonic mucosa. In this work, oral delivery systems based on mesoporous silica nanoparticles (MSNs) loaded with 5ASA and incorporated into retrograded starch/pectin microparticles (AR/P MPs) were developed as a system for colon-specific delivery of 5ASA, aiming at an alternative for the local treatment of inflammatory bowel diseases. The NSMs containing 5ASA (NSMs@5ASA) presented an average diameter of 109 ± 4.80 nm, polydispersity index of 0.2177 ± 0.003 , zeta potential (PZ) of -25 ± 0.781 mV, and spherical shape. The encapsulation efficiency of 5ASA in NSMs ranged from 85.52 to 93.19%. Mucoadhesion assays demonstrated that NSMs@5ASA presented mucoadhesive capacity, evidenced by the change in PZ values in contact with mucin. Cell viability assays indicated that NSMs with and without the drug were not toxic to the Caco-2 cell line. NSMs and NSMs@5ASA were successfully characterized by physicochemical analysis, and thermal analysis suggested improved stability of the drug incorporated into the system. The AR/P MPs loaded with NSMs@5ASA were obtained by the ionic cross-linking method using Ca^{2+} . The nano-in-micro systems presented diameters ranging from 1386 to 1565 μm and high circularity. The spherical shape of the microparticles and the efficiency in the incorporation of NSMs@5ASA were confirmed. The in vitro release studies of 5ASA revealed that the nano-in-micro encapsulation system provided more precise control of the 5ASA release rates, with a significant reduction in the release in the stomach. This result is especially promising, as it suggests an effective protection of the drug against degradation in the stomach. Based on these data, the microparticles composed of retrograded starch and pectin shows promise for targeting NSMs@5ASA to the colon when administered orally. The results of this work offer a valuable contribution to the advancement of the treatment of inflammatory bowel diseases.

Keywords: microparticle; mesoporous silica nanoparticles; colon-specific release; 5ASA; inflammatory bowel diseases;

Lista de Abreviações

5ASA - Ácido 5-aminosalicílico, mesalazina

AIBA - Dihidrocloreto de 2,2' - Azobis

AR - Amido retrogradado

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DC - Doença de Crohn

DII's - Doenças intestinas inflamatórias

DLS - Espalhamento de luz dinâmico

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

MPs - Micropartículas

MPs AR/P - Micropartículas de Amido Retrogradado/Pectina

MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% - Micropartículas de Amido Retrogradado/Pectina encapsulando nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com 5ASA à 0,5% (m/v)

MPs AR/P_NSMs@5ASA1% - Micropartículas de Amido Retrogradado/Pectina encapsulando nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com 5ASA à 1% (m/v)

NSMs - Nanopartículas de sílica mesoporosas

NSMs@5ASA - Nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com 5ASA

NTA - Análise de Rastreamento de Nanopartículas

P - Pectina

RU - Retocolite ulcerativa

TEOS - Tetraetilortosilicato

TGA - Análise termogravimétrica

TGI - trato gastrintestinal

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do 5ASA.....	25
Figura 2 - Representação sistemática do mecanismo de ação do 5ASA.	26
Figura 3 - Espectros de infravermelho de NSMs e NSMs-CTAB diluídos em pellet KBr.....	50
Figura 4 - Espectros infravermelhos de 5ASA livre diluído em pellet KBr.....	51
Figura 5 - Espectros infravermelhos de NSMs e NSMs@5ASA diluídos em pellet KBr	52
Figura 6 – Curva de TGA da mesalazina pura (5ASA).....	53
Figura 7 - Curva de TGA das nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs)	54
Figura 8 - Curva de TGA das nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com 5ASA (NSMs@5ASA).....	54
Figura 9 – Curvas de DSC de 5ASA, NSMs e NSMs@5ASA	55
Figura 10 - Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução das NSM (A) e NSM@5ASA (B).....	57
Figura 11 - Influência da adição de dispersões de mucina, em diferentes concentrações (150, 250 e 500 µg.mL ⁻¹) no potencial zeta das NSMs@5ASA (média ± DP, n = 3).....	59
Figura 12 - Viabilidade celular (%) na linhagem Caco-2 expostos ao 5ASA livre, NSMs e NSM@5ASA.....	61
Figura 13 - Microscopia óptica dos grânulos de amido na fase previa ao processamento (A), após a gelatinização (B) e após a retrogradação (C).	63
Figura 14 - Imagens obtidas por estereoscópio das MPs AR/P (A), MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% (B) e MPs AR/P_NSMs@5ASA1% (C).	66
Figura 15 - Fotomicrografias representativa obtidas por MEV-FEG da superfície das micropartículas sem nanopartículas (A), micropartículas carregadas com NSM@5ASA0,5% (B) e NSM@5ASA1% (C).....	69
Figura 16 - Grau de intumescimento (%) das micropartículas de AR/P com e sem NSMs@5asa em HCl (pH 1.2) e tampão fosfato (pH 6.8).....	73
Figura 17 - Força máxima de mucoadesão (FMax) das micropartículas de AR/P.....	75
Figura 18 - Perfil de liberação in vitro do 5ASA livre e associada à NSMs e incorporadas em MPs de AR/P em meios com diferentes valores de pHs, mimetizando as fases gástrica (0–60 min; pH 1,2), duodenal (60–120 min; pH 4,5) e colônica (120–420 min; pH 6,8). Cada valor representa o desvio padrão médio, n = 3.	77
Figura 19 - Espectro de absorção do 5ASA em meio ácido.....	94
Figura 20 - Curva analítica do 5ASA obtido por espectrofotometria UV-Vis.....	95

Figura 21 - Especificidade do método determinada pela comparação dos espectros de 5ASA (linha vermelha), placebo (linha roxa) e produtos de degradação (linha azul).97

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Porcentagem de EE de 5ASA nas NSMs.	50
Tabela 2 - Diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta e moda das NSMs e NSMs@5ASA	56
Tabela 3 - Diâmetro, circularidade média e Índice Span das MPs (n=100).	64
Tabela 4 - Eficiência de encapsulação das NSMs@5ASA nas micropartículas.	67
Tabela 5 - Degradação enzimática das micropartículas de AR/P, AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%.	71
Tabela 6 - Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Primeira Ordem, Higuchi e Weibull) de liberação do fármaco 5ASA.	79
Tabela 7 - Dados da Curva analítica do 5ASA obtido por espectrofotometria UV-Vis.	95
Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade ou precisão intracorrida.	96
Tabela 9 - Exatidão entre as concentrações teóricas e experimentais de 5ASA	96
Tabela 10 – Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 5ASA.....	97

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII's).....	21
2.1.1. Aspectos epidemiológicos, sintomatologia e diagnóstico	21
2.1.2. Tratamento farmacológico.....	23
2.2. Mesalazina	24
2.2.1. Considerações fisiológicas para o tratamento das DII's.....	27
2.3. Nanosistemas para liberação de fármacos	29
2.3.1. Nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs)	29
2.4. Sistemas para liberação cólon-específica de fármacos.....	30
2.4.1. Micropartículas poliméricas	30
2.4.2. Amido resistente	31
2.4.3. Pectina	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Principais equipamentos	37
4.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis.....	37
4.2.1. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível.....	37
4.2.2. Validação do método analítico	38
4.2.2.1. Determinação do espectro de absorção do 5ASA na região do UV-Vis	38
4.2.2.2. Linearidade.....	38
4.2.2.3. Precisão	38
4.2.2.4. Exatidão.....	38
4.2.2.5. Limite de detecção e quantificação	39
4.2.2.6. Especificidade.....	39
4.3. Síntese de Nanopartículas de Sílica Mesoporosas (NSMs).....	39
4.3.1. Remoção do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	40
4.4. Preparo da NSMs carregadas com 5ASA (NSMs@5ASA)	40
4.5. Caracterização físico-química das NSMs e NSMs@5ASA	40
4.5.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.5.2. Análise termogravimétrica	41
4.5.3. Calorimetria exploratória diferencial	41
4.5.4. Eficiência de encapsulação das nanopartículas	41

4.5.5.	Diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	41
4.5.6.	Análise de rastreamento de nanopartículas	42
4.5.7.	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução	42
4.6.	Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)	43
4.6.1.	Retrogradação do amido em associação com pectina	43
4.6.2.	Obtenção das MPs pela técnica de reticulação iônica	43
4.6.3.	Preparação de micropartículas AR/P carregadas com NSMs@5ASA.....	44
4.6.4.	Eficiência de encapsulação (EE%) das micropartículas poliméricas	44
4.7.	Caracterização das micropartículas poliméricas (MPs)	44
4.7.1.	Avaliação do diâmetro, valor de span e circularidade.....	44
4.7.2.	Estudo da superfície das MPs.....	45
4.7.3.	Avaliação da degradação enzimática das MPs em meios gástrico e entérico simulados.....	45
4.7.4.	Avaliação da capacidade de absorção de líquidos.....	45
4.7.5.	Avaliação da mucoadesividade <i>in vitro</i> em texturômetro	46
4.7.6.	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5ASA.....	46
4.7.7.	Modelagem matemática da liberação <i>in vitro</i> da 5ASA.....	47
4.8.	Análise estatística	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1.	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis.....	49
5.2.	Caracterização de NSMs sem fármaco e NSMs carregadas com 5ASA.....	49
5.2.1.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e eficiência de encapsulação (EE%)	49
5.2.2.	Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)	52
5.2.3.	Diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	55
5.2.4.	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução	56
5.3.	Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)	62
5.3.1.	Retrogradação do amido em associação com pectina	62
5.3.2.	Obtenção e caracterização estrutural e morfológica das micropartículas de AR/P carregadas com NSMs@5ASA.....	64
5.3.3.	Avaliação da eficiência de encapsulação das NSMs@5ASA nas micropartículas de AR/P	67
5.3.4.	Estudo da superfície das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas	67
5.3.5.	Avaliação do comportamento de degradação enzimática das micropartículas de AR/P contendo NSMs@5ASA frente ao valor de pH e conteúdo enzimático	70
5.3.6.	Avaliação da capacidade de absorção de líquidos.....	71

5.3.7.	Avaliação da mucoadesividade <i>in vitro</i> em texturômetro	73
5.3.8.	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5ASA.....	76
5.3.9.	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco	78
6.	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICE A - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis	94

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII's) correspondem a um grupo de doenças recidivantes, de caráter crônico, idiopático e que podem afetar o trato gastrointestinal (TGI) em qualquer região da sua extensão. Inclui-se neste grupo duas formas clínicas definidas: a retocolite ulcerativa (RU) e a Doença de Crohn (DC) (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; FRANZOSA et al., 2019; MOURA et al., 2016; YOUNIS; ZARIF; MAHFOUZ, 2020). Estudos evidenciam que um percentual significativo de 30 até 40 % de pacientes acometidos com DII's tem envolvimento colônico (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

A RU é uma DII que acomete de forma contínua o reto e extensões proximais do cólon, cujas alterações inflamatórias superficiais atingem, restritivamente, a mucosa e submucosas colônicas, resultando em criptites e abscessos intestinais. Diferentemente da RU, a DC afeta, principalmente, o íleo e ceco; entretanto, pode acometer qualquer região do TGI, da boca ao ânus, manifestando estenose, abscessos e fistulas. Perda de peso, dor na região abdominal, diarreia crônica e fezes sanguinolentas sintomas são comuns na RU e DC (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

As farmacoterapias convencionais para DII's incluem a utilização de ácido 5-aminosalicílico (5ASA, mesalazina), corticosteróides, sulfassalazina, tiopurinas e metotrexato (MOURA et al., 2016; POPOVA et al., 2018).

O 5ASA é um anti-inflamatório não esteroide considerado o tratamento de primeira escolha para os estágios leves a moderados da doença e é considerado um fármaco seguro e eficaz (MOURA et al., 2016; NAKAGAWA et al., 2019; SHAHDADI SARDO et al., 2019). Apesar de sua eficácia, geralmente são necessárias doses muito altas de 5ASA para esse tratamento (JIANG et al., 2020; MOURA et al., 2016; SHAHDADI SARDO et al., 2019).

O 5ASA, em sua forma farmacêutica convencional (comprimido), é administrado por via oral, sofre absorção sistêmica rápida e quase completa na porção intestinal superior (SHAHDADI SARDO et al., 2019). Há ainda outras formas farmacêuticas disponíveis no mercado, como enemas e supositórios, as quais são menos aceitáveis, o que pode ocasionar a não adesão do paciente ao tratamento (JIANG et al., 2020; NAKAGAWA et al., 2019; PALMA et al., 2019; SEHGAL et al., 2018).

Logo, o desafio no tratamento com 5ASA, administrado por via oral, está em alcançar os níveis locais do fármaco na mucosa colônica inflamada, evitando a manifestação de alguns efeitos colaterais e baixa eficácia no tratamento das DII's (JIANG et al., 2020; NAKAGAWA et al., 2019; PALMA et al., 2019; SEHGAL et al., 2018).

A utilização de partículas em nanoescala parece ser uma estratégia tecnológica aceitável visando alcançar o acúmulo desses sistemas nas regiões inflamadas, o que juntamente com o

tamanho reduzido e elevada área superficial, deve promover a interação com tecidos biológicos. Dentro deste cenário, as nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs) se destacam como nanoreservatórios inorgânicos, robustos, atóxicos, estáveis estruturalmente e quimicamente. Estes nanoreservatórios com diâmetro médio entre 2-50 nm, são chamados de mesoporos, de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (SÁBIO et al., 2019). Neste sentido, variando parâmetros de síntese é possível obter NSMs com propriedades ajustáveis como formato e tamanho de partículas, área superficial, diâmetro e volume de poros, possibilitando a incorporação de grandes quantidades de fármacos sem alterar suas propriedades farmacológicas, o que pode ser interessante, no caso do 5ASA (KAASALAINEN et al., 2017; MÖLLER; BEIN, 2017; VALLET-REGÍ et al., 2018; WATERMANN; BRIEGER, 2017; ZHOU et al., 2018).

Contudo, as NSMs sozinhas são desprovidas de mecanismos de controle níveis de liberação nas regiões superiores do TGI, o que permitiria a liberação prematura do 5ASA antes que o sistema alcance o alvo terapêutico, seguido pela sua metabolização no metabólico inativo ácido N-acetil-5-aminosalicílico. Sendo assim, a utilização de micropartículas constituídas por biopolímeros responsivos parece uma estratégia promissora para vetorização das NSMs para o cólon (MENEGUIN, 2016).

Micropartículas poliméricas podem ser definidas como partículas em escala micrométrica formadas por um ou mais polímeros que, conforme a distribuição do fármaco no interior das partículas, podem ser categorizadas como microcápsulas e microesferas (COUVREUR; PUISIEUX, 1993). Microcápsulas são microreservatórios em que os polímeros se encontram como revestimento do fármaco e composição da membrana da cápsula, enquanto as microesferas consistem em sistemas matriciais nos quais os fármacos estão uniformemente distribuídos (MENEGUIN, 2016; SILVA et al., 2003).

Um importante exemplo de biopolímero amplamente utilizado na área farmacêutica como excipiente é o amido, um polímero semicristalino cujos grânulos contém em sua composição cadeias de amilose (fração linear e amorfa) e amilopectina (fração ramificada e cristalina). Apesar de ser um produto atrativo em termos de biocompatibilidade e baixo custo, apresenta elevada hidrofília o que inviabiliza sua utilização "*in natura*" na produção de sistemas modernos de liberação de fármacos (JEONG; SHIN, 2018; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014), requerendo sua modificação através de processos físicos, químicos ou enzimáticos.

A retrogradação é um processo hidrotérmico de modificação do amido que envolve dois estágios: a gelatinização e a retrogradação propriamente dita. Na gelatinização, o amido é

aquecido em excesso de água, promovendo o intumescimento dos grânulos e o rompimento de sua estrutura. Na retrogradação, ocorre a lenta recristalização dos componentes do amido durante as etapas de resfriamento e armazenamento. Esse processo envolve a formação de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals inter e intramoleculares, buscando uma forma metaestável de menor energia livre (APARICIO-SAGUILÁN et al., 2007; DONA et al., 2010; ZHANG; JIN, 2011).

Dentre os diferentes tipos de amido, a alta amilose (alto teor de amilose (70%)) é considerada a fonte ideal para obtenção de AR, também definido como amido resistente tipo 3 (AR3), já que se estabelece uma conformação amorfa em que moléculas de AR ficam imersos e protegidos da degradação (MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014). O AR3 tem despertado interesse no âmbito farmacêutico, pois possui baixa solubilidade aquosa, elevada estabilidade térmica, além da capacidade de superar a atividade enzimática nas porções superiores do TGI, sendo biodegradado pela microbiota colônica, representando um mecanismo fundamental para a liberação cólon-específica de fármacos (JEONG; SHIN, 2018; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; QIN et al., 2020; QUADRADO; FAJARDO, 2020).

A presença de diferentes polissacarídeos durante o processo de retrogradação é responsável por alterar o rendimento de AR. A utilização de pectina demonstra otimizar o processo obtendo alto teor (até 96,68%) de AR (Bagliotti Meneguín; Stringhetti Ferreira Cury; Evangelista, 2014a). Além disso, a associação desses polímeros permite o processo de reticulação pela presença dos grupamentos carboxílicos através de ligações cruzadas na presença de íons multivalentes (reticulantes), microencapsulando as NSMs e otimizando a liberação colônica devido ao comportamento pH-responsivo adicional da pectina (CARBINATTO et al., 2012; SOARES et al., 2013).

Os sistemas de liberação cólon-específica têm demonstrado evidências promissoras para o tratamento local das DII's e, juntamente com o desenvolvimento direcionado para tecnologias baseadas em micro e nanossistemas e suas possibilidades de modificações, este trabalho propõe o desenvolvimento de sistemas híbridos orgânico-inorgânicos baseados na microencapsulação com AR/P de NSMs incorporadas com 5ASA, visando aprimorar a ação farmacológica do 5ASA, através de sua proteção, liberação específica e consequente aumento de disponibilidade no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; GÜNTHER et al., 2018; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; PALMA et al., 2019; POPOVA et al., 2018; SHAHDADI SARDO et al., 2019).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII's)

2.1.1. Aspectos epidemiológicos, sintomatologia e diagnóstico

A incidência e prevalência das DII's têm se mantido estáveis e altas em países desenvolvidos como Estados Unidos da América e países Europeus; entretanto, a incidência de tais doenças vem crescendo em países em desenvolvimento na América do Sul, Ásia e África, como o Brasil e a China, por exemplo. Essa mudança do perfil das DII's está ligada à urbanização dos países que expõem a população a diferentes fatores, tais como poluentes, mudança de estilo de vida e alteração na alimentação para uma dieta mais ocidentalizada que, por consequência, altera o microbiota e a imunidade intestinal (DU; HA, 2020; TORRES et al., 2017).

Uma revisão sistemática de 2019 destacou estudos desenvolvidos em países da América do Sul. Os dados analisados indicaram uma prevalência de DII's variando de 15,0 a 24,1/100.000 habitantes para CU e 2,4 a 14,1/100.000 habitantes para DC. Também foi possível constatar um aumento significativo na incidência e prevalência de DII's nos últimos 21 anos no que diz respeito ao Brasil (SELVARATNAM et al., 2019).

No Brasil, os dados governamentais de incidência e prevalência na população são insuficientes devido às DII's não se classificarem como doenças de notificação compulsória. Apesar disso, um estudo de 2024 analisou o panorama epidemiológico de internações por DII's no Brasil, indicando entre 2018 a 2022 foram contabilizados 24.982 internações (4.996,4 por ano), sendo o ano de 2022 com maior número de internações com 5643 registros (ROCHA et al., 2024).

Os sintomas clínicos característicos das DII's são dor abdominal, diarreia frequente, perda de peso, anemia e, consequentemente, desnutrição, em função do déficit na absorção de nutrientes (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019). Outros sinais extras gastrointestinais podem surgir e são classificados em duas categorias: as manifestações imunológicas relacionadas às DII's, como artrite, pioderma gangrenoso e inflamação na íris ocular; e as doenças autoimunes não relacionadas com as DII's, como espondilite anquilosante e pancreatite (LEMMENS et al., 2013; SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017).

A DC é uma doença crônica incurável que pode se desenvolver em três estágios, de acordo com o quadro clínico da doença: leve a moderada, moderada a grave e crônica grave. Na fase leve a moderada, não há obstrução intestinal ou perda de peso; entretanto, com o agravamento das lesões inflamatórias as manifestações progridem para moderado a grave, a

qual inclui febre, dores abdominais e evacuações dolorosas e frequentes. Na fase crônica da DC, os sintomas incluem vômitos persistentes, intensificação das dores abdominais, obstrução intestinal e caquexia (FLYNN; EISENSTEIN, 2019; GISBERT et al., 2002; SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019; YOUNIS; ZARIF; MAHFOUZ, 2020).

A inflamação causada pela DC pode afetar toda a parede do sistema digestório de modo recorrente (fase aguda/ativa) e remitante com predominância nas regiões inferiores do TGI, como íleo terminal, cólon e perianal. As lesões inflamatórias na DC são classificadas como segmentares, assimétricas e transmutáveis, as quais progridem para abscessos e fístulas quando não há resposta terapêutica. Por outro lado, na RU, a resposta inflamatória é limitada à mucosa do cólon e reto com lesões contínuas e difusas que induzem evacuações com exsudato mucopurulento, e, hematoquezia, sintoma clínico persistente na RU (LEMMENS et al., 2013). Em casos de proctite e inflamação na mucosa do reto e ânus, a urgência e sensação de evacuação incompleta são sintomas predominantes na RU (UNGARO et al., 2017).

A RU também é caracterizada com uma doença crônica recorrente; entretanto, os períodos de remissão tendem a ser mais longos. A evolução da doença pode ser dividida em três etapas: leve, quando há menos de três evacuações diárias sem impacto sistêmico significativo; moderada, com mais de quatro evacuações por dia e impacto sistêmico mínimo; e grave, quando ocorrem mais de seis evacuações diárias sanguinolentas com comprometimento sistêmico, o qual pode causar febre, taquicardia, anemia e megacólon tóxico em casos extremos (BERENDS et al., 2019; NIDHI et al., 2016; UNGARO et al., 2017; VINDIGNI et al., 2016).

O diagnóstico das DII's é dado a partir da sintomatologia, testes laboratoriais, biopsias e exames de imagem como colonoscopia e endoscopia. Tais métodos são realizados para a exclusão de outras doenças do TGI que podem ter sintomas parecidos como infecções, doença celíaca e doença diverticular (SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017). Os biomarcadores fecais, principalmente calprotectina fecal, são utilizados para diagnósticos de DII's devido à concentração aumentada da proteína ocasionada pelo infiltrado de neutrófilos na inflamação intestinal (TORRES et al., 2017). Para diagnosticar com exatidão as DII's, exames laboratoriais podem ser solicitados, como deficiência de vitaminas e deficiência de ferro para DC e RU, respectivamente, além do diagnóstico utilizando equipamentos de imagem. Por outro lado, em casos mais avançados das DII's, a diferenciação entre RU, DC e outros tipos de infecções intestinais torna-se comprometida (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019).

2.1.2. Tratamento farmacológico

O tratamento das DII's é baseado no estágio em que a doença se encontra e na resposta ao tratamento pelo paciente, ponderando os efeitos adversos trazidos pela terapia medicamentosa. O manejo das DII's foca em induzir e manter a remissão da inflamação com o intuito de evitar a incapacidade intestinal, câncer, colectomia e demais danos ao TGI (TORRES et al., 2017; UNGARO et al., 2017).

Os aminossalicilatos foram a primeira classe de fármacos a serem utilizados para o tratamento das DII's em casos leves a moderados, mais precisamente a sulfassalazina, que contém a molécula 5ASA responsável pelo efeito terapêutico. Entretanto, os efeitos adversos associados à presença do transportador sulfapiridina como náuseas e vômitos tornaram a terapia com sulfassalazina pouco eficaz a respeito do aumento da qualidade de vida dos pacientes (SEYEDIAN; NOKHOSTIN; MALAMIR, 2019; UNGARO et al., 2017).

Em estágios moderados da DC, a prescrição de esteroides como budesonida e prednisona são indicados para induzir a remissão da doença, embora não sejam suficientes para manter a remissão e estão associados a causar dependência nos pacientes. O uso de azatioprina, tiopurina e metotrexato tem sido uma opção em casos moderados a graves na DC, devido aos imunossupressores mostrarem eficácia tanto na redução quanto na manutenção da remissão da inflamação (BERENDS et al., 2019; CAPRILLI et al., 2009; COTTONE et al., 2011; TORRES et al., 2017). Entretanto, o uso frequente dos fármacos supracitados está ligado ao aumento do risco de neoplasias malignas (TORRES et al., 2017). Em casos de falha na resposta do tratamento utilizando esteroides e imunossupressores, fármacos como adalimumabe e infliximabe, indutores de anticorpos antifator de necrose tumoral (anti-TNF), são utilizados para induzir e manter a remissão na DC. Porém, sabe-se que o uso de anti-TNF, principalmente quando não associado à imunossupressores, aumenta o risco de infecções oportunistas (TORRES et al., 2017).

Como supracitado, a primeira alternativa de fármaco para tratar a RU em estágios leves a moderados são aminossalicilatos, como a mesalazina por via oral e retal (supositórios e enemas) a depender da localização da inflamação na mucosa intestinal. Combinações entre comprimidos e enemas de 5ASA mostraram-se mais eficaz em colite do lado esquerdo do que quando utilizados separadamente (UNGARO et al., 2017). Além disso, a utilização de supositórios de mesalazina para tratamento de proctite mostra resposta positiva na indução e manutenção da remissão da RU. Para terapias sem resposta ao uso isolado de aminossalicilatos, a introdução de corticoesteroides, como prednisona, é indicada para complementar a indução

da remissão na proctite e na colite do lado esquerdo. Todavia, essa classe de fármacos não é indicada para manter a remissão devido à não mostrar eficácia a longo prazo e a complicados efeitos adversos (UNGARO et al., 2017).

Em estágios moderados a graves da RU, quando pacientes adquirem resistência a esteroides ou a terapia mais branda não obtém resultado satisfatório, iniciar o tratamento com imunossupressores, como azatioprina, é indicado para manter a remissão. Além disso, em caso de colite grave e internação hospitalar, administrar infliximabe em associação a imunossupressores pode ajudar a induzir a remissão da inflamação (BERENDS et al., 2019; CAPRILLI et al., 2009; COTTONE et al., 2011; TORRES et al., 2017).

Novos fármacos têm sido desenvolvidos e podem ser administrados no tratamento das DII's quando aminossalicilatos, imunossupressores e anticorpos monoclonais anti-TNF não se aplicam como terapia adequada, causada por falha ou intolerância medicamentosa. O vedolizumabe, anticorpo monoclonal capaz de bloquear a integrina A4B7 e induzir resposta inflamatória seletiva no intestino, é uma alternativa para induzir e manter a remissão para DC e RU em estágios moderados a graves (TORRES et al., 2017).

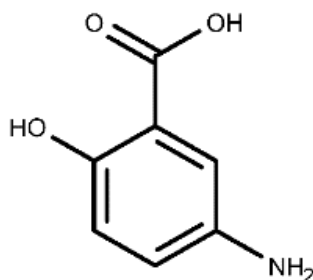
Em casos graves, a necessidade de cirurgia é avaliada para promover melhora do quadro clínico de pacientes. Drenagens cirúrgicas são realizadas em pacientes com DC quando as lesões no TGI formam abscesso ou infeccionam, e, após o procedimento, acompanhamentos endoscópios periódicos e administração com azatioprina é indicada para evitar complicações a longo prazo. Com a evolução da RU para comprometimento sistêmico no qual a terapia medicamentosa não responde, a colectomia é uma alternativa utilizada para controlar a piora do quadro. Procedimentos como ileostomia e reconstrução do colón são realizados a fim de normalizar o trânsito intestinal, podendo ou não terem a introdução da bolsa ileal (UNGARO et al., 2017).

2.2. Mesalazina

De acordo com a terminologia IUPAC (do inglês, *International Union Of Pure And Applied Chemistry*) a nomenclatura da mesalazina é 5-amino-2-hidroxibenzoico. O fármaco possui massa molecular de 153,14 g/mol distribuídos em sua estrutura molecular composta de um anel benzoico ligado a uma hidroxila e um grupamento amina, **Figura 1**. A mesalazina encontra-se em forma de cristais brancos a rosados ou pó castanhos arroxeados insolúveis em

etanol e praticamente insolúvel em água (0,84 g/ L a 20 °C) (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021).

Figura 1 - Estrutura química do 5ASA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A administração por via oral da mesalazina de forma isolada acarreta a rápida absorção da molécula em sua maior totalidade no estômago e no intestino delgado (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021). Assim que absorvida, a mesalazina pode ser transportada para outros tecidos e exercer sua ação farmacológica ou pode ser acetilada pela N-acetiltransferase (NAT) formando o composto inativo N-acetil-5-aminosalicílico (N-acetil-5ASA) que é excretado na urina e nas fezes (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021).

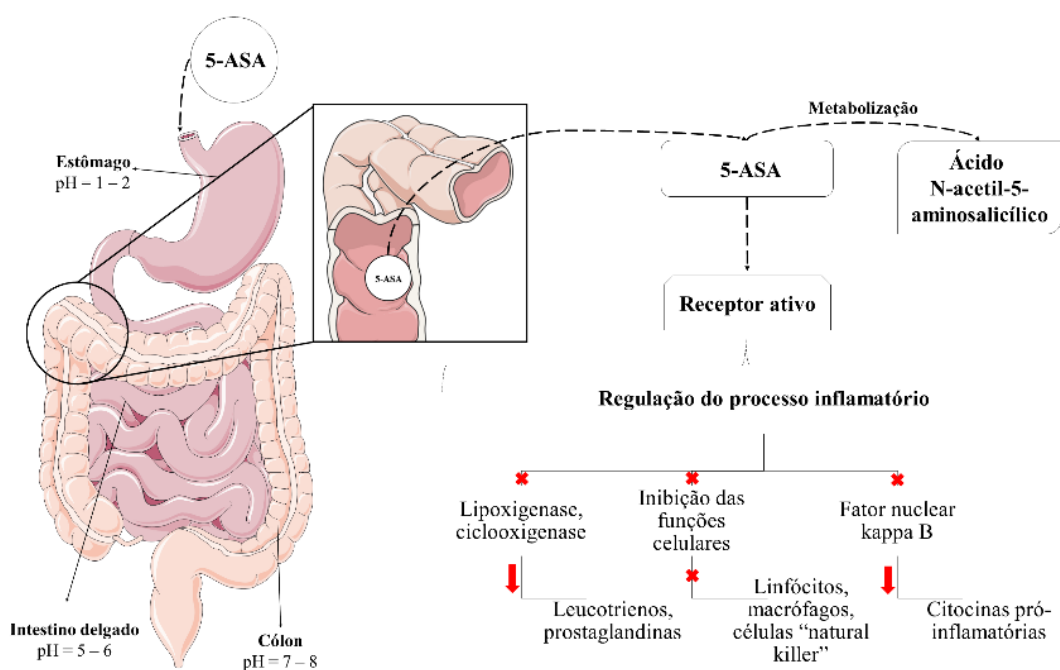
O 5ASA possui alta afinidade com proteínas plasmáticas, atingindo o pico de concentração plasmática de 3,48 horas. A meia-vida do fármaco pode variar de 1,4 a 6 horas dependendo da via a administração, enquanto a do seu metabólito varia de 5 a 10 horas com pico de concentração plasmática de 3,78 horas (TAVARES JUNIOR et al., 2020).

Em amostras biológicas, a mesalazina à 20 °C e em pH ácido apresenta instabilidade, ao contrário de seu metabólito N-acetil-5ASA que permanece estável nas mesmas condições. Além disso, sabe-se que a mesalazina sofre degradação em ambientes oxidativos e pode apresentar comportamento de auto-oxidação (TAVARES JUNIOR et al., 2020).

Numerosos estudos classificam o mecanismo de ação do 5ASA como parcialmente definido. Acredita-se que o fármaco tem ação anti-inflamatória predominantemente local na mucosa intestinal, por inibição da lipo-oxigenase e ciclo-oxigenase, consequentemente a produção de leucotrienos e prostaglandinas é reduzida. Também é relatado que o fármaco atua como eliminador de radicais livres, moléculas em evidência em pacientes com DII. Outros mecanismos foram relatados, relacionando a inibição da produção de citocinas inflamatórias como efeito do 5ASA, uma vez que o fármaco tem a capacidade de interferir na ação do fator

nuclear kappa β , responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias, além de inibir as funções celulares de linfócitos, macrófagos e células “*natural killer*”, células presentes no processo de inflamação, obtendo a capacidade de remover espécies reativas de oxigênio, conforme se observa na **Figura 2** (BERENDS et al., 2019; CAMPREGHER; GASCHÉ, 2011; CAPRILLI et al., 2009).

Figura 2 - Representação sistemática do mecanismo de ação do 5ASA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um dos principais desafios da utilização da mesalazina é a alta absorção da molécula anteriormente ao local da inflamação. Ao ser administrada por via oral, somente 20% do fármaco atinge as porções do colón e íleo, reduzindo o efeito terapêutico no local da inflamação (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021).

Além disso, em razão do fármaco ser metabolizado pela NAT, as baixas doses de 5ASA são insuficientes para induzir e manter a remissão da doença. Assim, altas doses são administradas a fim de promover a saturação da enzima NAT, resultando numa maior concentração de 5ASA, a fim de aumentar o efeito farmacológico no organismo (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021). Outros fatores são a meia-vida curta do 5ASA e a dosagem das formulações em sua maioria serem baixas, os quais obrigam os pacientes a administrarem o medicamento várias vezes ao longo do dia, afetando a adesão ao tratamento (TINDALL, 2009).

Vale ressaltar que alguns pacientes com inflamação acentuada podem apresentar rápido trânsito intestinal e alteração do pH do colón, os quais dificultam a terapia com comprimidos revestidos com excipientes dependente de pH, como Eudragit® S 100 (VELOSO; MACHADO; NOBRE, 2021).

A partir disso, faz-se necessário estudar novos sistemas de liberação de 5ASA para otimizar o tratamento de DII's, visto que as formas convencionais estão sujeitas a falha terapêutica.

2.2.1. Considerações fisiológicas para o tratamento das DII's

Os fármacos administrados oralmente para o tratamento da DII precisam superar diferentes barreiras impostas pelo TGI para chegar ao local de ação (DOS SANTOS et al., 2021a; HUA, 2020).

O tempo de trânsito no TGI é um fator-chave importante para se estabelecer novas estratégias para direcionamento específico no cólon de sistemas orais de administração de fármacos. A redução do tempo de trânsito afeta as propriedades de retenção/eliminação da molécula ativa. O tempo de trânsito de uma forma farmacêutica varia em cada região do TGI, mudando de acordo com o perfil fisiológico de cada indivíduo. No estômago, sofre influência, por exemplo, da ingestão alimentar, podendo chegar até 6 horas quando alimentado e variando de 0 a 2 horas vazio. Quanto ao intestino delgado, costuma variar de 3 a 4 horas, podendo apresentar variação individual de 2 a 6 horas em organismos saudáveis. A região colônica apresenta maior variabilidade, durando de 6 a 70 horas. Fatores patológicos também podem alterar o tempo de trânsito, por exemplo, pacientes com muitos episódios de diarreia têm tempo de trânsito reduzido no TGI devido ao movimento peristáltico acelerado, como os pacientes com CU ativa que têm tempo de trânsito colônico mais rápido (Santos *et al.*, 2021; Hua, 2020)

Outro importante fator é o pH ao longo do TGI. Explorar essa propriedade é uma estratégia amplamente aplicada em sistemas que utilizam polímeros solúveis em pH neutro e insolúveis em pH ácido, sendo capazes de impedir a liberação do fármaco na região do estômago e intestino delgado proximal e direcionar para a região colônica. O estômago apresenta um ambiente altamente ácido quando não há ingestão de alimentos (pH 1,5-2). Dependendo da região do intestino delgado, o pH pode variar de 6 (duodeno) a 7,4 (íleo). Uma alteração semelhante no pH é observada no intestino grosso, começando em 6 (ceco) e chegando a 6,7 (reto). Assim como acontece com o trânsito intestinal, a faixa de pH no TGI pode ser alterada por aspectos fisiológicos, como a ingestão alimentar, que pode variar o pH do

estômago de 3 a 6. Ressalta-se que o pH do TGI está interligado ao estado de ionização das moléculas do fármaco e, conseqüentemente, com a sua absorção (Santos *et al.*, 2021; Hua, 2020).

O muco do TGI é uma secreção contínua responsável por lubrificar e proteger o epitélio gastrointestinal, composto principalmente por água e mucina revestida por proteoglicanos. O cólon e o estômago possuem a camada de muco mais espessas do TGI, que é dividida em uma camada luminal frouxa e uma camada basal firmemente aderente. No estômago, o muco pode proteger o tecido do ácido gástrico, enquanto no cólon tem a função de estabilizar o ambiente da microflora residente. Em relação aos sistemas de liberação oral de fármacos, a barreira mucosa dificulta a absorção/penetração dessas moléculas através do epitélio intestinal, reduzindo o tempo de permanência na região e limitando sua eficácia terapêutica (Santos *et al.*, 2021; Hua, 2020).

Fármacos e formas farmacêuticas podem ser degradados em qualquer região do TGI por meio de enzimas da saliva, suco gástrico e suco intestinal. As enzimas do estômago e do intestino delgado são essenciais na digestão dos alimentos e no metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos. Essas substâncias sensibilizam determinados fármacos e formas farmacêuticas, comprometendo a estabilidade, mas também podem ser vantajosas quando utilizadas como estratégia para liberação específica de fármacos no TGI, como sistemas pró-fármacos que se beneficiam de enzimas colônicas como mecanismo de conversão de moléculas inativas em moléculas farmacologicamente ativas e visando o cólon (Santos *et al.*, 2021; Hua, 2020).

Assim como as enzimas, o microbioma do TGI também atua no processo de digestão das gorduras, proteínas e carboidratos. É um ambiente com cerca de 500 espécies bacterianas diferentes que residem principalmente no cólon, em uma densidade de 10^{11} UFC/mL de conteúdo colônico. O efeito deste microbioma na absorção de fármacos e formas farmacêuticas não foi totalmente elucidado, mas novos estudos destacam que a alta atividade enzimática bacteriana no cólon pode ser utilizada como estratégia para a liberação colônica de fármacos incorporados em sistemas baseados em substâncias naturais, como polissacarídeos (goma guar, amido, pectina etc.). Estes sistemas são vantajosos por terem a capacidade de se degradarem exclusivamente na presença de bactérias anaeróbicas no cólon (Santos *et al.*, 2021; Hua, 2020).

2.3. Nanosistemas para liberação de fármacos

2.3.1. Nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs)

As nanopartículas inorgânicas projetadas para sistemas de liberação de fármacos podem variar em composição química, forma e estrutura, e podem transportar moléculas bioativas de duas maneiras: através de ancoragem superficial ou imobilização no interior quando possuem poros estruturais. Um exemplo notável são as nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs), que se destacam por sua alta capacidade de carga e versatilidade na liberação de diversos tipos de fármacos, desde pequenas moléculas até grandes macromoléculas (IRANPOUR et al., 2021; MÖLLER; BEIN, 2017; MORITZ; GESZKE-MORITZ, 2022; THANANUKUL et al., 2021; VALLET-REGÍ et al., 2018).

NSMs geralmente são produzidos por meio de modificações do método sol-gel, o que proporciona um controle preciso sobre suas características químicas, físicas e estruturais. O processo começa com a reação de hidrólise ácida ou básica de um precursor de fonte de sílica, que ocorre em torno de moldes estruturais formados por tensoativos ou moléculas poliméricas. Por fim, é necessário remover o molde para obtenção de uma estrutura porosa (JABARIYAN; ZANJANCHI, 2012; KAASALAINEN et al., 2017; MEHMOOD et al., 2019).

O estudo pioneiro que desenvolveu e avaliou a sílica mesoporosa em escala nanométrica como sistema de liberação de fármacos foi publicado em 2001, quando o fármaco ibuprofeno foi carregado na sílica MCM-41, resultando em efeitos de liberação prolongada. Desde então, fármacos anti-inflamatórios, antibióticos, antitumorais, e ácidos nucleicos foram carregados em sílica mesoporosa e tiveram seus perfis de liberação investigados sob diversas condições (AMIRY; SAZEGAR; MAHMOUDI, 2022; HU et al., 2016; IRANPOUR et al., 2021; KUANG et al., 2021; MANZANO; VALLET-REGÍ, 2010; POPOVA et al., 2014, 2018; REHMAN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2022; SLOWING et al., 2008; SON; LEE, 2021; TRENDAFILOVA et al., 2016; WATERMANN; BRIEGER, 2017). A capacidade de controlar o tamanho, a forma, o volume dos poros e a química da superfície dos NSMs oferece a oportunidade de adaptar os materiais às necessidades de diferentes aplicações biomédicas.

Uma extensa rede de poros bem estruturados e com diâmetros ajustáveis na síntese de NSMs possibilita a incorporação de grandes quantidades de fármacos nessas matrizes. Além disso, é atrativo que esses materiais possam ser quimicamente alterados para torná-los multifuncionais para uso tanto no diagnóstico quanto no tratamento de doenças. Pesquisas concentram-se em melhorar as propriedades de liberação de fármacos a partir de NSMs, com o

objetivo de melhorar a eficiência terapêutica e reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos. Uma abordagem promissora envolve a microencapsulação ou revestimento da superfície da sílica mesoporosa com moléculas que podem direcionar a entrega do fármaco a tecidos específicos ou células-alvo, aumentando a seletividade do tratamento (IRANPOUR et al., 2021; MAMAEVA; SAHLGREN; LINDÉN, 2013; MORITZ; GESZKE-MORITZ, 2022; THANANUKUL et al., 2021; WANG et al., 2021).

2.4. Sistemas para liberação cólon-específica de fármacos

2.4.1. Micropartículas poliméricas

Micropartícula é a denominação dada para partículas com tamanho em escala micrométrica, podendo classificá-las em dois grupos: microcápsulas e microesferas. As microcápsulas são micropartículas as quais há a presença de um invólucro polimérico envolto de um ou mais núcleos as substâncias são armazenadas, enquanto as microesferas são estruturas em que as substâncias estão dispersas de forma homogênea ou heterogênea na matriz polimérica (KÁLLAI-SZABÓ et al., 2024; LENGYEL et al., 2019).

O processo de microencapsulamento vem sendo aplicado na indústria farmacêutica como alternativa ao mascaramento de sabores e odores, redução do desconforto gástrico exercido por algumas classes de fármacos, proteção a fatores extrínsecos (ex., luz, umidade, temperatura) e modulação da liberação de fármacos (KÁLLAI-SZABÓ et al., 2024; LENGYEL et al., 2019).

Sabe-se que a via de administração oral é a mais utilizada devido a facilidade de administração e melhor adesão ao tratamento pelos pacientes. Entretanto, essa via apresenta desafios fisiológicos como a diferença de pH nas porções do TGI, presença de microbiota e enzimas digestivas, bem como absorção precoce de fármacos que se beneficiam da liberação colón-específica (BONI et al., 2021).

Frente a isso, novos sistemas de liberação vêm sendo estudados para criar estratégias a fim de potencializar tanto a ação local como sistêmica, melhorando as características físico-químicas e biológicas de fármacos (BONI et al., 2021).

A utilização de biopolímeros como AR e pectina para modular a liberação de fármacos no TGI mostra-se uma alternativa favorável visto que os compostos são atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis (MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; SOARES et al., 2013). Um exemplo de estudo desenvolvido são os

revestimentos contendo dupla camada, sendo a interna alcalina e a externa composta de Phloral™, associação de amido resistente e Eudragit®, sendo o último um polímero pH-dependente. O polissacarídeo funciona através de um mecanismo de segurança contra falhas (*fail-safe*), possibilitando a dissolução do revestimento ao sofrer degradação enzimática pelas bactérias do cólon, quando o pH adequado para a dissolução do Eudragit® não é atingido, devido à presença de patologias como a RU, por exemplo (VARUM et al., 2020).

A utilização de micropartículas poliméricas (MPs) como sistema de liberação colón-específico é uma alternativa interessante a ser aplicada visto que proporciona proteção enzimática, redução de absorção pelo TGI superior, administração de baixas dosagens e liberação local de fármacos no intestino grosso. Além disso, o uso de polímeros como AR e pectina para o desenvolvimento de MPs obtém vantagem de ser material natural, biocompatível e biodegradável, reduzindo as chances de incompatibilidade com o organismo (Agüero *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2021; Kállai-Szabó *et al.*, 2024; Lengyel *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2020).

2.4.2. Amido resistente

O amido é caracterizado como um carboidrato composto por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. Está presente nos tecidos vegetais, principalmente em tubérculos, em forma de grânulos e é a principal fonte de energia dos humanos e animais.

A amilose tem uma massa molar que varia entre 105 e 106 Da e um grau de polimerização em torno de 6000. Suas cadeias são essencialmente lineares e pouco ramificadas, formadas por unidades de glicose ligadas por conexões glicosídicas α -D-(1-4). Em contraste, a amilopectina apresenta uma estrutura muito mais ramificada, sendo composta por ligações glicosídicas α -D-(1,4) e α -D-(1,6), com uma massa molar entre 107 a 109 Da e um grau de polimerização de cerca de 2 milhões (BERTOFT, 2017; ESPINOSA-SOLIS et al., 2021; JACOBASCH et al., 2006).

Em sua forma nativa, o amido é hidrofílico e pode sofrer degradação enzimática pela ação de enzimas pancreáticas e da pepsina. Dessa forma, modificações em sua estrutura são necessárias para promover melhorias nas características físico-químicas e suscetibilidade enzimática (GOVINDARAJU et al., 2021; SINTOV; YARIV, 2022; ULBRICH; SCHOLZ; FLÖTER, 2022).

O AR-3 pode ser produzido por meio de um tratamento hidrotérmico, que consiste em ciclos de aquecimento e resfriamento das dispersões. Durante a etapa de gelatinização, a amilose é liberada dos grânulos de amido que estão intumescidos, enquanto a amilopectina

permanece predominantemente no interior desses grânulos. O rompimento das estruturas amorfas e cristalinas, facilita a interação e absorção de água, que age como um agente plastificante. Sob essas condições, a dispersão resultante é caracterizada por estrutura mais flexível e predominantemente amorfa. Quando o amido gelatinizado é armazenado a temperaturas mais baixas (4 °C), as cadeias de amilose e amilopectina podem rearranjar-se gradualmente, formando uma estrutura cristalina mais compacta e resistente. Essa reorganização, que ocorre de forma inter e intra-molecular, é estabilizada por interações supramoleculares, resultando em uma estrutura termodinamicamente mais estável. Esse processo promove a sinerese, levando ao aumento da viscosidade e à formação de um gel mais elástico e resistente à deformação (ARP; CORREA; FERRERO, 2020; CHUNG; LIM; LIM, 2006; LABELLE et al., 2023; LEE; HWANG, 2023; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; QIN et al., 2020).

Uma forma interessante para melhorar a obtenção de AR é utilizando amido com alto teor de amilose, visto que o material quando retrogradado é capaz de formar uma matriz amorfa em que uma formação cristalina está embutida, diminuindo a exposição às enzimas digestivas. Atualmente, o AR vem sendo alvo de estudos devido suas características funcionais e alto potencial de aplicabilidade tecnológica em produtos alimentares e farmacêuticos (BERTOFT, 2017; ESPINOSA-SOLIS et al., 2021; LABELLE et al., 2023; LEE; HWANG, 2023).

2.4.3. Pectina

A pectina (P) é um polissacarídeo que exerce papel fundamental na estrutura das paredes celulares dos vegetais, composta majoritariamente de homogalacturonano (MOHNEN, 2008).

A pectina tem a capacidade de agregar-se em ambientes ácidos, dissolver-se em pH neutro a alcalino e mostrar-se resistente em presença de proteases e amilases. Além disso, outra característica do polissacarídeo é a sua degradação ocasionada pelas bactérias do intestino grosso. Entretanto, a pectina pode apresentar elevada solubilidade em meio aquoso, característica desfavorável em relação a liberação de fármacos (MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; SOARES et al., 2013).

Por apresentar propriedades gelificantes e estabilizantes, a pectina é utilizada em diversos setores industriais, tal como o farmacêutico. A biodegradabilidade do polímero possibilita sua aplicação em materiais para implantação biomédica e transporte de fármacos (MOHNEN, 2008).

Devido a sua resistência enzimática e degradação bacteriana, o polissacarídeo vem sendo objeto de estudo para síntese de materiais com liberação colón-específica tanto como revestimento quanto formando matriz polimérica (MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; SOARES et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas híbridos orgânico-inorgânicos inteligentes baseados na microencapsulação com AR/P de NSMs incorporadas com 5ASA, visando aprimorar a ação farmacológica do 5ASA, através de sua proteção, liberação específica

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar as NSMs;
- Incorporar o fármaco 5ASA nas NSMs (NSMs@5ASA);
- Microencapsular as NSMs@5ASA;
- Realizar a caracterização físico-química dos sistemas;
- Avaliar as propriedades de mucoadesão dos sistemas;
- Avaliar a segurança dos sistemas frente a linhagem celular Caco-2;
- Determinar o perfil de liberação do 5ASA *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Principais equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (Quimis);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Espectrofotômetro de Ultravioleta/Visível Cary 60 (Agilent);
- pHmetro (Gehaka[®], Brasil);
- Zetasizer Nano NS (Malvern Panalytical);
- NanoSight NS300 (Malvern Panalytical);
- Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier IR-PRESTIGE-21 (Shimadzu);
- Analisador termogravimétrico TGA 4000 (Perkin Elmer);
- Analisador de calorimetria exploratório diferencial DSC 4000 (Perkin Elmer);
- Microscópio eletrônico de transmissão (Philips, modelo CM200);
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7500F.
- Ultracentrífuga (Hitachi);
- Incubadora Shaker (Condor)
- Analisador Universal de Textura (TA-XT2 Texture Analyser - Stable Micro Systems)

4.2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis

4.2.1. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível

A validação por espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) foi realizada com o intuito de quantificar o 5ASA nos sistemas desenvolvidos. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e especificidade conforme preconizados pela ICH (Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos para Uso Humano) – Q2 (R1) (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2. Validação do método analítico

4.2.2.1. Determinação do espectro de absorção do 5ASA na região do UV-Vis

A fim de verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção em meio ácido (HCl, 0,1 M), soluções de 5ASA a $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram submetidas à varredura na região entre 200 e 800 nm, em espectrofotômetro UV-Vis Cary 60 (Agilent) (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2.2. Linearidade

A linearidade foi determinada através da obtenção de três curvas analíticas do 5ASA, e a partir da solução estoque ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foram preparadas diluições com concentrações variando de 10 a $55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2.3. Precisão

A repetibilidade ou precisão intracorrida foi avaliada a partir de três diluições da solução estoque de 5ASA, nas concentrações 12, 30 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, correspondentes às concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica. As leituras foram realizadas no mesmo dia, sob condições experimentais idênticas, e os valores do desvio padrão relativo (DPR%) foram calculados. Para a precisão intermediária ou intercorrida, foi analisada em dia diferente, por um segundo analista utilizando as mesmas condições experimentais (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através de três diferentes concentrações (12, 30 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A exatidão foi calculada por meio da equação 1:

$$\text{Exatidão \%} = (C / C_o) * 100 \text{ (Equação 1)}$$

Em que C é a concentração média determinada experimentalmente, e C_0 é a concentração teórica correspondente (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2.5. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir de três curvas analíticas construídas e calculados utilizando as equações 2 e 3:

$$LD = (DPa * 3) / IC \text{ (Equação 2)}$$

$$LQ = (DPa * 10) / IC \text{ (Equação 3)}$$

Em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação da curva de calibração (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.2.2.6. Especificidade

O teste de especificidade foi realizado comparando os espectros para grânulos de placebo e 5ASA. Em segundo lugar, a especificidade foi determinada submetendo o solução de amostra para degradação acelerada por calor (60 °C) por 72 horas para verificar que nenhum dos produtos de degradação interferiu na quantificação do fármaco (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

4.3. Síntese de Nanopartículas de Sílica Mesoporosas (NSMs)

NSMs esféricas com diâmetro de poros e partículas ajustáveis foram preparadas pela metodologia de microemulsão direta (água/óleo). Resumidamente, 0,605 g de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi dissolvido em água ultrapura (180 mL) a 60 °C sob agitação (30 minutos) em atmosfera de N_2 . Depois disso, o octano (55,8 mL), estireno (105 μ L), lisina (0,138 g), tetraetilortosilicato (TEOS, 6,42 mL) e dihidroclorato de 2,2'-Azobis (AIBA, 0,202 g) foram subsequentemente adicionados à solução aquosa. O estireno foi pré-lavado com uma solução de NaOH (2,5 M). A reação foi mantida sob agitação a 60 °C em atmosfera de N_2 por 3 horas. Em seguida, a suspensão foi decantada e purificada por centrifugação a uma taxa de 15.000 rpm por 15 minutos. As nanopartículas centrifugadas foram lavadas com água ultrapura

e etanol (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; MATURI et al., 2019; NANDIYANTO et al., 2009; SÁBIO et al., 2020a, 2020b).

4.3.1. Remoção do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

Após a síntese das NSMs, o molde orgânico (CTAB e poliestireno) foi removido dos poros das nanopartículas por um procedimento de ultrassom. Utilizou-se um banho-ultrassom com frequência 28 KHz, com a amostra em etanol absoluto a 40 °C por três etapas consecutivas de 15 minutos para interromper a agregação micelar das moléculas de surfactante que preencheram os poros NSMs (JABARIYAN; ZANJANCHI, 2012).

Ao final do procedimento, as NSMs foram mantidas em dessecador e colocadas sob vácuo durante 24 horas.

4.4. Preparo da NSMs carregadas com 5ASA (NSMs@5ASA)

A incorporação do 5ASA nas NSMs foi realizada pela solubilização do fármaco em HCl 0,1 M/água destilada com posterior adição das NSMs sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Após a incorporação, as NSMs@5ASA foram recuperadas via ultracentrifugação e lavadas com água destilada, de acordo com metodologia descrita por Maturi *et al* (MATURI et al., 2019). Três proporções de 5ASA:NSMs foram avaliadas no processo de incorporação: 0,25:1, 1:1 e 1:2. Posteriormente, o material obtido foi seco sob vácuo à temperatura ambiente (CARVALHO; MARENA; SÁBIO, 2023; MAJUMDAR, 2023; RIBEIRO et al., 2022).

4.5. Caracterização físico-química das NSMs e NSMs@5ASA

4.5.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As vibrações características das ligações correspondentes à estrutura das NSMs e NSMs@5ASA foram avaliadas por espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (FTIR). Os espectros dos sistemas foram obtidos utilizando o espectrômetro FTIR IR-PRESTIGE-21 (Shimadzu®) sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 64 varreduras, resolução de 1 cm⁻¹ e faixa espectral de

análise de 400 a 4000 cm^{-1} pela técnica de transmissão em pastilha de KBr (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; SÁBIO et al., 2020b).

4.5.2. Análise termogravimétrica

A análise foi realizada usando um sistema TGA 4000 (Perkin Elmer) em uma faixa de temperatura de 25 a 800 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de ar dinâmica (fluxo taxa = 100 mL/min) (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; SÁBIO et al., 2020b).

4.5.3. Calorimetria exploratória diferencial

A análise foi realizada usando um sistema DSC 4000 (Perkin Elmer) em uma faixa de temperatura de 20 a 400 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de ar dinâmica (fluxo taxa = 100 mL/min) (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; SÁBIO et al., 2020b).

4.5.4. Eficiência de encapsulação das nanopartículas

Após a formação das NSMS@5ASA, uma alíquota da formulação foi centrifugada a 12.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado por meio do método espectrofotométrico validado neste estudo (TANG et al., 2017).

Para a determinação da porcentagem de 5ASA incorporada, foi aplicada a equação 4:

$$EE\% = \frac{\text{massa de 5ASA adicionada} - \text{massa de 5ASA livre no sobrenadante}}{\text{massa de 5ASA adicionada}} * 100$$

(Equação 4)

4.5.5. Diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas (NSMs e NSMs@5ASA) e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). O método de mobilidade eletroforética foi usado para medir o potencial zeta. O equipamento utilizado foi o Zetasizer (Malvern Instruments) com ângulo de detecção de 173°. Os

nanossistemas foram diluídos 1000 vezes em água ultrapura e analisados a 25 °C em triplicata (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; SÁBIO et al., 2020b).

4.5.6. Análise de rastreamento de nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas também foi determinado por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). O equipamento utilizado foi o Nano-Sight NS300 (Malvern Instruments) equipado com um laser de diodo de 532 nm (verde). Os nanossistemas foram diluídos 1000 vezes em água ultrapura ($n = 3$) e injetados com seringas estéreis na câmara de amostra (RIBEIRO et al., 2022).

4.5.7. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

As medidas foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-2100 operando a 200 kV, disponível no LME IQSC-USP (São Carlos, Brasil). Os nanossistemas foram dispersos em solução de etanol e 3 μ L foram despejados nas grades de cobre. As grades foram secas à temperatura ambiente e submetidas à análise (LUNGARE; HALLAM; BADHAN, 2016; SÁBIO et al., 2020b).

4.5.8. Estudo *in vitro* de interação entre mucina e NSMs@5ASA

A fim de avaliar a capacidade mucoadesiva das NSMs e NSMs@5ASA, a interação entre a mucina e as nanopartículas foi determinada a partir da análise do potencial zeta. Soluções de mucina em diferentes concentrações (150, 250 e 500 μ g/mL) foram preparadas em meio gástrico simulado (HCl pH 1,2) e meio colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8). Em seguida, as nanopartículas foram adicionadas a soluções de mucina, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 1 hora. O potencial zeta das amostras foi determinado usando o equipamento Zetasizer Nano, e os resultados comparados com os valores de potencial zeta sem adição de mucina. As análises foram realizadas em triplicata ($n=3$).

4.5.9. Ensaio de viabilidade celular em monocamadas de células Caco-2

A atividade do 5ASA livre e incorporado às nanopartículas foi avaliada utilizando-se como substância indicadora o cloridrato de resazurina (Sigma-Aldrich). As células de

adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) foram semeadas em microplacas de 96 poços obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo (5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade), durante 24 horas para permitir a aderência celular. Como controle positivo foram utilizadas as células tratadas com DMSO (30%, v/v) e para controle negativo as células sem qualquer tipo de tratamento. Novamente as células foram incubadas por 4 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. Em seguida, foram adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01% (m/v) e as placas foram novamente incubadas por 2 horas. As leituras da fluorescência foram realizadas em um leitor de placas (Synergy, Biotek) nos comprimentos de excitação e emissão de 540 e 590 nm, respectivamente. Os dados foram adquiridos em quadruplicado e expressos em média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA two-way seguida de pós-teste de Tukey utilizando o software GraphPad Prism.

4.6. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)

4.6.1. Retrogradação do amido em associação com pectina

O amido foi retrogradado de acordo com a metodologia proposta por Meneguín *et al.* (MENEGUÍN *et al.*, 2017, 2021; MENEGUÍN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014) com pequenas modificações. A alta amilose (AA, National Starch) foi dispersa em água destilada na concentração de 5% (m/v) sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, a dispersão de AA foi autoclavada para gelatinização a 121 °C por 120 minutos. A dispersão de AA gelatinizada foi resfriada a 30 °C e misturada com pectina (5%, m/v) na proporção de 1:4. Para o processo de retrogradação, as dispersões foram submetidas a ciclos térmicos alternados de 4 °C e 30 °C por 16 dias, 2 dias em cada temperatura. As dispersões de amido em água, amido gelatinizado e retrogradado foram avaliadas por microscopia óptica em microscópio Leica MZ APO® (MENEGUÍN *et al.*, 2017, 2021; MENEGUÍN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014).

4.6.2. Obtenção das MPs pela técnica de reticulação iônica

Com auxílio de seringa e agulha sem bisel 23G 1" (0,6 x 25 mm) gotejou-se a dispersão de amido retrogradado com pectina (AR/P, **item 4.6.1**) sobre a solução de cloreto de cálcio (5%, m/v), previamente resfriada em banho de gelo (4 °C). As MPs formadas foram mantidas

sob agitação por 30 minutos, a fim de completar a reação de reticulação. Ao final do processo, as partículas foram separadas por filtração, lavadas com água purificada, secas em estufa com circulação forçada de ar por 24 horas e armazenadas em dessecador (BONI et al., 2021).

4.6.3. Preparação de micropartículas AR/P carregadas com NSMs@5ASA

Foi realizada a incorporação direta de NSMs@5ASA (0,5% e 1,0%, m/v) secas na dispersão de AR/P (nomeados como AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%, respectivamente). Os conjuntos foram mantidos sob agitação magnética por 30 minutos antes do procedimento de reticulação iônica descrito no **item 4.6.2** (BONI et al., 2021).

4.6.4. Eficiência de encapsulação (EE%) das micropartículas poliméricas

A determinação de EE% foi realizada pela dispersão de 30 mg das micropartículas poliméricas em 3 mL de tampão fosfato (pH 6,8). As MPs foram mantidas sob agitação magnética por 48 horas e depois centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membranas de nylon de 0,45 µm antes da quantificação no método validado descrito no **item 3.2** (MENEGUIN et al., 2021). Uma nova curva analítica no novo meio (pH 6,8) foi validada.

A EE% de cada amostra foram avaliadas em triplicata usando a equação 5:

$$EE\% = \frac{\text{Massa de 5ASA quantificada}}{\text{Massa de 5ASA teórica}} * 100 \text{ (Equação 5)}$$

4.7. Caracterização das micropartículas poliméricas (MPs)

4.7.1. Avaliação do diâmetro, valor de span e circularidade

O tamanho e forma das MPs foram avaliados em estereoscópio Leica MZ APO®. As amostras foram dispostas em vidro de relógio e as imagens captadas por câmera digital. A circularidade e o diâmetro do círculo equivalente de 100 partículas de cada formulação foram avaliados a partir da digitalização das imagens no computador, utilizando o software analisador de imagem ImageJ (BONI et al., 2021).

Para uma análise quantitativa da distribuição granulométrica, determinou-se valor de Span, a partir da equação 6:

$$SPAN = \frac{D90 - D10}{D50} \text{ (Equação 6)}$$

Em que D90, D10 e D50 representam os diâmetros (μm) determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente.

4.7.2. Estudo da superfície das MPs

Micropartículas intactas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG), em equipamento JEOL JSM-7500F. As amostras foram fixadas com fita de carbono dupla face e revestidas com material condutor (carbono). Fotomicrografias foram obtidas em diversos aumentos, de acordo com a melhor visualização das estruturas externas (BONI et al., 2021).

4.7.3. Avaliação da degradação enzimática das MPs em meios gástrico e entérico simulados

A digestão enzimática foi avaliada por gravimetria. Para isso, uma massa precisamente pesada de partículas foi incubada por 2 horas em solução de HCl (0,1N) + NaCl (0,9%) de pH final 1,2, contendo a enzima pepsina (0,3 mg.mL⁻¹) ou por 4 horas em tampão fosfato (pH 6,8) contendo a enzima pancreatina (3,2 mg.mL⁻¹). Para a análise gravimétrica, após o período de incubação, as amostras foram cuidadosamente retiradas dos cestos e secas em temperatura ambiente até peso constante (BONI et al., 2021).

4.7.4. Avaliação da capacidade de absorção de líquidos

A capacidade de absorção de líquidos dependente do pH foi determinada de acordo com a literatura (YÍPEL et al., 2022). As micropartículas poliméricas de AR/P (100 mg cada) foram testadas em diferentes soluções (pH: 1,2 e 6,8). Após, respectivamente, 5, 10, 15, 30, 60 e 90, minutos, os materiais foram removidos das soluções e o excesso de água removido

cuidadosamente com auxílio de papel toalha. As amostras foram pesadas e o grau de intumescimento (GI) calculado como percentual (%) de acordo com a equação 7.

$$GI = \frac{W_t - W_{t0}}{W_{t0}} * 100 \text{ (Equação 7)}$$

Wt: peso medido em intervalos de tempo especificados, Wt0: refere-se ao peso inicial.

4.7.5. Avaliação da mucoadesividade *in vitro* em texturômetro

A força mucoadesiva das micropartículas carregadas com NSMs@5ASA foi medida usando o Analisador Universal de Textura (TA-XT2 Texture Analyser - Stable Micro Systems) no modo de análise compressão. Discos de mucina suína tipo II, previamente hidratados com HCl (pH 1,2) ou tampão fosfato (pH 6,8), foram usados para simular o substrato biológico. Os discos de mucina foram fixados na mesa do analisador, e as amostras secas foram fixadas na sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro com fita dupla face (3M™). A sonda, contendo a amostra, foi movida perpendicularmente em direção ao disco a uma velocidade constante de 1 mm/s, permanecendo em contato por 30 s. Em seguida, a sonda foi retirada a uma velocidade constante de 2 mm/s até a separação completa das duas superfícies. A partir do software Texture Exponent Lite, determinou-se a força máxima de mucoadesão (FMax).

4.7.6. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5ASA

A cinética de liberação *in vitro* do 5ASA presente nas micropartículas poliméricas (MPs AR/P) carregadas com NSMs@5ASA foi realizada em incubadora *shaker*, utilizando membrana de diálise (peso molecular de 14000 Da) sob condições *sink* em meios com diferentes pH. Foi realizado um estudo comparativo da liberação do fármaco *in vitro* com diferentes formulações: micropartículas de AR/P contendo as NSMs@5ASA, somente as NSMs@5ASA, além do fármaco livre. Foram utilizados diferentes meios, visando mimetizar as variações de pH que ocorre ao longo do TGI: meio gástrico simulado (HCl pH 1,2) durante 1 hora, meio intestinal simulado (tampão fosfato pH 7,4) durante 1 hora e meio colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8) durante 5 horas. O sistema foi mantido sob agitação de 50 rpm à 37 ± 1 °C. Aliquotas (2 mL) foram retiradas nos tempos pré-determinados (com reposição imediata do meio à mesma temperatura) e filtradas em uma membrana de 0,45 µm. As concentrações de 5ASA foram determinadas por espectroscopia UV-Vis a partir das curvas de calibração

previamente construídas para pH 1,2, 7,4 e 6,8, em 300, 330 ou 331 nm, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.7.7. Modelagem matemática da liberação *in vitro* da 5ASA

A modelagem matemática dos dados do ensaio de liberação do fármaco foi realizada utilizando o DDSolver para o Microsoft® Excel. Os dados foram tratados com diferentes modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e Hixson-Crowell) para avaliação de qual melhor representa o mecanismo envolvido no processo de liberação do fármaco.

4.8. Análise estatística

As diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis

Os parâmetros avaliados (linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e especificidade) atenderam os critérios exigidos conforme preconizados pela ICH (Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos para Uso Humano) – Q2 (R1) (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005; MALEQUE et al., 2012).

Os resultados foram apresentados no **APÊNDICE A**.

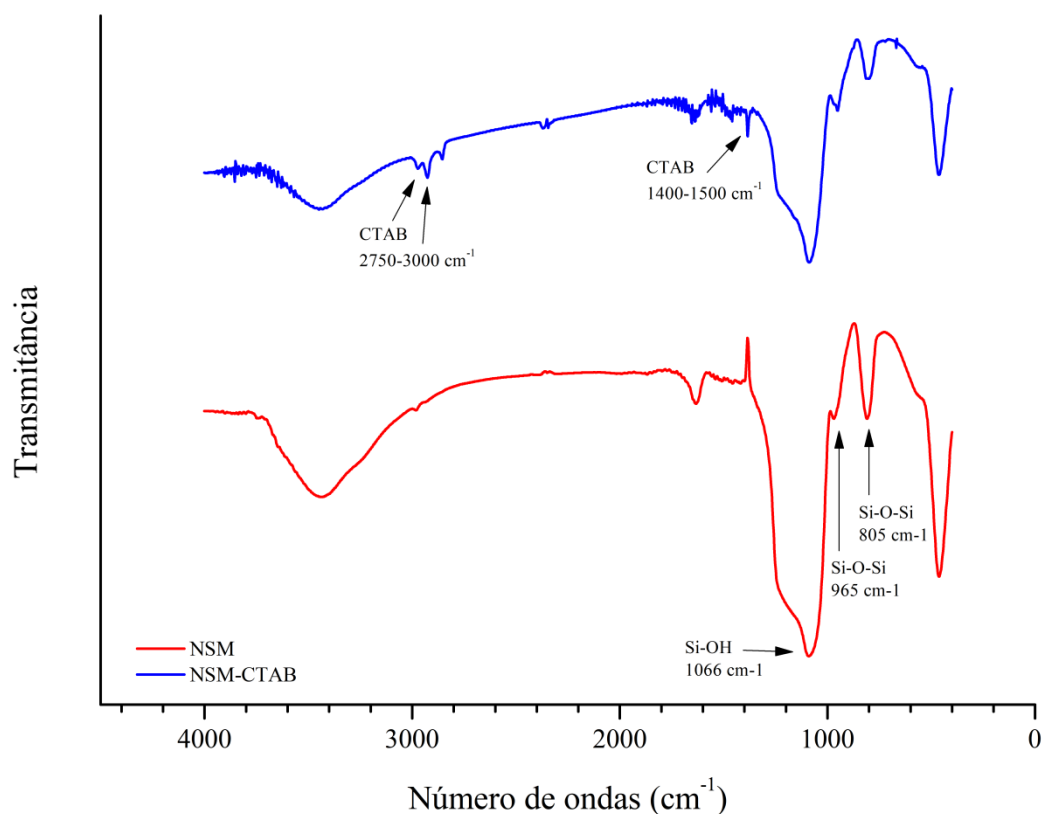
5.2. Caracterização de NSMs sem fármaco e NSMs carregadas com 5ASA

5.2.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e eficiência de encapsulação (EE%)

Inicialmente, foram avaliadas as nanopartículas antes (NSMs-CTAB) e após (NSMs) a remoção do CTAB. Por medidas de FTIR, foi possível observar nos espectros de ambas as amostras NSMs e NSMs-CTAB (**Figura 3**) bandas correspondentes ao alongamento axial simétrico e assimétrico de Si-O-Si em 800 e 1085 cm^{-1} respectivamente, característica da matriz de sílica. Adicionalmente, observa-se uma banda atribuída a um Si-OH axial estendendo-se em torno de 960 cm^{-1} , característica dos silanóis disponíveis na superfície e nos poros das nanopartículas. Uma banda larga em torno de 3400 cm^{-1} foi detectada e atribuída a um alongamento da ligação O-H das moléculas de água. Finalmente, uma banda correspondente à deformação angular simétrica no plano da ligação O-H foi observada em 1630 cm^{-1} , que também foi atribuída aos grupos silanol disponíveis na superfície e nos poros das nanopartículas (CARVALHO et al., 2022; MATURI et al., 2019; POPOVA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2022; TRENDAFILOVA et al., 2016).

Além disso, no espectro correspondente às NSMs-CTAB, também podem ser observadas bandas indicativas de resíduo de matéria orgânica (entre 1400 – 1500 cm^{-1} e 2750 – 3000 cm^{-1}), referentes ao CTAB (CARVALHO et al., 2022; MATURI et al., 2019; POPOVA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2022; TRENDAFILOVA et al., 2016), bandas que não são visualizadas no espectro das NSMs, indicando que o método proposto para a remoção do molde orgânico foi eficiente.

Figura 3 - Espectros de infravermelho de NSMs e NSMs-CTAB diluídos em pellet KBr.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez caracterizado, passou-se para a etapa de incorporação, conforme pode ser observado na **Tabela 1**. A alta eficiência de encapsulação do fármaco é um atributo crítico do sistema desenvolvido e a seleção da plataforma e técnica de obtenção são importantes para alcançar estes valores. Neste trabalho, a obtenção NSMs resultou em uma elevada porcentagem de encapsulação de 5ASA, com valores variando de 85,52 a 93,19%. A NSMs com proporção de 1:1 apresentou resultados superiores às demais proporções testadas ($p < 0,05$), sendo assim o escolhido para a continuação do trabalho (denominado NSMs@5ASA).

Tabela 1 - Porcentagem de EE de 5ASA nas NSMs.

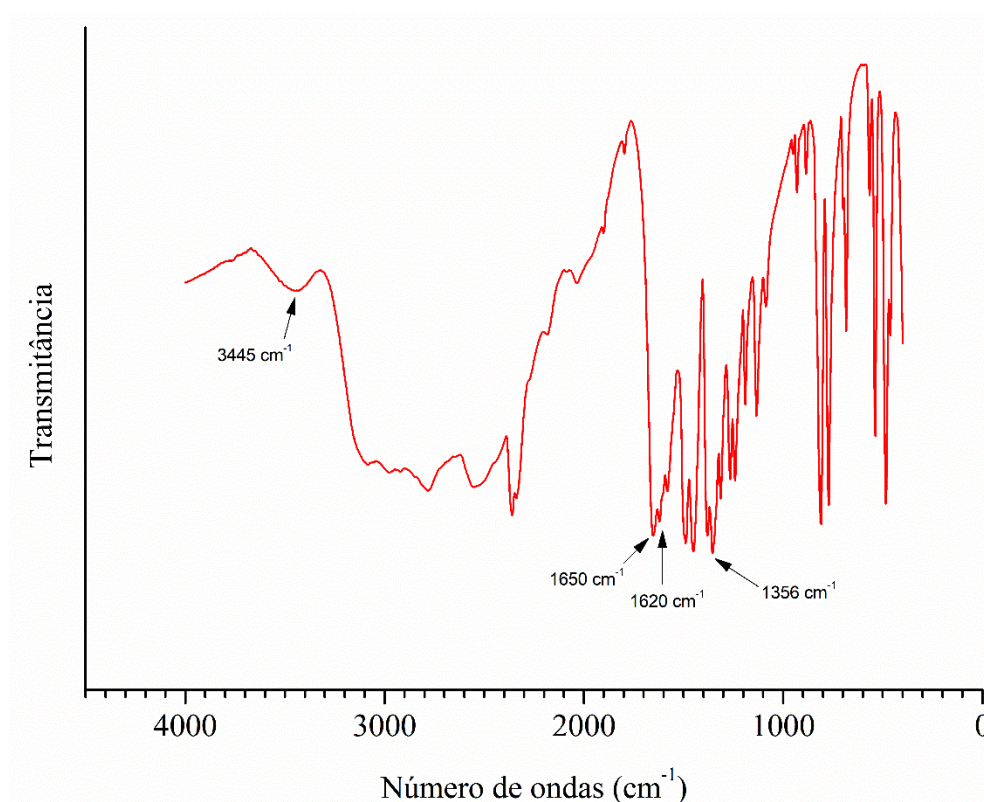
Amostra (Proporção)	EE (%) $\pm$ DP
NSMs (0,25:1)	90,65 $\pm$ 0,007
NSMs (1:1)	93,19 $\pm$ 0,0014
NSMs (1:2)	85,82 $\pm$ 0,0014

Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 4** mostra o espectro de 5ASA livre. As bandas características dos espectros de 5ASA já foram descritas por Dumitru e colaboradores (2022) (DUMITRU et al., 2022), e corresponderam a: 3445 cm^{-1} (sobreposição mútua de alongamento νNH e νOH), 1650 cm^{-1} (alongamento $\text{C}=\text{O}$), 1620 cm^{-1} (NH), 1356 cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}$ estiramento), $2.000 - 3.000\text{ cm}^{-1}$ (vibrações de estiramento das ligações de hidrogênio). No espectro NSMs@5ASA (**Figura 5**), além das bandas características das NSMs, é possível observar, principalmente, um estreitamento na banda entre $3400 - 3500\text{ cm}^{-1}$ e na banda em 1066 cm^{-1} , sugerindo uma interação entre os grupos da matriz de sílica e os grupos de 5ASA, atribuída às ligações de hidrogênio (DUMITRU et al., 2022).

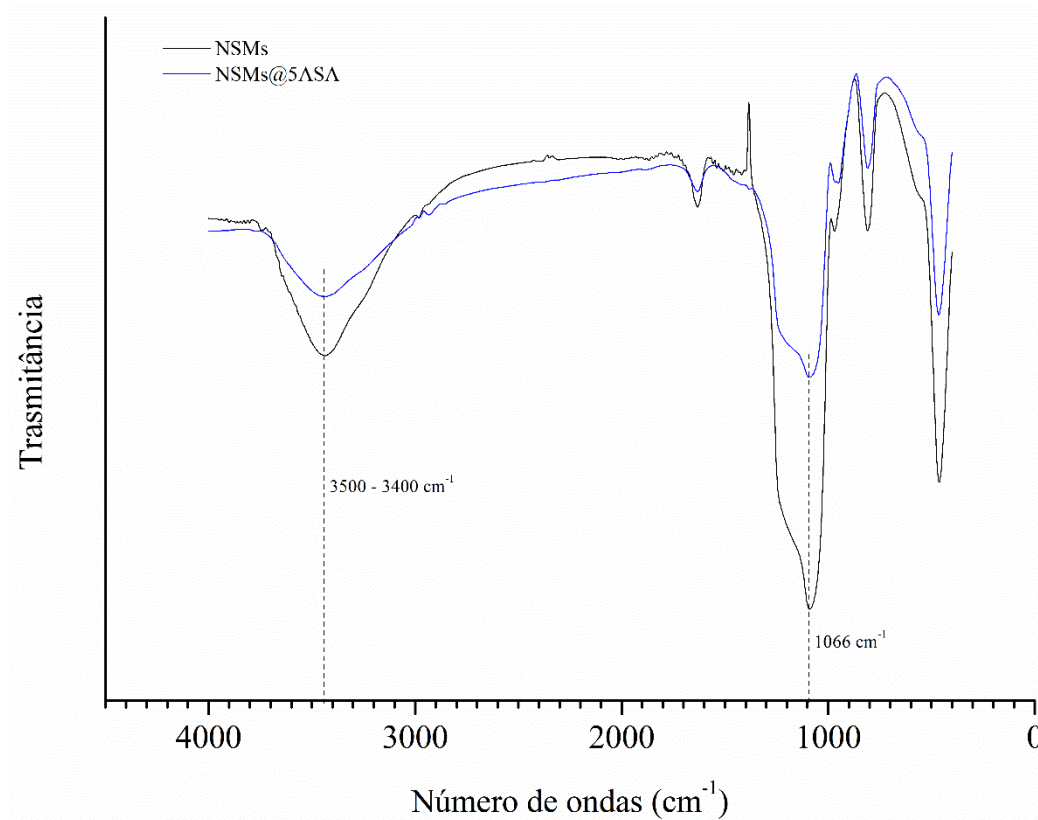
Em outros estudos, o 5ASA foi encapsulado com sucesso em NSMs apresentando valores de EE de 73 a 85% (concentrações de 0,1 a 0,2% m/v) (AMIRY; SAZEGAR; MAHMOUDI, 2022). As NSMs são bem conhecidas por sua grande área superficial, o que permite o encapsulamento de altas concentrações de fármacos (AMIRY; SAZEGAR; MAHMOUDI, 2022; RIBEIRO et al., 2022).

Figura 4 - Espectros infravermelhos de 5ASA livre diluído em pellet KBr



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Espectros infravermelhos de NSMs e NSMs@5ASA diluídos em pellet KBr



Fonte: Elaborada pelo autor.

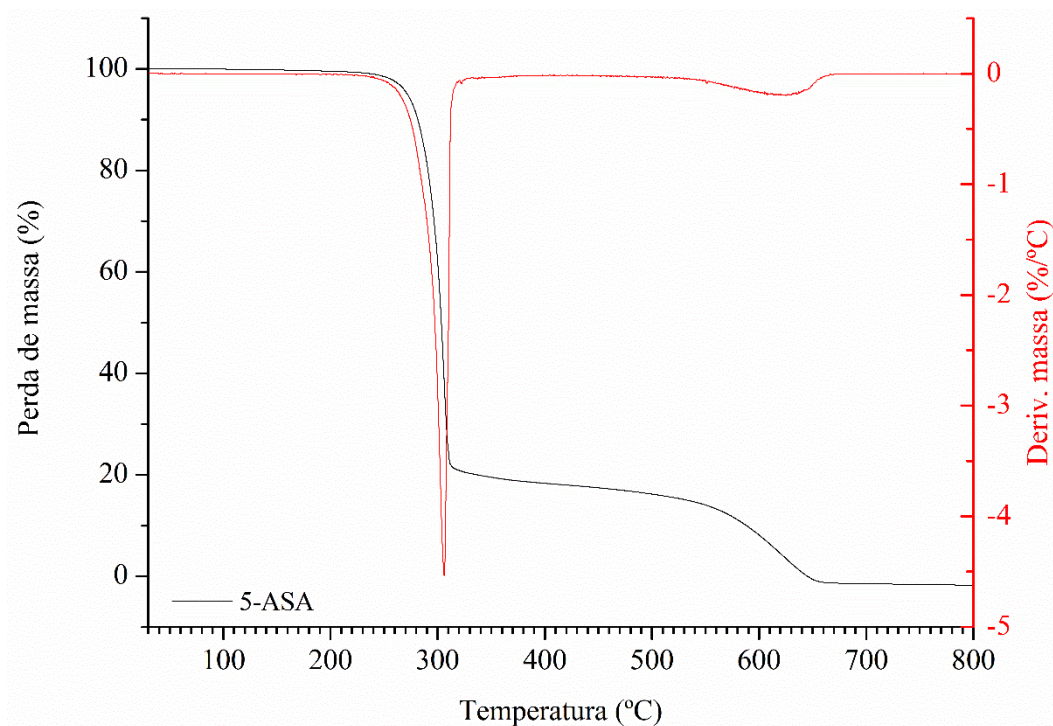
5.2.2. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A **Figura 6** exibe os perfis de TGA para o 5ASA com dois eventos principais: um pico endotérmico em 294 °C atribuído à fusão do fármaco, com aproximadamente 80% de perda de massa, e um segundo pico endotérmico próximo de 600 °C, representando a decomposição térmica completa do 5ASA. A essa temperatura, a estrutura do composto é quebrada, possivelmente resultando em carbonização ou oxidação dos resíduos de decomposição (NASSAR et al., 2014). As curvas de TGA das NSMs são apresentadas na **Figura 7**, demonstrando dois eventos de perda de massa. A primeira atribuída à perda de água da temperatura ambiente até 100 °C (~8 % de perda de massa) e a última de 200 a 650 °C corresponde à desidroxilação da matriz (~10 % de perda de massa) (MATURI et al., 2019; RIBEIRO et al., 2022). As curvas TGA das NSMs@5ASA (**Figura 8**) também apresentam um evento endotérmico correspondente à perda de água da temperatura ambiente até 100 °C; entretanto, não evidencia nenhum evento térmico correspondente ao 5ASA.

Além das curvas TGA, na condição de incorporação considerada ideal, foi realizada a curva DSC (**Figura 9**). A técnica DSC é um dos métodos mais convenientes para investigar a

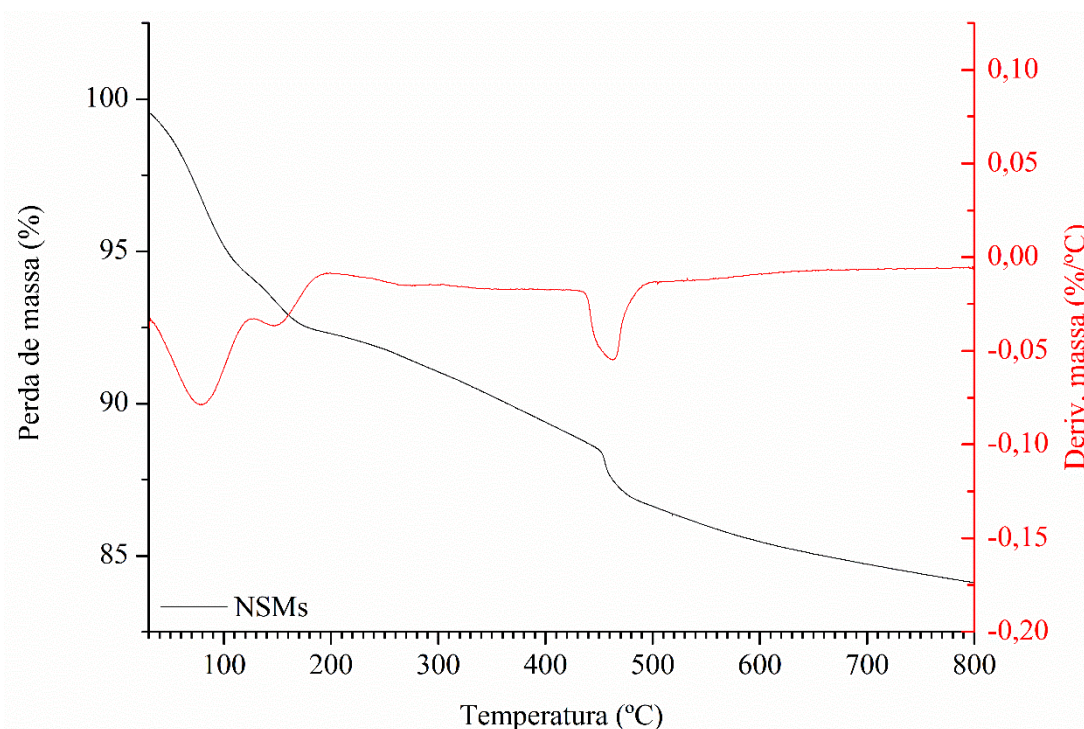
compatibilidade entre o nanossistema e fármaco, portanto foi utilizada para investigar a compatibilidade termodinâmica entre 5ASA e NSMs. É possível observar que as curvas referentes as NSMs e NSMs@5ASA apresentam um primeiro evento endotérmico (em 80 °C), atribuído à perda de água ou solventes adsorvidos nas amostras (MATURI et al., 2019). O 5ASA apresentou um pico endotérmico acentuado a 294 °C que corresponde ao seu ponto de fusão, indicando sua natureza cristalina. A incorporação do fármaco no nanossistema resultou no desaparecimento de tal pico de fusão completamente. O desaparecimento do pico endotérmico do fármaco nas nanopartículas sugere que o 5ASA pode estar incorporado nos mesoporos em um estado amorfo, indicando uma compatibilidade termodinâmica entre o 5ASA e as NSMs (DUMITRU et al., 2022; HU et al., 2012; POPOVA et al., 2014; TRENDAFILOVA et al., 2016). Além disso, o desaparecimento dos picos de DSC característicos dos pontos de fusão de outros fármacos, como cetoprofeno (ABD-ELRAHMAN et al., 2016), curcumina (RIBEIRO et al., 2022) foram relatados para várias sílicas mesoporosas e sugeriram tanto o encapsulamento bem-sucedido de moléculas de fármacos quanto suas moléculas amorfas ou natureza semicristalina no interior dos mesoporos.

Figura 6 – Curva de TGA da mesalazina pura (5ASA)



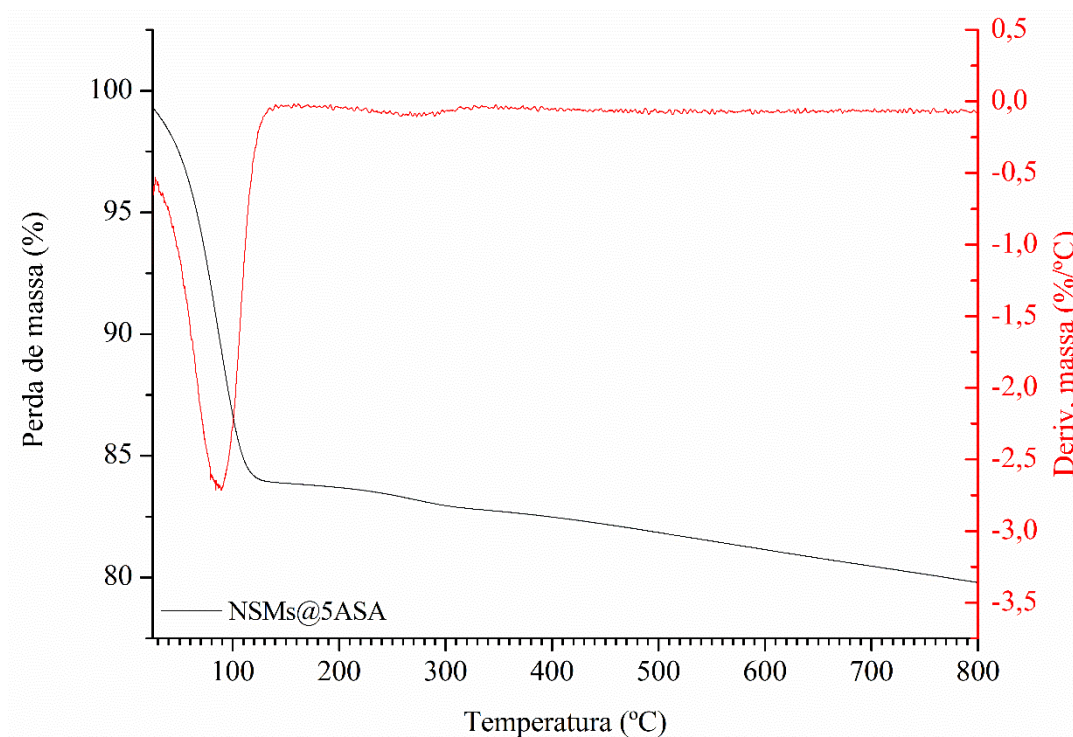
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Curva de TGA das nanopartículas de sílica mesoporosas (NSMs)



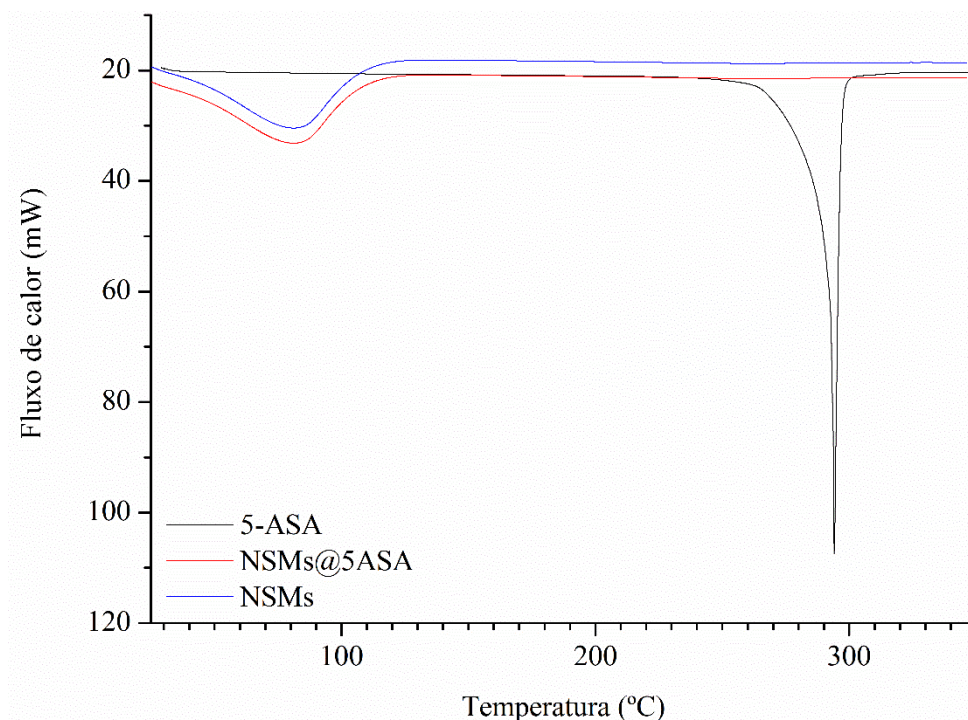
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Curva de TGA das nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com 5ASA (NSMs@5ASA)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 – Curvas de DSC de 5ASA, NSMs e NSMs@5ASA



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3. Diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio das NSMs@5ASA, mensurado pela técnica de DLS, foi de 109 nm (**Tabela 2**). Comparando-se com a análise das NSMs sem adição do fármaco, não expressou diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

O índice de polidispersidade (PDI) representa a distribuição do tamanho das partículas. O PDI das amostras manteve-se em torno de 0,29. Valores abaixo de 0,5 indicam uma distribuição de tamanho homogênea e valores maiores que 0,5 indicam uma distribuição de tamanho heterogênea (RIBEIRO et al., 2022). A adição de fármaco influenciou de forma significativa o potencial zeta das NSMs ($p < 0,05$), o qual permaneceu negativo, com valor de -25 mV para as NSM@5ASA, sendo considerados nanossistemas relativamente estáveis eletrostaticamente. Este fenômeno pode ser atribuído à interação entre a mesalazina e a superfície das NPs, onde o fármaco pode estar se adsorvendo fisicamente ou quimicamente à superfície da sílica mesoporosa, neutralizando parcialmente as cargas negativas.

Tabela 2 - Diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta e moda das NSMs e NSMs@5ASA

Amostras	<i>DLS</i>			<i>NTA</i>	
	Diâmetro de partícula (nm) ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP	Índice de Polidispersão ± DP	Diâmetro de partícula (nm) ± DP	Moda ± DP
NSM	109,7±1,40	-29,37±1,55	0,2973±0,009	142,2±1,5	110±3,8
NSMs@5ASA	109±4,80	-25±0,781	0,2177±0,003	148,1±9,4	105,4±24,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao se analisar os resultados obtidos por NTA, observou-se uma diferença em relação aos valores obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (**Tabela 2**).

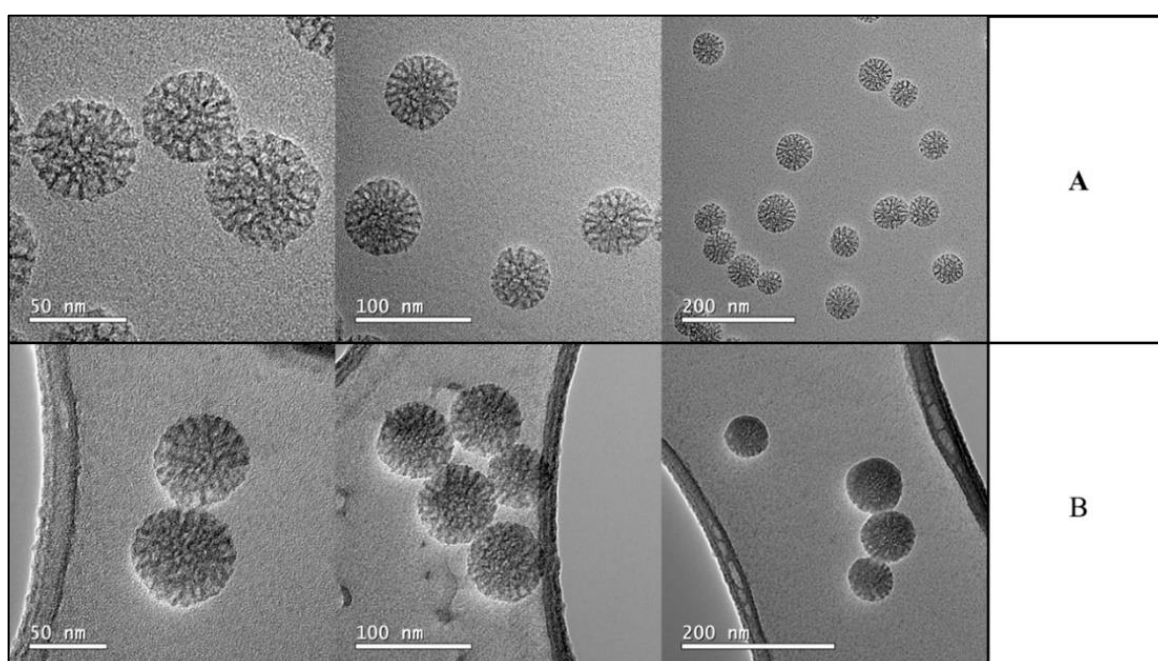
As técnicas de NTA e DLS são complementares para a análise do tamanho de nanopartículas em dispersão, mas apresentam diferenças metodológicas que explicam as variações nos resultados obtidos. No NTA, o diâmetro médio das NSMs e das NSMs@5ASA foram de 142,2 nm e 148,1 nm, respectivamente, com modas de 110 nm e 105,4 nm, respectivamente. O NTA mede individualmente cada nanopartícula, utilizando o espalhamento de luz e o movimento browniano para calcular o tamanho com base na equação de Stokes–Einstein, proporcionando uma distribuição detalhada do tamanho das partículas. Em contraste, o DLS mede a flutuação da intensidade do espalhamento de luz por muitas partículas, fornecendo um tamanho hidrodinâmico médio que tende a ser menor devido à maior sensibilidade a partículas pequenas e agregados. A diferença de 30 a 40 nm nos diâmetros médios entre NTA e DLS pode ser atribuída à maior resolução e capacidade da NTA de diferenciar partículas individuais e pequenas variações na dispersão. No entanto, a proximidade dos valores de moda entre as duas técnicas indica uma consistência nos tamanhos mais frequentes das partículas, destacando a complementaridade dos métodos para uma caracterização mais robusta das nanopartículas (HOU et al., 2018; JAMES; DRISKELL, 2013).

5.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi realizada para confirmar o tamanho de partícula dos NSMs, bem como para avaliar sua estrutura mesoporosa. A **Figura 10** exibe imagens dos NSMs e NSMs@5ASA (**Figura 10A,B**, respectivamente).

Nanopartículas esféricas com uma distribuição aleatória de mesoporos na faixa nanométrica foram observadas. Segundo a microscopia, os nanossistemas apresentaram diâmetro médio de partícula de aproximadamente 112 nm, corroborando os resultados encontrados em DLS e NTA. Nenhuma alteração na forma, diâmetro da partícula e estrutura mesoporosa foi observada após o carregamento de 5ASA (POPOVA et al., 2018; SÁBIO et al., 2016; SHAWKY et al., 2016).

Figura 10 - Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução das NSM (A) e NSM@5ASA (B)



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.5. Estudo *in vitro* de interação entre mucina e NSMs@5ASA utilizando análise de potencial zeta

A interação entre NSMs@5ASA com a interface biológica é um fator decisivo para melhorar a eficiência de entrega do fármaco ao sítio de absorção ou ação. No contexto do sistema do TGI, enfrenta-se uma barreira significativa: o muco intestinal. Este muco, produzido pelas células do epitélio intestinal, é uma substância complexa composta principalmente por água, sais inorgânicos, lipídios, enzimas, ácidos graxos e glicoproteínas. Entre estas glicoproteínas, a mucina assume um papel central. Além disso, a carga e o tamanho das nanopartículas influenciam sua capacidade de permeação através do muco. Partículas menores com superfícies hidrofóbicas tendem a ser aprisionadas pelo muco e eliminadas rapidamente,

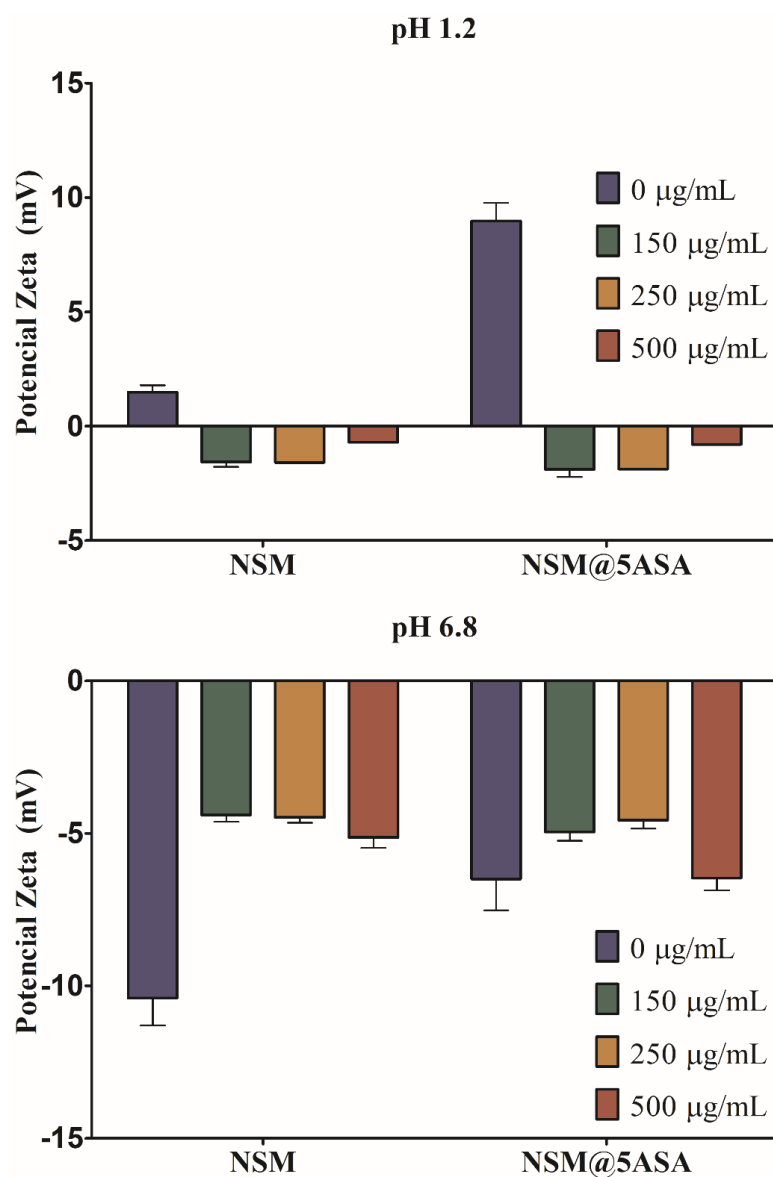
enquanto partículas modificadas que possuam características mucoadesivas podem prolongar sua presença na interface epitélio-muco (BAYER, 2022; CARVALHO et al., 2024; TOLLEMETO et al., 2023; WANG et al., 2020; WAYS et al., 2020).

Os resultados apresentados na **Figura 11** demonstram uma mudança significativa ($p < 0,001$) no potencial zeta das NSMs e NSMs@5ASA quando a mucina é adicionada em diferentes concentrações e em diferentes meios com pH distintos.

Em ambiente ácido (pH 1,2), o potencial zeta das NSMs é positivo (1.49 mV) e com a adição de mucina, o potencial zeta torna-se negativo, e essa mudança é mais pronunciada com a maior concentração de mucina (150 µg/mL: -1,566 mV; 250 µg/mL: -1,585 mV; 500 µg/mL: -0,691 mV). Em relação as NSMs@5ASA, o potencial zeta é positivo (8.967 mV) sem interação com a mucina, e ao interagir resulta em um potencial zeta negativo, e essa mudança também é mais pronunciada com a maior concentração de mucina (150 µg/mL: -1,886 mV; 250 µg/mL: -1,870 mV; 500 µg/mL: -0,795 mV).

No ambiente gástrico analisado (pH 1,2), a mucina e suas diferentes concentrações tem um efeito significativo ($p < 0,001$) na modificação do potencial zeta das nanopartículas de sílica mesoporosa com e sem fármaco, tornando-as mais negativas. Isso sugere uma interação entre a mucina e as nanopartículas, possivelmente devido às interações eletrostáticas ou formação de complexos, além da dependência da concentração de mucina, com maiores concentrações levando a uma maior modificação do potencial zeta. A presença do 5ASA não indica um efeito significativo na interação entre a mucina e as nanopartículas ($p > 0,05$), já que as mudanças observadas no potencial zeta são semelhantes tanto nas nanopartículas com mesalazina quanto nas nanopartículas sem mesalazina.

Figura 11 - Influência da adição de dispersões de mucina, em diferentes concentrações (150, 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) no potencial zeta das NSMs@5ASA (média $\pm$ DP, $n = 3$)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Alterando para um ambiente com pH de 6,8, observou-se outro perfil de interação. O potencial zeta das NSMs é negativo (-10,4 mV), e após a adição de mucina, o resultado permanece negativo, mas observa-se uma tendência à diminuição do valor absoluto do potencial zeta com o aumento da concentração de mucina (150 $\mu\text{g/mL}$: -4,39 mV; 250 $\mu\text{g/mL}$: -4,47 mV; 500 $\mu\text{g/mL}$: -5,13 mV). Analisando as NSMs@5ASA, o potencial zeta é menos negativo (-6,49 mV) em comparação com as NSMs em pH 6.8 ($p < 0,05$), e o contato com a mucina resulta em uma variação nos valores absolutos do potencial zeta com a concentração de mucina (150 $\mu\text{g/mL}$: -4,95 mV; 250 $\mu\text{g/mL}$: -4,56 mV; 500 $\mu\text{g/mL}$: -6,45 mV).

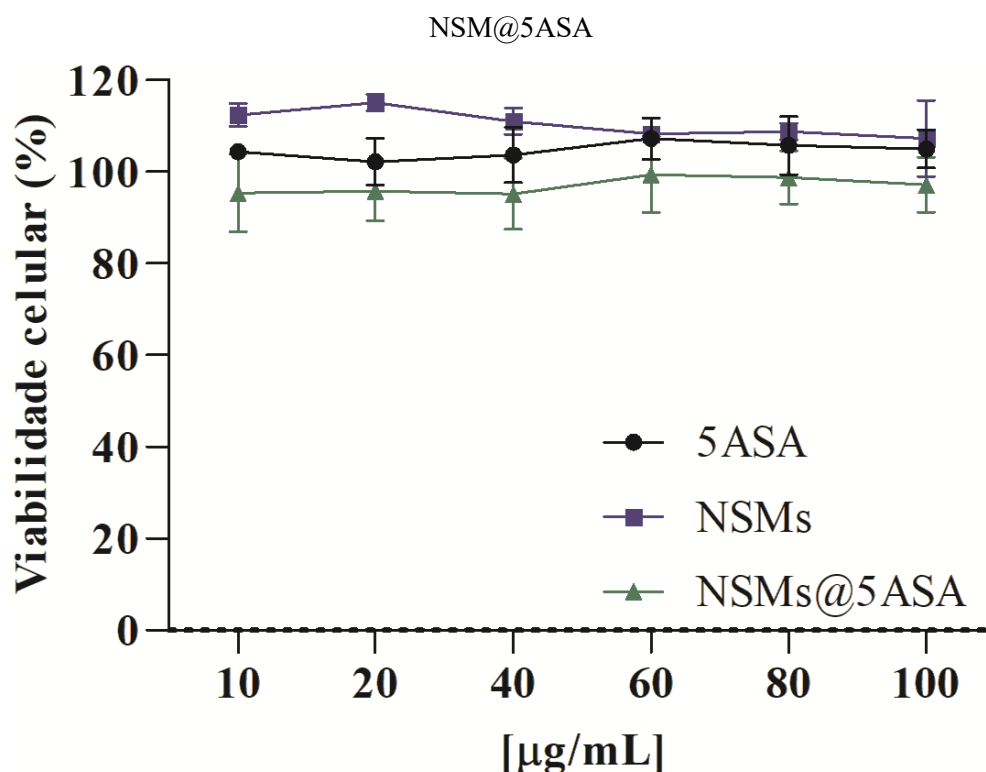
Novamente, observa-se uma tendência à diminuição do valor absoluto do potencial zeta das nanopartículas com o aumento da concentração de mucina, mais uma vez sugerindo que a mucina está interagindo com as nanopartículas e influenciando suas propriedades de superfície em pH 6,8.

Analisando os resultados da **Figura 11** quanto a variação do pH, em comparação com os resultados em pH 1,2, o potencial zeta das nanopartículas em geral é menos negativo em pH 6,8, apresentando diferença estatística entre os grupos ($p < 0,001$). Em suma, os resultados sugerem que a presença de mucina afeta as propriedades de superfície das nanopartículas de sílica mesoporosa, como evidenciado pela mudança no potencial zeta. Isso pode ter implicações importantes para a entrega controlada do fármaco, especialmente em um sistema híbrido destinados ao cólon, onde a mucina está presente em abundância, potencialmente contribuindo para a mucoadesividade.

5.2.6. Ensaio de viabilidade celular em monocamadas de células Caco-2

Considerando a administração oral de fármacos e o cólon como alvo terapêutico, o ensaio de viabilidade celular utilizou as células Caco-2, linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de cólon humano que, por sua vez, é um modelo representativo das células epiteliais do intestino (HEIKKILÄ et al., 2010; RASHIDI et al., 2014; SCHNUR et al., 2022; SMETANOVÁ et al., 2014). O ensaio avaliou as concentrações de 5ASA e de NSMs que não comprometem a viabilidade das células Caco-2 e avaliou também a biocompatibilidade do fármaco e nanopartícula. É importante salientar que, para garantir a biocompatibilidade completa do sistema, são necessários estudos adicionais, como genotoxicidade e hematocompatibilidade, conforme a norma ISO 10993-1:2018.

Figura 12 - Viabilidade celular (%) na linhagem Caco-2 expostos ao 5ASA livre, NSMs e



Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme apresentado no gráfico da **Figura 12**, a manutenção de aproximadamente 100% de viabilidade celular em todas as amostras testadas sugere que as nanopartículas de sílica mesoporosa com e sem fármaco são biocompatíveis e não tóxicas para células da linhagem Caco-2. Isso está em concordância com estudos anteriores que demonstraram a inércia dessas partículas em modelos celulares similares (HEIKKILÄ et al., 2010; POPOVA et al., 2014, 2018; RASHIDI et al., 2014; RIAZI et al., 2023; TANG et al., 2017; TRENDAFILOVA et al., 2016; ZHANG et al., 2012). Além disso, o 5ASA também demonstrou não ser citotóxico nas concentrações testadas, corroborando sua segurança clínica estabelecida para o tratamento de DII (AGUZZI et al., 2011; SMETANOVÁ et al., 2014; TANG et al., 2017). Estes achados são promissores para o desenvolvimento de novas formulações terapêuticas que combinam eficácia anti-inflamatória com segurança celular, essencial antes de avançar para estudos mais complexos ou modelos *in vivo*.

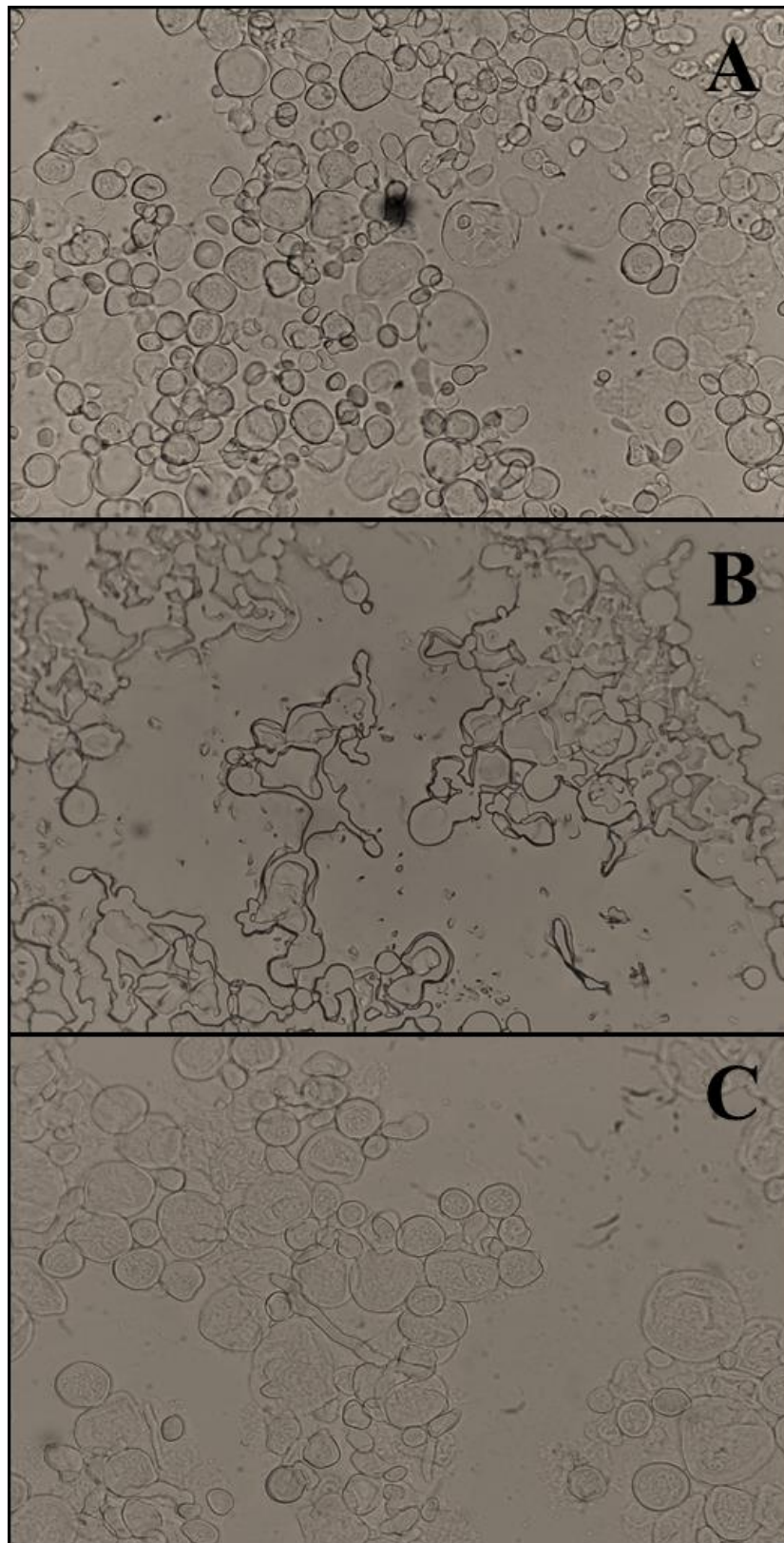
5.3. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)

5.3.1. Retrogradação do amido em associação com pectina

As fotomicrografias ópticas dos grânulos de amido nativo, após a gelatinização e após o processo de retrogradação estão apresentadas na **Figura 13**. Antes da retrogradação, quando observados microscopicamente, os grânulos de amido apresentavam uma estrutura ligeiramente intumescida, devido a difusão e aprisionamento das moléculas de água em sua região amorfa (**Figura 13A**) (MENEGUIN et al., 2017, 2021; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; WANG et al., 2015; WANG; COPELAND, 2013).

Quando a dispersão aquosa de alta amilose foi aquecida a 80°C e autoclavada (121°C), ocorreu o processo de intumescimento irreversível dos grânulos, isso resultou na perda da organização estrutural, com a fusão dos cristais. Consequentemente, devido ao aquecimento e ao excesso de água, ocorreu o rompimento da estrutura dos grânulos e a amilose granular foi liberada no meio aquoso (**Figura 13B**), caracterizando o fenômeno de gelatinização. No período de armazenamento, no qual a dispersão foi submetida a sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento, as moléculas de amilopectina e amilose tendem a reassociar-se e formar estruturas cristalinas mais ordenadas. A amilose recristaliza mais rapidamente do que a amilopectina devido à sua estrutura linear. Com a recristalização, ocorre a formação de uma rede tridimensional mais rígida e dura que é perceptível pelo aumento da viscosidade da dispersão, a qual favorece a proteção à hidrólise enzimática. A formação da estrutura ramificada e organizada pode ser observada na **Figura 13C** (MENEGUIN et al., 2017, 2021; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014; WANG et al., 2015; WANG; COPELAND, 2013).

Figura 13 - Microscopia óptica dos grânulos de amido na fase previa ao processamento (A), após a gelatinização (B) e após a retrogradação (C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2. Obtenção e caracterização estrutural e morfológica das micropartículas de AR/P carregadas com NSMs@5ASA

As micropartículas de amido retrogradado/pectina foram obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica.

O estudo do tamanho e distribuição granulométrica das micropartículas são fundamentais, pois alterações no volume e consequentemente área superficial podem interferir diretamente na capacidade de incorporação do fármaco e das nanopartículas de sílica mesoporosas, causando potenciais variações de dose. Essas variações podem também afetar a reprodutibilidade dos eventos envolvidos no processo de liberação, bem como na interação com o organismo biológico (BONI et al., 2021).

Tabela 3 - Diâmetro, circularidade média e Índice Span das MPs (n=100).

Amostras	Diâmetro médio (μm) $\pm$ DP	Circularidade $\pm$ DP	SPAN
MPs AR/P	1565 $\pm$ 97,64	0,84 $\pm$ 0,092	0,13
MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5%	1386 $\pm$ 157,56	0,76 $\pm$ 0,13	0,23
MPs AR/P_NSMs@5ASA1%	1424 $\pm$ 151,5	0,80 $\pm$ 0,17	0,27

Fonte: Elaborada pelo autor.

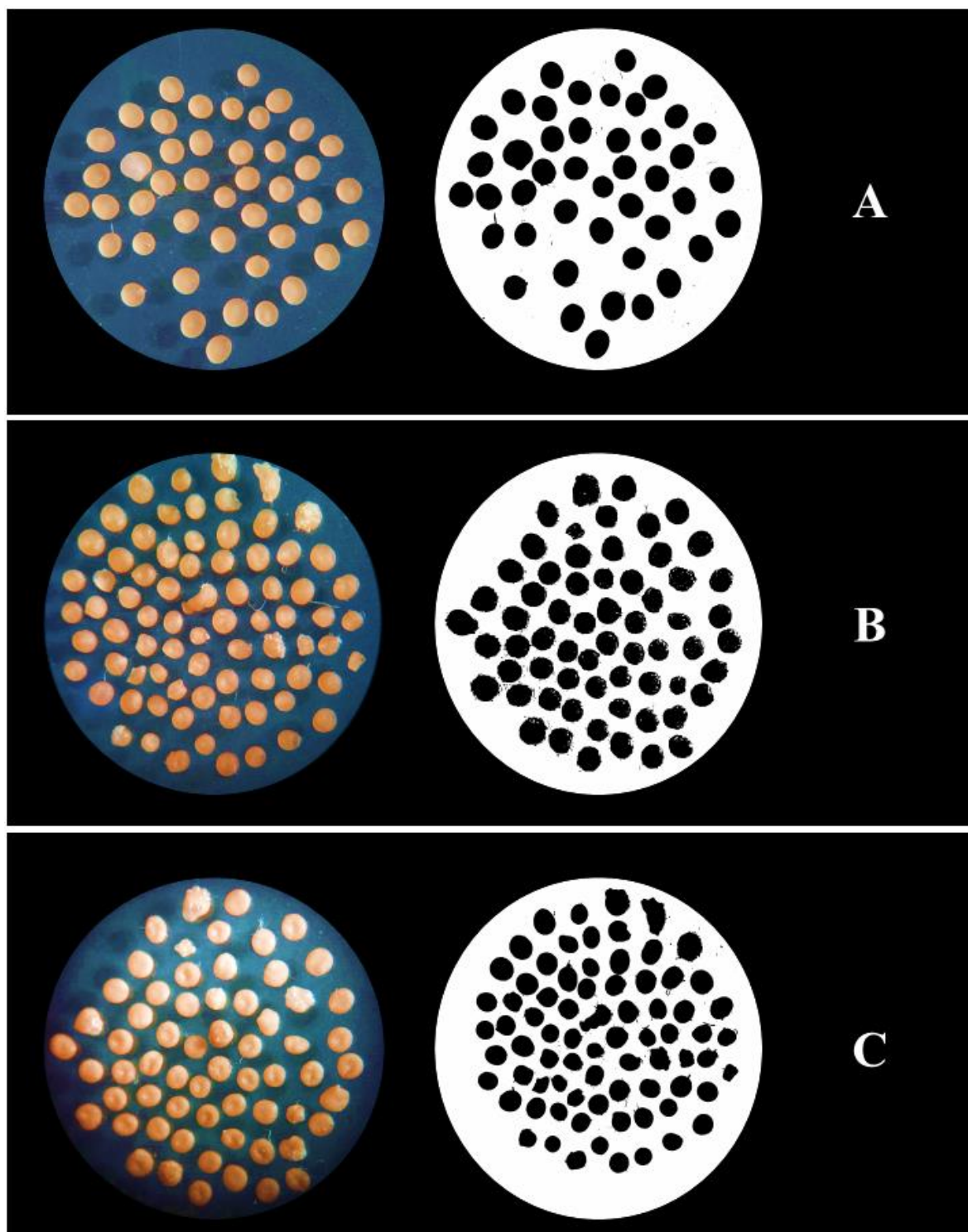
De forma geral, as micropartículas apresentaram diâmetro médio que variou entre 1386 e 1565 μm (**Tabela 3**), sendo maior para a amostra MPs AR/P, expressando diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$). provavelmente devido à ausência de interferentes permitindo que a matriz de AR/P se estruturasse de forma mais coesa e homogênea, permitindo a formação de partículas maiores. A incorporação de NSMs às MPs (MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%) deve ter ocasionado a retração significativa ($p < 0,001$) das estruturas como resultado da interação entre os grupamentos hidroxílicos dos polímeros com os grupamentos silanóis da NSMs.

A partir dos valores de diâmetro, a homogeneidade da distribuição granulométrica pôde ser avaliada quantitativamente pelo cálculo do valor de Span. Considerando que o processo de obtenção das micropartículas é manual, esse parâmetro relaciona-se diretamente a reprodutibilidade da metodologia desenvolvida. Quanto menor o índice Span, menor o fator de dispersão do tamanho das partículas (BONI et al., 2021).

O perfil de distribuição de diâmetro das partículas associado aos valores de Span, que variaram de 0,13 a 0,27, ou seja, inferiores a 0,5 (**Tabela 3**), destacam a homogeneidade de tamanhos dos sistemas obtidos. O índice Span aumenta com a adição de NSMs@5ASA. A formulação MPs AR/P apresenta uma distribuição de tamanho mais uniforme (menor SPAN), enquanto as formulações com NSMs@5ASA mostram uma distribuição mais ampla e heterogênea. Isso indica que a incorporação das nanopartículas contribui para uma maior variabilidade no tamanho das micropartículas, possivelmente devido a interações complexas durante a formação das partículas.

A avaliação da forma das partículas obtidas foi realizada a partir da determinação da circularidade, um fator que indica que a forma se aproxima de um círculo perfeito, quando o valor está próximo à 1,0. A partir dos dados da **Tabela 3**, concluiu-se que todas as MPs apresentaram elevada circularidade, com valores entre 0,76 e 0,84. Essa elevada circularidade foi evidenciada pelas imagens obtidas utilizando estereoscópio (**Figura 14**). A forma das partículas pode afetar sua interação com células e tecidos biológicos, assim como também pode influenciar a liberação de fármacos. Partículas com menor circularidade podem ter taxas de liberação diferentes devido à variação na superfície e na área de contato com o meio de liberação (YOO; DOSHI; MITRAGOTRI, 2011).

Figura 14 - Imagens obtidas por estereoscópio das MPs AR/P (A), MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% (B) e MPs AR/P_NSMs@5ASA1% (C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.3. Avaliação da eficiência de encapsulação das NSMs@5ASA nas micropartículas de AR/P

De acordo com a **Tabela 4** a eficiência de encapsulação (EE%) das NSMs contendo 5ASA nas micropartículas variou de 65 a 66%.

Tabela 4 - Eficiência de encapsulação das NSMs@5ASA nas micropartículas.

Amostra	EE (%) $\pm$ DP
MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5%	65,51 $\pm$ 0,51
MPs AR/P_NSMs@5ASA1%	66,02 $\pm$ 0,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

A utilização de íons cálcio para reticular as micropartículas e encapsular as NSM@5ASA é um fator crucial para a formação de uma matriz polimérica estável, em que os íons cálcio promovem a reticulação das cadeias poliméricas de amido e pectina, criando uma rede tridimensional que aprisiona eficientemente as nanopartículas carregadas com mesalazina. A ligeira diferença na eficiência de encapsulação entre as duas formulações pode ser atribuída à saturação da capacidade de encapsulação da matriz polimérica, indicando que o sistema atinge um limite de incorporação de fármaco, além do qual a eficiência de encapsulação não se altera significativamente ($p > 0,05$) (BONI et al., 2021).

5.3.4. Estudo da superfície das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas

Conforme a **Figura 15**, as análises de MEV-FEG revelaram que as micropartículas sem nanopartículas de NSM@5ASA apresentaram uma superfície rugosa, sem poros, fissuras aparentes e irregular, provavelmente devido à presença de grânulos do amido retrogradado tal como detectada em filmes de amido resistente/pectina desenvolvidos no estudo de Meneguín e colaboradores (2014) (MENEGUÍN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014). A incorporação das nanopartículas (NSMs@5ASA) às micropartículas na concentração de 0,5% e 1% m/v apresentaram também superfície irregular e rupturas, porém com uma estrutura aparentemente mais coesa e densa, evidenciando a influência das nanopartículas na morfologia das micropartículas.

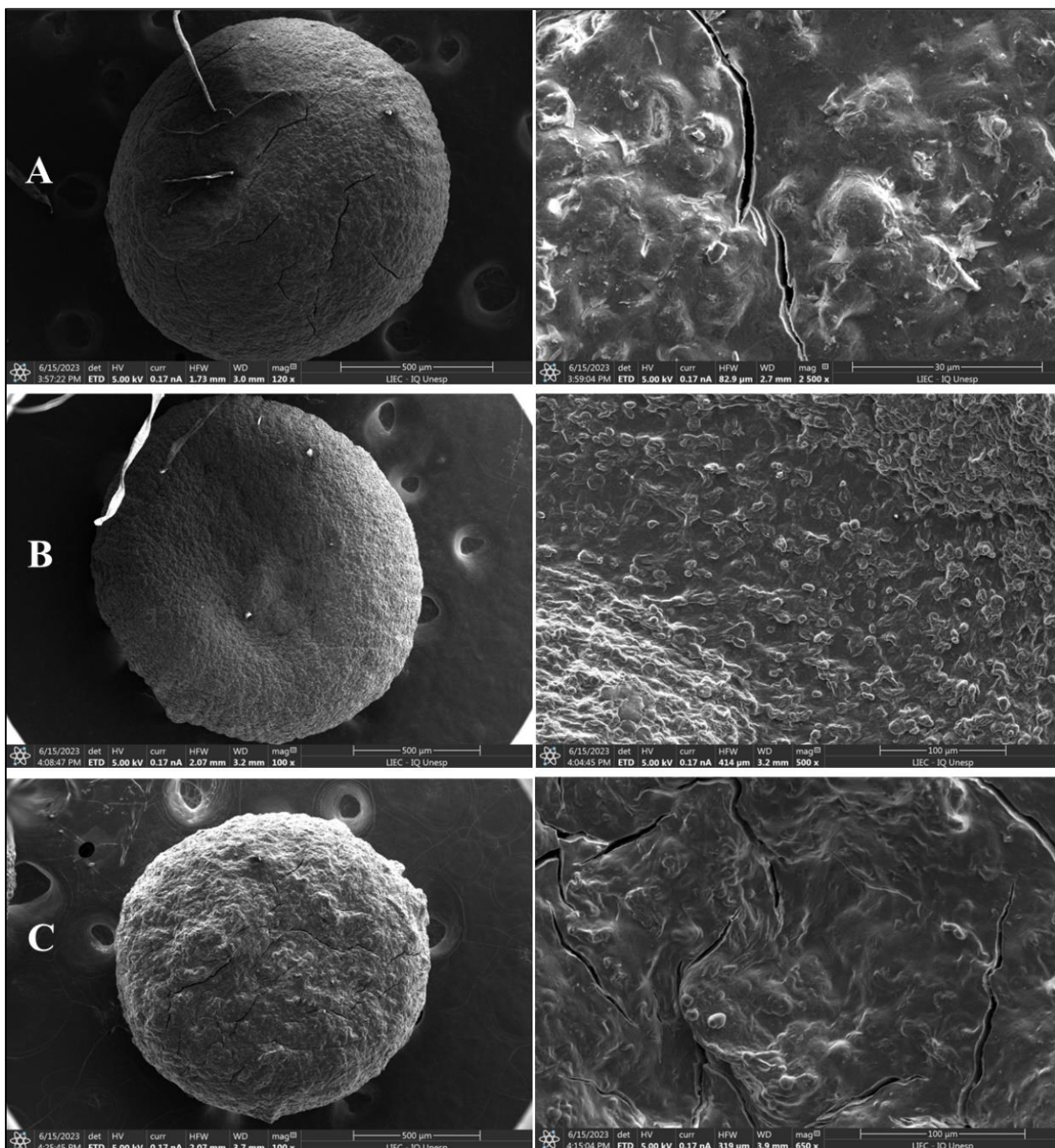
A presença de rupturas nas micropartículas é resultado da formação de uma matriz rígida, a qual durante o processo de secagem, como resultado da retração dessa malha

polimérica, gerou pontos de ruptura, originando as fissuras. Pontos de ruptura e presença de poros devem favorecer a difusão de líquidos do meio para o interior da matriz podendo, consequentemente, acelerar o processo de degradação enzimática, bem como de liberação das NSMs incorporadas (BONI et al., 2021; MENEGUIN et al., 2017, 2021; MENEGUIN; STRINGHETTI FERREIRA CURY; EVANGELISTA, 2014).

É possível observar ainda, que para ambas as amostras, as micropartículas apresentaram formas mais circulares, corroborando com os dados da **Tabela 3**, provavelmente devido à concentração polimérica, e consequentemente a viscosidade da dispersão que não foi alterada após a incorporação dos nanossistemas, o que garante à gota uma maior resistência durante a queda na solução reticulante, resultando em partículas mais circulares. Comportamento semelhante foi relatado por Boni e colaboradores (2021), em estudos com micropartículas de goma gelana/amido retrogradado (BONI et al., 2021).

Esses resultados sugerem que as nanopartículas foram incorporadas nas MPs de AR/P com sucesso, e que a concentração das NSMs interfere na morfologia de superfície. Cabe ressaltar que o revestimento de AR/P pode ser importante para conferir uma maior proteção das nanopartículas através do TGI, quando administradas oralmente.

Figura 15 - Fotomicrografias representativa obtidas por MEV-FEG da superfície das micropartículas sem nanopartículas (A), micropartículas carregadas com NSM@5ASA0,5% (B) e NSM@5ASA1% (C).



Fonte: Elaborada pelo autor

5.3.5. Avaliação do comportamento de degradação enzimática das micropartículas de AR/P contendo NSMs@5ASA frente ao valor de pH e conteúdo enzimático

Como forma de selecionar as micropartículas com atributos mais promissores para os testes *in vitro*, realizou-se o teste de degradação enzimática. Os resultados foram obtidos com micropartículas vazias e carregadas com NSMs@5ASA (**Tabela 5**).

A pepsina tem origem no estômago e sua ativação ocorre por meio da presença de HCl. Já a pancreatina é composta por um conjunto de enzimas como amilase, tripsina, lipase e pancrease, as quais tem a capacidade de digerir proteínas, polipeptídeos e amido (SILVA et al., 2014).

De acordo com os dados da **Tabela 5**, as amostras apresentaram baixa porcentagem de degradação em ambos os meios. Comportamento coerente, já que o processo de retrogradação do amido deve conferir maior resistência à hidrólise enzimática. Possivelmente a utilização do cálcio como agente reticulante para a dispersão AR/P, permitiu a interpenetração física mais eficiente das cadeias poliméricas, formando uma rede mais empacotada e compacta, que impõe maior resistência das enzimas às ligações glicosídicas. Cabe ressaltar que, apesar da média de 40% de digestão das formulações em meio ácido (pepsina), a maior parte dos compostos (cerca de 60%) deve ser digerido pelas enzimas colônicas, indo de encontro ao objetivo desse trabalho

A degradação das micropartículas em meio gástrico simulado (contendo pepsina, pH 1,2) e em meio entérico simulado (contendo pancreatina, pH 6,8) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), indicando que a incorporação das NSMs não influenciou na resistência da malha polimérica ao acesso das enzimas.

Além disso, estudos têm destacado que partículas baseadas em amido retrogradado são um material enriquecido com alto teor de amilose, componente este responsável pela formação de uma matriz amorfa em que os cristalitos permanecem embebidos e, portanto, protegidos da degradação enzimática nas diferentes porções do TGI (RAHMOUNI et al., 2001; TARAZI RIESS; SHANI LEVI; LESMES, 2022; ULBRICH; SCHOLZ; FLÖTER, 2022).

Tabela 5 - Degradação enzimática das micropartículas de AR/P, AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%.

Amostra	HCl pH 1,2 com pepsina	Tampão fosfato pH 6,8 com pancreatina
	Degradação média (%) $\pm$ DP	
MPs AR/P	38,24 $\pm$ 1,18	41,81 $\pm$ 0,41
MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5%	40,9 $\pm$ 0,38	41,62 $\pm$ 1,59
MPs AR/P_NSMs@5ASA1%	42,05 $\pm$ 0,34	41,65 $\pm$ 1,52

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.6. Avaliação da capacidade de absorção de líquidos

A absorção de líquidos é uma característica crucial para sistemas de liberação colônica específicos, como as micropartículas poliméricas, pois influencia diretamente a capacidade do sistema de intumescer, formar géis e aderir à mucosa, além de ser um dos principais mecanismos envolvidos na liberação de sistemas baseados em polissacarídeos. A análise dos resultados em diferentes pHs permite prever como a formulação se comportará no trato gastrointestinal (BAYER, 2022; CARVALHO et al., 2010; SHAIKH et al., 2011).

De acordo com a **Figura 16**, em condições de pH ácido (1.2), as MPs AR/P apresentam um aumento moderado. Isso pode ser atribuído à protonação dos grupos carboxílicos presentes na pectina, que reduz sua interação com as moléculas de água devido à formação de pontes de hidrogênio intramoleculares, limitando a absorção de líquidos. Essa menor capacidade de intumescimento em meio ácido é um importante achado pois indica que as formulações podem evitar a mucoadesão no ambiente estomacal.

A adição de NSMs@5ASA0,5% (MPs AR/p_NSMs@5ASA0,5%) aumenta significativamente ($p < 0,05$) o grau de intumescimento quando comparadas às MPs AR/P. As NSMs possuem alta área superficial e porosidade, que facilitam a captação de água. Aumentar a concentração de NSMs@5ASA para 1% resulta em um aumento adicional no grau de intumescimento, embora não seja proporcionalmente significativo em comparação com a formulação de 0,5% ($p > 0,05$). Este fenômeno sugere que há um limite na capacidade de intumescimento imposto pela matriz polimérica de AR/P e pela saturação dos poros das NSMs.

Em pH 6.8 (**Figura 16**), a capacidade de intumescimento das MPs AR/P é significativamente maior ($p < 0,01$). Em um ambiente mimetizando o colón, a ionização dos grupos carboxílicos para carboxilatos com carga negativa aumenta a repulsão eletrostática entre

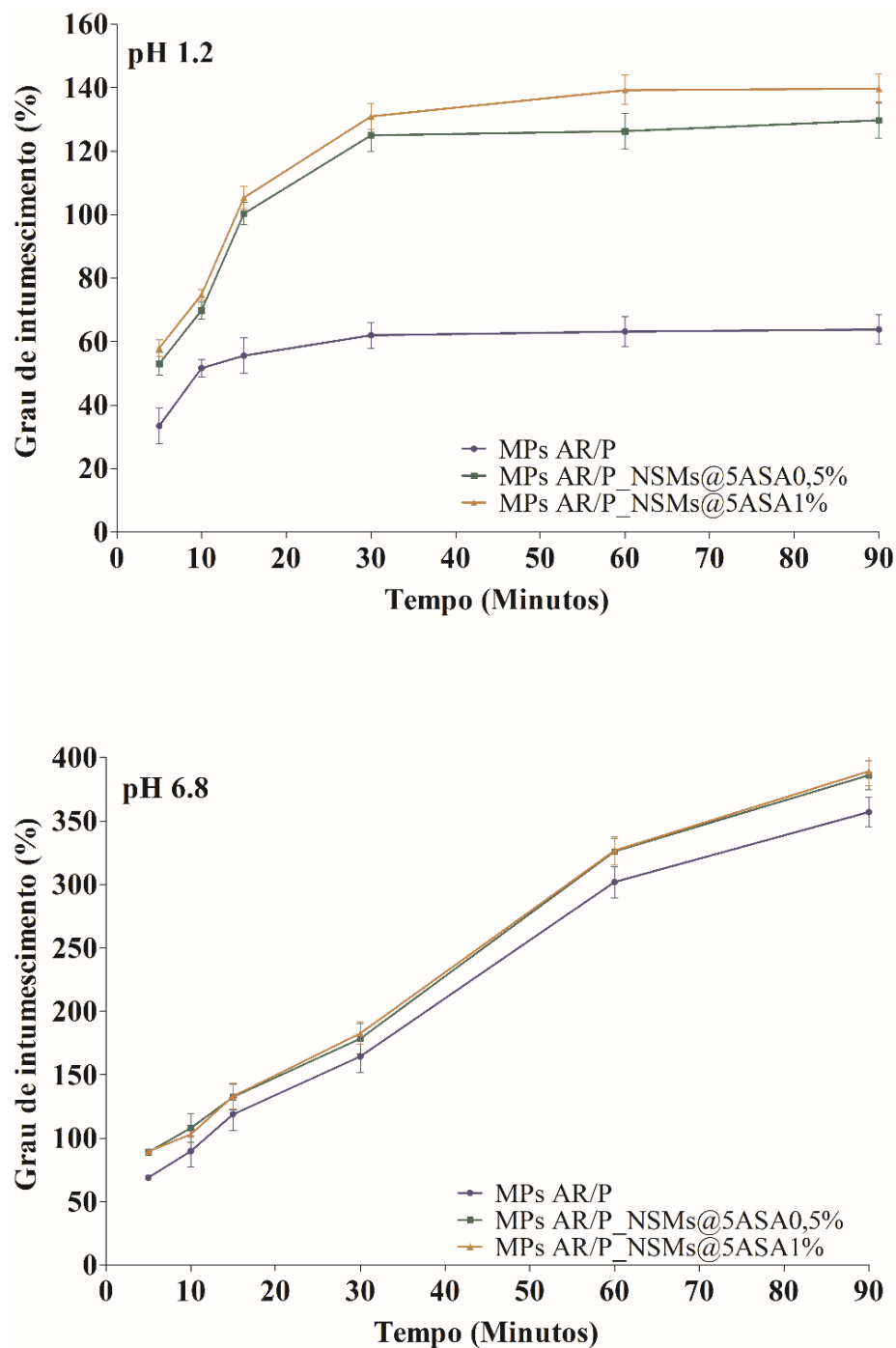
as cadeias poliméricas adjacentes. Essa repulsão causa uma expansão das cadeias poliméricas, resultando em um aumento significativo no volume das partículas. Este comportamento é ideal para a liberação de fármacos no cólon, indicando que as partículas serão altamente hidratadas e, portanto, capazes de aderir efetivamente à mucosa colônica (CARBINATTO et al., 2014; HAN et al., 2022).

A inclusão de NSMs@5ASA à 0,5% ainda aumenta a capacidade de intumescimento, porém não significativo ($p > 0,05$) em pH 6,8, possivelmente devido à já elevada capacidade de absorção da matriz AR/P no meio. A formulação com 1% (MPs AR/p_NSMs@5ASA1%) exibe um leve aumento no grau de intumescimento comparado à formulação com 0,5%. Este resultado sugere que, em pH 6,8, a matriz polimérica de AR/P está perto de sua capacidade máxima de intumescimento, e o aumento adicional de NSMs@5ASA contribui marginalmente ($p > 0,05$). A saturação dos poros das NSM e a alta capacidade de hidratação dos polímeros em pH 6,8 resultam em uma absorção máxima de líquidos.

Além disso, no gráfico referente ao pH 6,8 (**Figura 16**), se nota a tendência que demonstra uma proporcionalidade de intumescimento em função do tempo, revelando um intumescimento mais controlado. Isso sugere que houve a criação de uma camada de gel densa de elevada viscosidade e controladora do intumescimento das formulações neste meio.

No geral, os resultados sugerem que as micropartículas que mostram um menor grau de intumescimento em pH 1,2 indicam que não irão liberar significativamente o fármaco no ambiente estomacal. Isso é vantajoso para uma liberação colón-específica, pois o fármaco será protegido e retido na matriz até alcançar o cólon. Em contrapartida, as micropartículas que exibem um alto grau de intumescimento em pH 6,8 sugerem que irão absorver líquidos e intumescer significativamente ao atingir o cólon. Este comportamento é desejável para a liberação controlada dos fármacos, pois o intumescimento facilita a adesão à mucosa colônica e a formação de um gel que pode liberar o fármaco de maneira controlada.

Figura 16 - Grau de intumescimento (%) das micropartículas de AR/P com em sem NSMs@5asa em HCl (pH 1.2) e tampão fosfato (pH 6.8).



Fonte: Elaborada pelo autor

5.3.7. Avaliação da mucoadesividade *in vitro* em texturômetro

O amido retrogradado e a pectina são amplamente reconhecidos por suas propriedades mucoadesivas, que os tornam materiais promissores para sistemas de liberação controlada de

fármacos. O amido retrogradado exibe uma estrutura ordenada com grupos hidroxila expostos que formam fortes ligações de hidrogênio com a mucina da mucosa gastrointestinal. Esta interação é facilitada pela capacidade do amido de absorver água e intumescer, criando um gel viscoso que adere firmemente às superfícies mucosas. De forma semelhante, a pectina forma géis em ambientes aquosos, especialmente na presença de íons como cálcio, aumentando ainda mais sua capacidade de adesão à mucosa (CARVALHO et al., 2010; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021b; SHARMA et al., 2024).

Conforme apresentado na **Figura 17**, os resultados de mucoadesão das micropartículas de amido retrogradado/pectina (MPs AR/P) em pH 1.2 revelam uma diferença significativa ($p < 0,001$) na força máxima entre as diferentes composições. A formulação MPs AR/P apresentou a maior força de mucoadesão, com um valor de 0,269 N. O resultado pode ser atribuído à natureza hidrofílica e às dos biopolímeros amido retrogradado e pectina, que facilitam a interação com a mucina. Em contraste, a adição de nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs) reduziu drasticamente ($p < 0,001$) a mucoadesão para 0,05484 N. Isso sugere que as NSMs, por si só, não são tão eficazes em interagir com a mucina, possivelmente devido à sua natureza menos hidrofílica ou às diferenças nas propriedades de superfície (MAMAEVA; SAHLGREN; LINDÉN, 2013; SHEN et al., 2017; TRENDAFILOVA et al., 2016; VALLET-REGÍ; BALAS; ARCOS, 2007).

A incorporação de mesalazina (5ASA) nas NSMs apresentou um aumento na mucoadesão em relação às NSMs sem o fármaco, porém não significativo ($p > 0,05$). A formulação MPs AR/P@NSM@5ASA 0,5% apresentaram uma força máxima de 0,08167 N, enquanto a formulação com 1% resultou em um valor de 0,0720 N. Estes resultados indicam que o 5ASA nas concentrações utilizadas em meio com pH de 1,2, não influenciou na melhorar a mucoadesão das nanopartículas, possivelmente não facilitando uma melhor interação com a mucina.

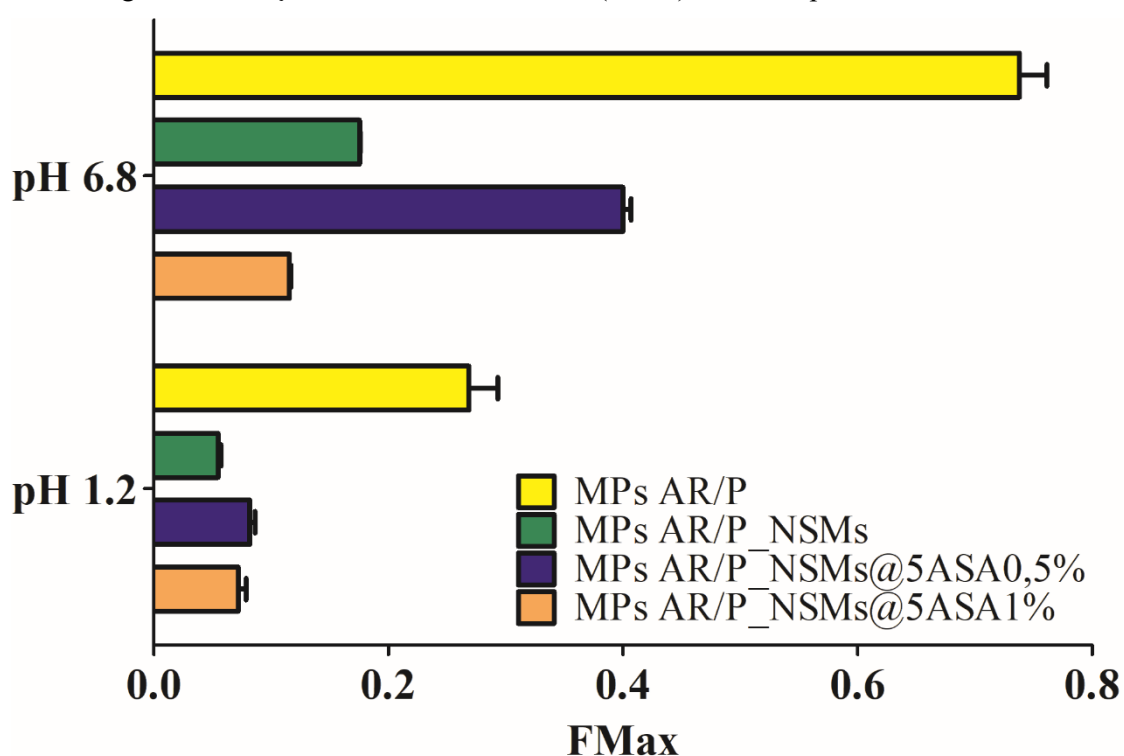
Em pH 6.8 (**Figura 17**), os resultados de mucoadesão mostram uma tendência similar, com a matriz de amido retrogradado/pectina apresentando a maior força máxima (0,7381 N), destacando-se novamente como altamente mucoadesiva. A adição das NSMs reduziu a mucoadesão significativamente ($p < 0,001$) para 0,1753 N, reforçando a observação de que as nanopartículas de sílica, de forma isolada, não conferem uma mucoadesão significativa para o sistema.

A formulação com MPs AR/P@NSM@5ASA 0,5% mostraram uma recuperação parcial na mucoadesão, com uma força máxima de 0,4000 N, quando comparada às NSMs sem fármaco ($p < 0,001$). No entanto, a formulação com 1% apresentou uma mucoadesão ainda

menor (0,1156 N), inferior até a formulação com NSMs sem fármaco ($p < 0,01$). Esses dados sugerem que, enquanto uma concentração moderada de mesalazina pode melhorar a mucoadesão, concentrações mais altas podem ter um efeito contrário, possivelmente devido à saturação da superfície ou à alteração das propriedades físico-químicas das nanopartículas de sílica, resultando em interações menos eficazes com a mucina.

Os dados são consistentemente melhores em pH 6.8 do que em pH 1.2 ($p < 0,001$) para todas as formulações testadas, principalmente para as MPs AR/P@NSM@5ASA 0,5%. Isso sugere que as formulações de micropartículas de amido/pectina, com ou sem nanopartículas de sílica mesoporosa e mesalazina, interagem mais efetivamente com a mucina em um ambiente como o do cólon. Este comportamento é desejável para um sistema específico para o cólon, contribuindo para que a mucoadesão e a liberação do fármaco ocorram no local alvo.

Figura 17 - Força máxima de mucoadesão (FMax) das micropartículas de AR/P.



Fonte: Elaborada pelo autor

5.3.8. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5ASA

Conforme observado na **Figura 18**, em meio ácido (pH 1,2), verifica-se uma rápida liberação do fármaco livre (5ASA), atingindo 100% de liberação em aproximadamente 30 minutos, perfil de comportamento esperado devido à alta solubilidade do fármaco neste meio.

A liberação diferencial de mesalazina a partir de nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs@5ASA) em diferentes pHs pode ser atribuída à variação na solubilidade e na interação do fármaco com a matriz da sílica em ambientes de pH distintos. Em pH 1,2, ambiente ácido, ocorre a protonação dos grupos de superfície das NSMs que pode influenciar ao desmonte das interações de hidrogênio ou eletrostáticas entre a sílica e o fármaco, resultando em uma liberação de apenas 38% em até 60 minutos. Quando o sistema entra em contato com o meio seguinte (pH 7,4), as NSMs promovem uma liberação de até 65% do fármaco ao término de 120 minutos, possivelmente devido à menor protonação das superfícies da sílica e maior difusão do fármaco. No pH 6,8, a interação com a matriz da sílica é minimizada, permitindo um maior controle de liberação ao longo de 5 horas, resultando em uma liberação máxima de 93% ao final dos 450 minutos (MAMAEVA; SAHLGREN; LINDÉN, 2013; MANZANO; VALLET-REGÍ, 2010; SLOWING et al., 2008; VALLET-REGÍ; BALAS; ARCOS, 2007). Esses resultados indicam que a liberação do 5ASA carregada em NSMs é altamente dependente do pH.

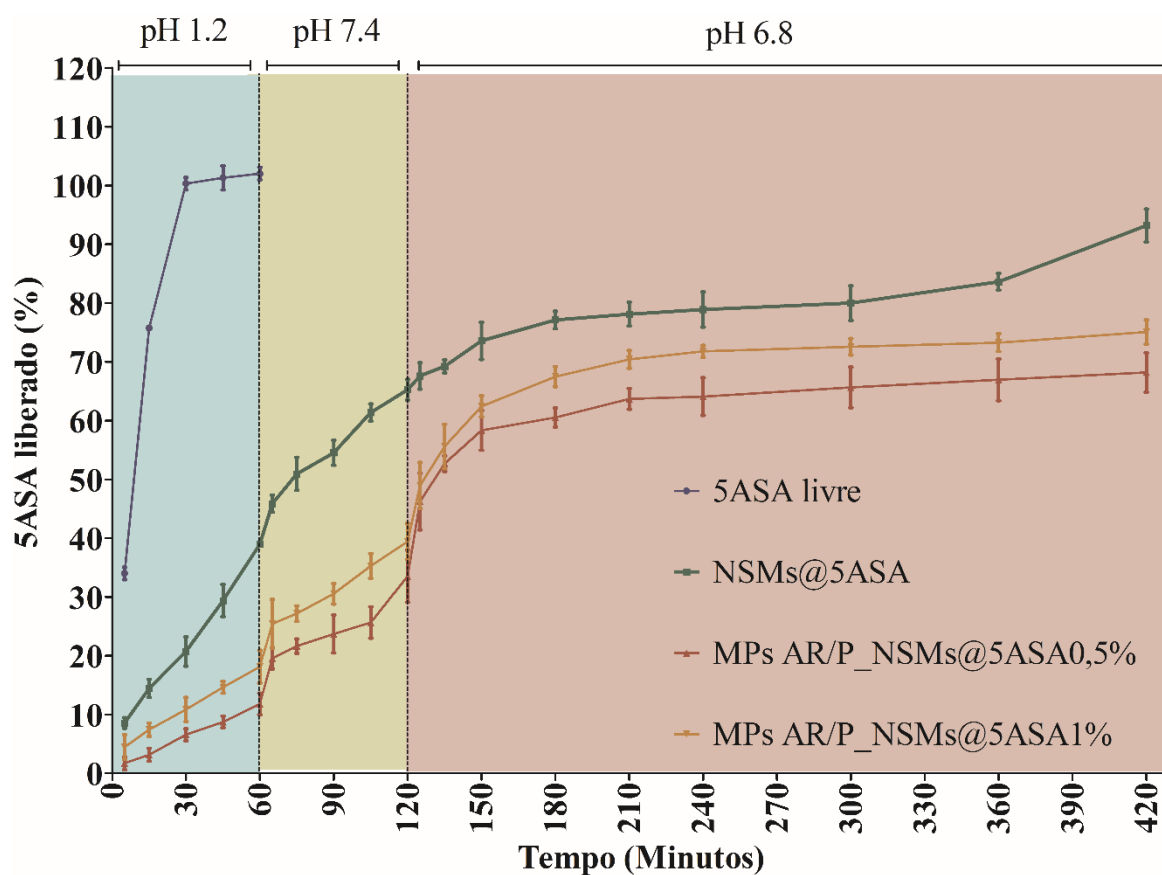
Como observado anteriormente, a dispersão de AR/P é um candidato importante para a liberação cólon-específica de fármacos (GOVINDARAJU et al., 2021; MENEGUIN et al., 2021; SINTOV; YARIV, 2022; WANG et al., 2015). Para as MPs (MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%), os resultados foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) daqueles observados para as NSMs@5ASA e fármaco livre. Entre as micropartículas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no perfil de liberação observado. Entretanto, durante todo ensaio em meio ácido (pH 1,2) verificou-se que as taxas de liberação do 5ASA a partir das micropartículas foi significativamente reduzida ($p < 0,001$) em relação as nanopartículas e fármaco livre, com valores de redução de 11,18-18,12 %.

Adicionalmente, os percentuais de liberação de 5ASA das micropartículas de AR/P foram inferiores a 40% após 120 minutos em pH 7,4, um perfil semelhante quando comparado ao meio ácido (pH 1,2) e significativamente reduzido ($p < 0,001$) em relação as NSMs@5ASA. Observou-se também que as micropartículas tiveram um efeito *burst* de liberação quando o pH do meio alterou para 6,8, seguidos por um platô até o final do tempo de análise. Tal comportamento destaca não apenas a liberação dependente do pH de AR/P, mas também indica a afinidade desse tipo de polímero pelo ambiente cólon. Assim, as amostras desenvolvidas

podem ser consideradas eficazes, pois permitem que aproximadamente 60 a 66% da carga de fármaco adicionada ao sistema seja totalmente direcionada ao cólon, diferentemente das NSMs@5ASA que permitiu apenas 34,75% ($p < 0,001$). Desta maneira, é possível inferir que as micropartículas foram capazes de alterar o perfil de liberação do 5ASA.

As MPs carregadas com NSM@5ASA, apresentaram um perfil de liberação controlado, com taxas muito inferiores às nanopartículas e do fármaco livre. Esse comportamento também mostra a capacidade das MPs em controlar as taxas de liberação do fármaco também em pH 6,8, ou seja, em meio colônico.

Figura 18 - Perfil de liberação *in vitro* do 5ASA livre e associada à NSMs e incorporadas em MPs de AR/P em meios com diferentes valores de pHs, mimetizando as fases gástrica (0–60 min; pH 1,2), duodenal (60–120 min; pH 4,5) e colônica (120–420 min; pH 6,8). Cada valor representa o desvio padrão médio, $n = 3$.



Fonte: Elaborada pelo autor

5.3.9. Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

Foram testados os modelos matemáticos de liberação de: Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Primeira ordem, Higuchi e Weibull. A aplicação desses modelos é interessante para avaliar o mecanismo de liberação de cada sistema desenvolvido.

A partir dos valores dos coeficientes de determinação (r^2) apresentados na **Tabela 6**, o modelo matemático que melhor se correlacionou com os dados de liberação das NSMs@5ASA foi o modelo de Primeira Ordem e Weibull (0,9587 e 0,9707, respectivamente). O modelo de primeira ordem analisa a liberação de compostos bioativos que são solúveis em água e estão incorporados em matrizes porosas. Neste caso, a taxa de liberação da molécula está relacionada à sua concentração no interior da matriz. O modelo de Weibull relaciona exponencialmente a fração de fármaco liberado em função do tempo, e de acordo com o valor do parâmetro b , o mecanismo envolvido na liberação do fármaco pode ser classificado como difusão Fickiana ($b \leq 0,75$), difusão não-Fickiana associada ao Caso II ($0,75 < b < 1$) e um mecanismo de liberação complexo ($b > 1$). Em relação as nanopartículas, o valor de b foi igual a 0,7325 se enquadrando como difusão Fickiana. Nesse processo, a taxa de liberação do fármaco é diretamente proporcional ao gradiente de concentração do fármaco na matriz, sendo controlada pela difusão através da matriz porosa. Em suma a liberação é predominantemente governada pela difusão molecular simples do fármaco pelos poros da matriz (AGUZZI et al., 2010; DASH et al., 2010; TRUCILLO, 2022).

Para as amostras MPs AR/P_NSMs@5ASA0,5% e AR/P_NSMs@5ASA1%, o modelo de Primeira Ordem apresenta valores de r^2 igual a 0,9007 e 0,9228, respectivamente. As amostras contendo NSMs@5ASA1% correlacionaram-se melhor com o modelo Weibull ($r^2 = 0,9228$) apresentando $b = 0,8413$, indicativo de difusão não-Fickiana associada ao Caso II, em que o mecanismo dominante para o transporte de fármacos é devido ao relaxamento da matriz polimérica. No entanto, foi interessante notar que as amostras contendo NSMs@5ASA0,5% se correlacionaram com o modelo de Hixson-Crowell ($r^2 = 0,9881$), modelo este aplicado para caracterizar a liberação de fármacos em sistemas nos quais a taxa de liberação é regulada pela dissolução da superfície das partículas, diminuindo proporcionalmente ao tempo. Esse modelo assume que, durante o processo de dissolução, a forma das partículas permanece constante, enquanto seu tamanho diminui progressivamente. A adequação da micropartícula contendo NSMs@5ASA0,5% ao modelo de Hixson-Crowell indica que a liberação do fármaco é predominantemente governada pela erosão superficial das micropartículas. Isso pode ser atribuído ao fato de que a menor concentração de mesalazina cria uma matriz em que a

dissolução da superfície é o principal mecanismo de liberação (AGUZZI et al., 2010; DASH et al., 2010; MENEGUIN et al., 2021; TRUCILLO, 2022).

Uma mudança no mecanismo de liberação do 5ASA entre os sistemas nano-in-micro sugere que as diferentes concentrações de NSMs@5ASA podem resultar em diferentes interações entre o fármaco e a matriz da micropartícula, como a formação de aglomerados ou diferentes padrões de porosidade, assim como modificar as propriedades físico-químicas da matriz, como a solubilidade, a difusão e a taxa de erosão, influenciando a cinética de liberação.

Tabela 6 - Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Primeira Ordem, Higuchi e Weibull) de liberação do fármaco 5ASA.

Modelos matemáticos		Amostra		
		NSMs@5ASA	MPs AR/P_NSMs @5ASA0,5%	MPs AR/P_NSMs @5ASA1%
Baker-Lonsdale	<i>k</i>	0,0007	0,0003	0,0004
	<i>r</i> ²	0,9375	0,7861	0,839
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i>	7,7436	1,6215	2,4904
	<i>r</i> ²	0,9161	0,8522	0,8851
	<i>n</i>	0,4228	0,6496	0,5917
Hixson-Crowell	<i>k</i>	0,0023	0,0043	0,0014
	<i>r</i> ²	0,9063	0,9881	0,9113
Higuchi	<i>k</i>	5,1612	7,1114	4,0439
	<i>r</i> ²	0,895	0,862	0,869
Primeira Ordem	<i>k</i>	0,0083	0,0039	0,0048
	<i>r</i> ²	0,9587	0,9007	0,9366
Weibull	<i>b</i>	0,7325	1,0305	0,8413
	<i>r</i> ²	0,9707	0,8922	0,9228

Fonte: Elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido para quantificação de mesalazina por espectrofotometria no UV foi adequado, apresentando todos os parâmetros dentro do preconizado.

O desenvolvimento das nanopartículas de sílica mesoporosas pela metodologia de microemulsão direta (água/óleo) permitiu a formação de partículas esféricas, nanométricas, com distribuição tamanho homogênea tamanho e porosas, além do potencial zeta positivo, destacando características favoráveis para a estabilidade do sistema. A eficiência de encapsulação do 5ASA nestas nanopartículas foi maior que 90%.

Adicionalmente, por DSC e TGA foi possível sugerir a incorporação do fármaco nos mesoporos, os quais protegem o fármaco da degradação. Esses achados tornam as NSMs um nanocarreador promissor para incorporação de 5ASA, a fim de contornar as limitações do uso desse fármaco em terapia.

Todas as amostras (NSMs e NSMs@5ASA) testadas mantiveram 100% de viabilidade celular, indicando alta biocompatibilidade, encorajando investigações futuras para explorar a eficácia terapêutica das nanopartículas em modelos animais e, eventualmente, em ensaios clínicos.

Além disso, a obtenção das micropartículas carregadas com NSM@5ASA usando o método de reticulação iônica com Ca^{2+} permitiu a formação de micropartículas com excelentes características estruturais e morfológicas.

A eficiência da encapsulação das NSMs@5ASA em micropartículas de amido resistente/pectina foi maior que 60%. As micropartículas apresentaram baixa porcentagem de degradação enzimática em meio gástrico simulado (contendo pepsina, pH 1,2), indicando resistência do sistema nano-em-micro à hidrólise enzimática. O encapsulamento das NSMs@5ASA nas micropartículas poderia não apenas evitar que as nanopartículas resistssem ao ambiente gástrico, mas também evitar potenciais efeitos colaterais sistêmicos pela via oral.

Quanto à mucoadesão, os resultados mostram que a matriz de amido/pectina é altamente mucoadesiva em pH 6,8, mas essa propriedade é reduzida ou aumentada pela adição de NSMs@5ASA. A incorporação de mesalazina nas nanopartículas melhora a mucoadesão, mas há um limite na eficácia com o aumento da concentração do fármaco.

Os resultados demonstraram que as micropartículas de amido/pectina possuem uma capacidade de intumescimento significativamente maior em pH 6.8 do que em pH 1.2. A adição de nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com mesalazina melhora a capacidade de intumescimento em ambos os pHs, Estes achados são relevantes para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos direcionados ao cólon, em que um alto grau de

intumescimento em pH 6.8 sugere uma boa retenção e liberação prolongada do fármaco na mucosa colônica.

Quanto aos mecanismos de liberação de 5ASA, para a micropartícula com NSMs@5ASA0,5%, a liberação pode ser dominada por um mecanismo simples de erosão superficial, que é adequadamente descrito pelo modelo de Hixson-Crowell. Em contraste, a micropartícula com NSMs@5ASA1% pode apresentar um mecanismo de liberação mais complexo que envolve múltiplos processos simultâneos, adequadamente capturados pelo modelo de Weibull.

Baseado no conjunto de dados, as micropartículas de amido retrogradado/pectina são promissoras para o direcionamento de nanopartículas de sílica mesoporosas carregadas com mesalazina ao cólon pela via oral e os resultados deste estudo devem contribuir para os avanços nos estudos sobre alternativas de tratamento de doenças intestinais inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELRAHMAN, A. A. et al. Ketoprofen mesoporous silica nanoparticles SBA-15 hard gelatin capsules: preparation and in vitro/in vivo characterization. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3387–3398, 2016.
- AGÜERO, L. et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, jul. 2017.
- AGUZZI, C. et al. Mathematical models describing drug release from biopolymeric delivery systems. **Materials Technology**, v. 25, n. 3–4, p. 205–211, 2010.
- AGUZZI, C. et al. Assesment of anti-inflammatory properties of microspheres prepared with chitosan and 5-amino salicylic acid over inflamed Caco-2 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 638–644, 2011.
- AMIRY, F.; SAZEGAR, M. R.; MAHMOUDI, A. Smart polymeric nanocomposite based on protonated aluminosilicate, curcumin, and chitosan for mesalamine drug delivery as an anti-inflammatory nanocarrier. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 330, n. September 2021, p. 111533, 2022.
- APARICIO-SAGUILÁN, A. et al. Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 175–181, 2007.
- ARP, C. G.; CORREA, M. J.; FERRERO, C. Production and Characterization of Type III Resistant Starch from Native Wheat Starch Using Thermal and Enzymatic Modifications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 7, p. 1181–1192, 2020.
- BAYER, I. S. Recent Advances in Mucoadhesive Interface Materials, Mucoadhesion Characterization, and Technologies. **Advanced Materials Interfaces**, v. 9, n. 18, 2022.
- BERENDS, S. E. et al. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in the Treatment of Ulcerative Colitis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 58, n. 1, p. 15–37, 2019.
- BERTOFT, E. Understanding starch structure: Recent progress. **Agronomy**, v. 7, n. 3, 2017.
- BONI, F. I. et al. Ionic cross-linking as a strategy to modulate the properties of oral mucoadhesive microparticles based on polysaccharide blends. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, 2021.
- CAMPREGHER, C.; GASCHE, C. Aminosalicylates. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 4–5, p. 535–546, ago. 2011.
- CAPRILLI, R. et al. The long journey of salicylates in ulcerative colitis: The past and the future. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 3, n. 3, p. 149–156, set. 2009.
- CARBINATTO, F. M. et al. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.
- CARBINATTO, F. M. et al. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27–34, 2014.
- CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CARVALHO, G. C. et al. Lycopene, Mesoporous Silica Nanoparticles and Their Association: A Possible Alternative against Vulvovaginal Candidiasis? **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8558, 5 dez. 2022.

CARVALHO, G. C.; MARENA, G. D.; SÁBIO, R. M. Physicochemical characterization of a lycopene-loaded mesoporous silica nanoparticle formulation. **Research Square**, 2023.

CARVALHO, S. G. et al. Chitosan surface modification modulates the mucoadhesive, permeation and anti-angiogenic properties of gellan gum/bevacizumab nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 263, n. February, 2024.

CHUNG, H. J.; LIM, H. S.; LIM, S. T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 3, p. 353–359, 2006.

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

COTTONE, M. et al. Is 5-ASA Still the Treatment of Choice for Ulcerative Colitis? **Current Drug Targets**, v. 12, n. 10, p. 1396–1405, 2011.

COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. **Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. Advanced Drug Delivery Reviews**, 1993.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. Insights into the impact of cross-linking processes on physicochemical characteristics and mucoadhesive potential of gellan gum/retrograded starch microparticles as a platform for colonic drug release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. September 2019, 2020.

DONA, A. C. et al. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 599–617, 2010.

DOS SANTOS, A. M. et al. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 334, n. January, p. 353–366, 2021a.

DOS SANTOS, A. M. 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, n. December 2020, p. 371–378, 2021b.

DU, L.; HA, C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 49, n. 4, p. 643–654, 2020.

DUMITRU, M. V. et al. Organically modified montmorillonite as pH versatile carriers for delivery of 5-aminosalicylic acid. **Applied Clay Science**, v. 218, n. January, 2022.

ESPINOSA-SOLIS, V. et al. Physicochemical characterization of resistant starch type-iii (Rs3) obtained by autoclaving malanga (*xanthosoma sagittifolium*) flour and corn starch. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 1–13, 2021.

FLYNN, S.; EISENSTEIN, S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. **Surgical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1051–1062, 2019.

FRANZOSA, E. A. et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 293–305, 2019.

GISBERT, J. P. et al. Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: A systematic review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 3, p. 471–488, 2002.

GOVINDARAJU, I. et al. Structure and Morphological Properties of Starch Macromolecule Using Biophysical Techniques. **Starch/Staerke**, v. 73, n. 1–2, p. 1–12, 2021.

GÜNTHER, E. A. et al. Preparation and release characteristics of mesalazine loaded calcium pectin-silica gel beads based on callus cultures pectins for colon-targeted drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2225–2233, dez. 2018.

HAN, S. S. et al. Pectin Based Hydrogels for Drug Delivery Applications: A Mini Review. **Gels**, v. 8, n. 12, 2022.

HEIKKILÄ, T. et al. Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 483–494, 2010.

HOU, J. et al. Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, n. January, p. 319–328, 2018.

HU, D. et al. A novel preparation method for 5-aminosalicylic acid loaded eudragit S100 nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6454–6468, 2012.

HU, H. et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with fluorescent and MRI reporters for the visualization of murine tumors overexpressing $\alpha\beta 3$ receptors. **Nanoscale**, v. 8, n. 13, p. 7094–7104, 2016.

HUA, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. April, p. 1–22, abr. 2020.

ICH EXPERT WORKING GROUP. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Disponível em:

<https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products>. Acesso em: 20 nov. 2023.

IRANPOUR, S. et al. Application of smart nanoparticles as a potential platform for effective colorectal cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 442, p. 213949, 2021.

JABARIYAN, S.; ZANJANCHI, M. A. A simple and fast sonication procedure to remove surfactant templates from mesoporous MCM-41. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 1087–1093, 2012.

JACOBASCH, G. et al. Hydrothermal treatment of Novelose 330 results in high yield of resistant starch type 3 with beneficial prebiotic properties and decreased secondary bile acid formation in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1063–1074, 2006.

JAMES, A. E.; DRISKELL, J. D. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1212–1218, 2013.

JEONG, O.; SHIN, M. Preparation and stability of resistant starch nanoparticles, using acid hydrolysis and cross-linking of waxy rice starch. **Food Chemistry**, v. 256, n. February, p. 77–84, 2018.

JIANG, X. E. et al. Effects of mesalazine combined with bifid triple viable on intestinal flora, immunoglobulin and levels of cal, MMP-9, and MPO in feces of patients with ulcerative colitis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 935–942, 2020.

KAASALAINEN, M. et al. Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, 2017.

KÁLLAI-SZABÓ, N. et al. Microparticles and multi-unit systems for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 194, n. January, 2024.

KUANG, Y. et al. Polysaccharide/mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery systems: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, n. PA, p. 457–473, 2021.

LABELLE, M. A. et al. Anionic and Ampholytic High-Amylose Starch Derivatives as Excipients for Pharmaceutical and Biopharmaceutical Applications: Structure-Properties Correlations. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, 2023.

LEE, C. S.; HWANG, H. S. Starch-Based Hydrogels as a Drug Delivery System in Biomedical Applications. **Gels**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2023.

LEMMENS, B. et al. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 6, p. 1194–1201, 2013.

LENGYEL, M. et al. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 2019.

LUNGARE, S.; HALLAM, K.; BADHAN, R. K. S. Phytochemical-loaded mesoporous silica nanoparticles for nose-to-brain olfactory drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 280–293, 2016.

MAJUMDAR, S. Fabrication , Design and In-vivo investigation of Mesoporous Silica Based Docetaxel Trihydrate Nanoparticles for Colonic Drug Delivery. 2023.

MALEQUE, M. et al. Development and validation of a simple UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin both in bulk and marketed dosage formulations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 6, p. 454–457, 2012.

MAMAEVA, V.; SAHLGREN, C.; LINDÉN, M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 5, p. 689–702,

2013.

MANZANO, M.; VALLET-REGÍ, M. New developments in ordered mesoporous materials for drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 27, p. 5593–5604, 2010.

MATURI, F. E. et al. Luminescent mesoporous silica nanohybrid based on drug derivative terbium complex. **Materials**, v. 16, n. 6, 2019.

MEHMOOD, Y. et al. Facile synthesis of mesoporous silica nanoparticles using modified sol-gel method: Optimization and in vitro cytotoxicity studies. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 32, n. 4, p. 1805–1812, 2019.

MENEGUIN, A. B. **Micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina como estratégia para administração oral de insulina**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.

MENEGUIN, A. B. et al. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1013–1023, 2017.

MENEGUIN, A. B. et al. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 123, n. November 2017, p. 84–94, 2018.

MENEGUIN, A. B. et al. Cellulose nanofibers improve the performance of retrograded starch/pectin microparticles for colon-specific delivery of 5-ASA. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, 2021.

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

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MÖLLER, K.; BEIN, T. Talented mesoporous silica nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 29, n. 1, p. 371–388, 2017.

MORITZ, M.; GESZKE-MORITZ, M. Mesoporous Materials as Elements of Modern Drug Delivery Systems for Anti-Inflammatory Agents: A Review of Recent Achievements. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, 2022.

MOURA, R. M. et al. Antioxidant effect of mesalazine in the experimental colitis model induced by acetic acid. **Journal of Coloproctology**, v. 36, n. 3, p. 139–148, jul. 2016.

NAKAGAWA, S. et al. Treatment adherence in patients with ulcerative colitis is dependent on the formulation of 5-aminosalicylic acid. **Digestion**, v. 99, n. 2, p. 133–139, 2019.

NANDIYANTO, A. B. D. et al. Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 120, n. 3, p. 447–453, 2009.

NASSAR, M. Y. et al. Structure investigation of mesalazine drug using thermal analyses,

mass spectrometry, DFT calculations, and NBO analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, n. 1, p. 463–471, 2014.

NIDHI et al. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 458–472, jul. 2016.

PALMA, E. et al. Improvement of the therapeutic treatment of inflammatory bowel diseases following rectal administration of mesalazine-loaded chitosan microparticles vs Asamax ®. **Carbohydrate Polymers**, v. 212, n. July 2018, p. 430–438, 2019.

POPOVA, M. et al. New method for preparation of delivery systems of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 198, p. 247–255, 2014.

POPOVA, M. et al. Polymer-coated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of the prodrug sulfasalazine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, n. January, p. 415–420, 2018.

QIN, W. et al. Structural characterization and physicochemical properties of arrowhead resistant starch prepared by different methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 96–105, 2020.

QUADRADO, R. F. N.; FAJARDO, A. R. Microparticles based on carboxymethyl starch/chitosan polyelectrolyte complex as vehicles for drug delivery systems. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 2183–2194, 2020.

RAHMOUNI, M. et al. Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on in vitro release of sodium diclofenac. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, n. 3, p. 191–198, 2001.

RASHIDI, L. et al. A cellular uptake and cytotoxicity properties study of gallic acid-loaded mesoporous silica nanoparticles on Caco-2 cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 3, 2014.

REHMAN, F. et al. Preparation and characterization of glycidyl methacrylate organo bridges grafted mesoporous silica SBA-15 as ibuprofen and mesalamine carrier for controlled release. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 970–979, 2016.

RIAZI, H. et al. Preparation and Characterization of the Myricetin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticle Surface Decorated with Polydopamine and Evaluation of Its Anti-cancer and Anti-oxidant Activities In Vitro. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, n. 9, p. 4033–4043, 2023.

RIBEIRO, T. DE C. et al. Curcumin-Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles Dispersed in Thermo-Responsive Hydrogel as Potential Alzheimer Disease Therapy. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, 2022.

ROCHA, V. S. et al. Panorama epidemiológico de internações por doença inflamatória intestinal no Brasil por região e unidades federativas, entre os anos de 2018 e 2022. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 5407–5431, 2024.

SÁBIO, R. M. et al. Luminescent multifunctional hybrids obtained by grafting of ruthenium complexes on mesoporous silica. **Materials Letters**, v. 174, p. 1–5, 2016.

- SÁBIO, R. M. et al. New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, p. 379–409, jun. 2019.
- SÁBIO, R. M. et al. Luminescent nanohybrids based on silica and silylated Ru(II) - Yb(III) heterobinuclear complex: New tools for biological media analysis. **Nanotechnology**, v. 31, n. 8, 2020a.
- SÁBIO, R. M. et al. Near-infrared/visible-emitting nanosilica modified with silylated Ru(II) and Ln(III) complexes. **Nanotechnology**, v. 31, n. 3, p. 035602, 17 jan. 2020b.
- SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 44, n. 4, p. 673–692, 2017.
- SCHNUR, S. et al. Inflammatory bowel disease addressed by Caco-2 and monocyte-derived macrophages: an opportunity for an in vitro drug screening assay. **In vitro models**, v. 1, n. 4–5, p. 365–383, 2022.
- SEHGAL, P. et al. Systematic review: safety of mesalazine in ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 12, p. 1597–1609, 2018.
- SELVARATNAM, S. et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in South America: A systematic review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 47, p. 6866–6875, 21 dez. 2019.
- SEYEDIAN, S. S.; NOKHOSTIN, F.; MALAMIR, M. D. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. **Journal of medicine and life**, v. 12, n. 2, p. 113–122, 2019.
- SHAHDADI SARDO, H. et al. A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 558, n. November 2018, p. 367–379, 2019.
- SHAIKH, R. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89–100, 2011.
- SHARMA, R. et al. Recent advances in biopolymer-based mucoadhesive drug delivery systems for oral application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, n. November 2023, p. 105227, 2024.
- SHAWKY, S. M. et al. Efficient Loading and Encapsulation of Anti-Tuberculosis Drugs using Multifunctional Mesoporous Silicate Nanoparticles. **Journal of Nanosciences: Current Research**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2016.
- SHEN, S. C. et al. **Mesoporous materials and technologies for development of oral medicine**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2003.
- SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 116–145, 2014.
- SINTOV, A. C.; YARIV, D. A New Nanoparticulate System Based on Divanillin-Crosslinked

Starch: Mode of Manufacturing and In-Vitro Evaluation of Skin Penetration. **Starch/Staerke**, v. 74, n. 1–2, p. 1–8, 2022.

SLOWING, I. I. et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1278–1288, 2008.

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, n. 03, p. 361–369, 2014.

SOARES, G. A. et al. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135–142, 2013.

SON, M. J.; LEE, S. W. Antibacterial toxicity of mesoporous silica nanoparticles with functional decoration of specific organic moieties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 630, n. June, p. 127612, 2021.

TANG, H. et al. 5-ASA-loaded SiO₂ nanoparticles-a novel drug delivery system targeting therapy on ulcerative colitis in mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 3, p. 1117–1122, mar. 2017.

TARAZI RIESS, H.; SHANI LEVI, C.; LESMES, U. Inclusion of phenolic bioactives in high amylose corn starch for gastro-intestinal delivery. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. August, p. 1–11, 2022.

TAVARES JUNIOR, A. G. et al. Characteristics, Properties and Analytical/Bioanalytical Methods of 5-Aminosalicylic Acid: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 1 dez. 2020.

THANANUKUL, K. et al. Smart gating porous particles as new carriers for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 174, p. 425–446, 2021.

TINDALL, W. N. New approaches to adherence issues when dosing oral aminosaliclates in ulcerative colitis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 5, p. 451–457, 2009.

TOLLEMETO, M. et al. Mucoadhesive Dendrons Conjugated to Mesoporous Silica Nanoparticles as a Drug Delivery Approach for Orally Administered Biopharmaceuticals. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2023.

TORRES, J. et al. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1741–1755, 2017.

TRENDAFILOVA, I. et al. A pH dependent delivery of mesalazine from polymer coated and drug-loaded SBA-16 systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 75–81, 2016.

TRUCILLO, P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release. **Processes**, v. 10, n. 6, 2022.

ULBRICH, M.; SCHOLZ, F.; FLÖTER, E. Chromatographic Study of High Amylose Corn Starch Genotypes – Investigation of Molecular Properties after Specific Enzymatic Digestion. **Starch/Staerke**, v. 74, n. 7–8, p. 1–13, 2022.

- UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1756–1770, 2017.
- VALLET-REGÍ, M. et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: Current insights. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1–19, 2018.
- VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; ARCOS, D. Mesoporous materials for drug delivery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 40, p. 7548–7558, 2007.
- VARUM, F. et al. OPTICORE™, an innovative and accurate colonic targeting technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 583, n. April, p. 119372, 2020.
- VELOSO, P. M.; MACHADO, R.; NOBRE, C. Mesalazine and inflammatory bowel disease – From well-established therapies to progress beyond the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 167, n. July, p. 89–103, 2021.
- VINDIGNI, S. M. et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: A tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 9, n. 4, p. 606–625, 2016.
- WANG, B. et al. Poly(amidoamine)-modified mesoporous silica nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for potential bladder cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 189, n. January, p. 110832, 2020.
- WANG, J. et al. Recent advances in porous nanostructures for cancer theranostics. **Nano Today**, v. 38, p. 101146, 2021.
- WANG, S. et al. Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 568–585, 2015.
- WANG, S.; COPELAND, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: A review. **Food and Function**, v. 4, n. 11, p. 1564–1580, 2013.
- WATERMANN, A.; BRIEGER, J. Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery vehicles in cancer. **Nanomaterials**, v. 7, n. 7, 2017.
- WAYS, T. M. M. et al. Silica nanoparticles in transmucosal drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 1–25, 2020.
- YIPEL, M. et al. The protective effect of Boswellic acid and Ellagic acid loaded, colon targeted, and pH-sensitive N-succinyl chitosan in ulcerative colitis rat model. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 68, n. August 2021, 2022.
- YOO, J. W.; DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S. Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 14–15, p. 1247–1256, 2011.
- YOUNIS, N.; ZARIF, R.; MAHFOUZ, R. Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 3053–3063, 2020.
- ZHANG, H.; JIN, Z. Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1610–1614, 2011.
- ZHANG, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles for increasing the oral bioavailability and

permeation of poorly water soluble drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 3, p. 505–513, 2012.

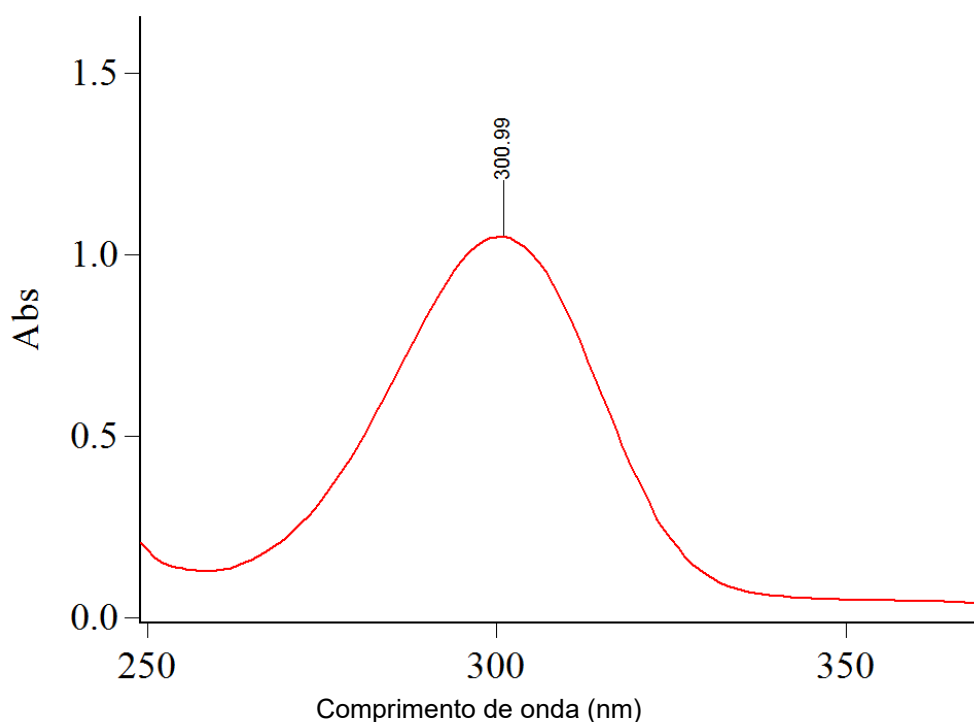
ZHOU, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 165–177, 2018.

APÊNDICE A - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de 5ASA por espectrofotometria na região do UV-Vis

Determinação do espectro de absorção do 5ASA na região do UV-Vis

O espectro de absorção do 5ASA em HCl 0,1 M, foi obtido por espectrofotometria UV-vis. O pico de absorção máxima em 300 nm foi selecionado para as análises quantitativas do fármaco (**Figura 19**).

Figura 19 - Espectro de absorção do 5ASA em meio ácido.



Fonte: Elaborada pelo autor.

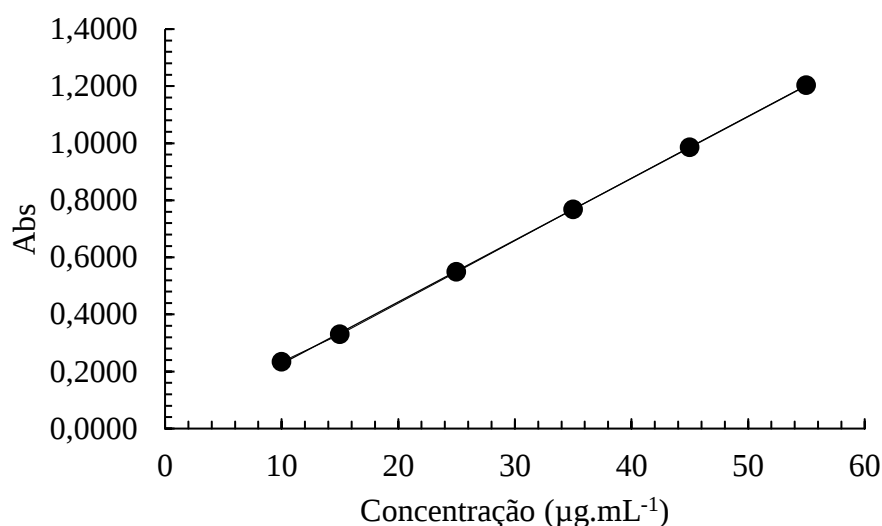
Linearidade

Para a avaliação da linearidade, a partir da média dos valores das três curvas obtidas, no comprimento de onda de 300 nm, a curva analítica absorbância *versus* concentração de 5ASA foi construída (**Figura 20**).

Os resultados obtidos a partir da regressão linear (**Tabela 7**) demonstraram que as soluções de 5ASA apresentaram correlação linear entre os valores de absorbância e

concentrações no intervalo testado, com coeficiente de correlação de 0,9999, demonstrando a adequada linearidade do método conforme recomendado (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005).

Figura 20 - Curva analítica do 5ASA obtido por espectrofotometria UV-Vis.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Dados da Curva analítica do 5ASA obtido por espectrofotometria UV-Vis.

Parâmetros	5ASA
Coeficiente Linear	45,64
Intercepto	0,0104
Coeficiente de correlação	0,9999

Fonte: Elaborada pelo autor.

Precisão

A precisão de um teste analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma múltipla amostragem de uma mesma amostra. A análise de precisão intra-dia e inter-dia foi realizada e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 8**. Como preconizado pela legislação vigente, os DPR% observados para todas as réplicas em diferentes concentrações, nos ensaios de precisão intra-dia e inter-dia foram inferiores à 5%, portanto, o método desenvolvido é preciso (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005).

Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade ou precisão intracorrida.

Concentração nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Intra-dia			Inter-dia		
	Mensurada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR(%)	DP	Mensurada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR (%)	DP
12	11,499	3,4	0,425	11,922	1,4	0,187
30	29,749	1,2	0,399	30,289	1,3	0,445
50	49,982	1	0,541	50,659	1,0	0,537

Fonte: Elaborada pelo autor.

Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico em relação ao valor teórico real. Admitem-se variações na faixa entre 80 e 120%. Na **Tabela 9** estão representados os valores de exatidão do método proposto. Considerando que valores de exatidão, para todas as concentrações, estão entre 95% e 108,84%, pode-se concluir que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação da 5ASA (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2005).

Tabela 9 - Exatidão entre as concentrações teóricas e experimentais de 5ASA

Concentração nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mensurada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão(%)
12	11,50	95,86
30	32,65	108,84
50	52,71	105,42

Fonte: Elaborada pelo autor.

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Utiliza-se o LD e o LQ para medir a sensibilidade do método. Os valores de LD e LQ encontrados utilizando-se o método proposto estão na **Tabela 10**. Estes valores demonstram a capacidade da metodologia analítica em detectar e quantificar com confiabilidade baixas concentrações de 5ASA.

Tabela 10 – Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 5ASA

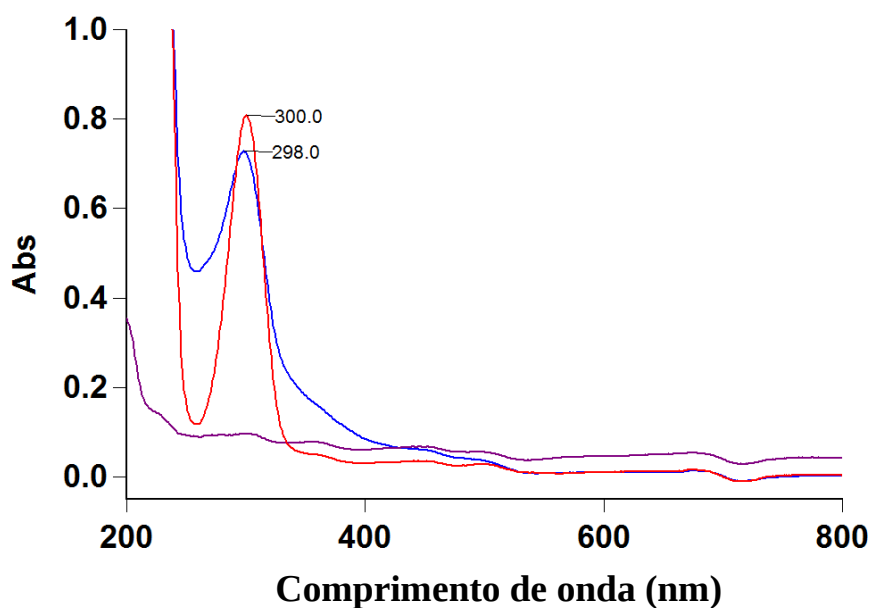
Parâmetros	5ASA
Limite de detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,634
Limite de quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,922

Fonte: Elaborada pelo autor.

Especificidade

A especificidade do método analítico foi comprovada comparando os espectros do placebo e do produto de degradação da solução da amostra com o da amostra de precisão (Figura 21).

Figura 21 - Especificidade do método determinada pela comparação dos espectros de 5ASA (linha vermelha), placebo (linha roxa) e produtos de degradação (linha azul).



Fonte: Elaborada pelo autor.