



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



FERNANDA ISADORA BONI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS BASEADAS EM ÁCIDO
HIALURÔNICO PARA LIBERAÇÃO CÓLON ESPECÍFICA DE
METOTREXATO**

Araraquara-SP

2017

FERNANDA ISADORA BONI

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS BASEADAS EM ÁCIDO
HIALURÔNICO PARA LIBERAÇÃO CÓLON ESPECÍFICA DE
METOTREXATO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientadora: Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Araraquara-SP

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B715d Boni, Fernanda Isadora
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação colônica específica de metotrexato / Fernanda Isadora Boni. – Araraquara, 2017.
150 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.
Coorientadora: Beatriz Stringhetti Ferrelra Cury.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Quitosana. 3. Complexação polieletrólítica. 4. Mucoadesão. 5. Permeabilidade. 6. Células Caco-2. 7. Co-cultura tripla de células. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Cury, Beatriz Stringhetti Ferrelra, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

FERNANDA ISADORA BONI

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de metotrexato

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 29 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Maria Palmira Daflon Gremião



Leila Aparecida Chiavacci Favorin



Ruy Carlos Ruver Beck

Dedico esse trabalho à minha família, às minhas orientadoras, Palmira e Beatriz e aos meus amigos, que contribuíram de forma essencial em todas as suas etapas de execução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar em meu caminho ótimas pessoas, uma família maravilhosa e por todas as oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais Eugenia e Wanderley e irmãs Claudia e Marília, por sempre me incentivarem a seguir nos estudos. Todo o amor e apoio durante a graduação e o mestrado em Araraquara e em Portugal, foram muito importantes. Encorajaram-me nos momentos difíceis, orgulharam-se das minhas conquistas e compartilharam comigo os momentos de alegria. Obrigada!

À Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, responsável pela minha formação acadêmica. À secretaria de pós-graduação e aos funcionários desta faculdade.

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e à minha Coorientadora Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, inicialmente pelas oportunidades, confiança, dedicação e amizade. Muito obrigada Professoras, por toda sabedoria pacientemente transmitida durante minha iniciação científica e mestrado. Vocês são exemplos pessoais e profissionais de pesquisadoras, com a visão, entusiasmo e competência que certamente me servem de estímulo e exemplo.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista (*in memoriam*), que me concedeu a oportunidade da iniciação científica e que mesmo em pouco tempo de convívio, tornou-se um exemplo de professor, pesquisador e pessoa que sempre me lembrarei.

Aos Professores Dra. Ana Dóris de Castro, Dr. Marlus Chorilli e Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, por disponibilizarem o espaço, os equipamentos e compartilharem do seu conhecimento durante os anos de convivência.

Às técnicas Natália Gonçalves e Margarete pela amizade e prontidão em ajudar sempre que necessário e, por cuidar do nosso laboratório.

Ao Prof. Dr. Bruno Sarmento, primeiramente por contribuir na participação da banca de qualificação desse trabalho e, pela oportunidade e supervisão do trabalho no exterior, colaborando nos experimentos de viabilidade celular e permeabilidade intestinal *in vitro*. Aos

alunos do grupo “Nanomedicines and Translational Drug Delivery” pelo acolhimento e ensinamentos valiosos, em especial à Dra. Anna Lechanteur e a Msc. Andreia Almeida, que me auxiliaram de perto e foram muito importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Inovação e Investigação em Saúde da Universidade do Porto, por aceitar me receber como aluna visitante e disponibilizar o espaço e os equipamentos para o desenvolvimento do trabalho. Em especial ao “Histology and Electron Microscopy Service” e ao laboratório “Biointerfaces and Nanotechnology”, com os responsáveis Rui Fernandes, Ricardo Vidal Da Silva e Dalila Fernanda Neto Pedro.

Ao LMA-IQ, sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo O. Orlandi, pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura, com o auxílio do técnico Diego Tita.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas I, sob coordenação do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli e da técnica Naira Canevarolo Pesquero, pelo auxílio com as análises de infravermelho.

Ao Departamento de físico-química, com o equipamento de DRX multiusuário, sob coordenação do Prof Dr Celso Valentim Santilli e técnica Danúbia.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP, por conceder o auxílio financeiro para a participação e apresentação de trabalho no 10º World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow, Escócia (2016).

Aos alunos de pós-graduação do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, por serem companheiros de laboratório e por contribuírem de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

À Natália Noronha, Fabíola, Liliane e Valéria, agradeço a amizade, paciência e todo o tempo despendido durante seu mestrado e doutorado, me auxiliando e transmitindo todo novo conhecimento que adquiriam. Sem a ajuda de vocês seria muito mais difícil encarar os obstáculos do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelo apoio, conselhos valiosos e toda a motivação que vocês me transmitiram esses anos!

Aos meus amigos Estela, Flávia, Jhohann e Bianca, por terem se tornado minha família de coração. Araraquara me trouxe muitas coisas boas, mas conhecer pessoas tão especiais, como vocês, foi uma das melhores. Obrigada por dividirem seus conhecimentos, me ajudarem nos momentos de tristeza e me proporcionarem tantos momentos de felicidade!

Aos amigos que fiz em Porto, conhecer pessoas tão especiais e tão diferentes de mim, foi o melhor que poderia ter acontecido. Vou sempre me lembrar de vocês com carinho!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos meses de auxílio financeiro e por atuar na expansão e consolidação da pós-graduação stricto sensu em todos os estados do país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos nº 2015/21176-5 e 2016/20360-0, pelas bolsas de mestrado e estágio no exterior, como apoio financeiro.

“Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldade para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.”

“Sonhe”- Clarice Lispector

RESUMO

A nanotecnologia farmacêutica é uma relevante ferramenta tecnológica para o desenvolvimento de novos sistemas para a veiculação de fármacos, pois devido às suas dimensões reduzidas são capazes de circular por capilares que irrigam os tecidos, escapar da fagocitose por células do sistema imunológico e permear passivamente células e epitélios. Além disso, esses sistemas possibilitam a encapsulação de fármacos de baixa estabilidade, protegendo-os contra degradação prematura e/ou permitindo a modulação de suas propriedades físico-químicas, bem como a interação biológica na biointerface. O metotrexato (MTX) é um dos fármacos mais utilizados no tratamento de tumores sólidos e doenças inflamatórias intestinais, no entanto, por ser altamente citotóxico e não seletivo promove diversos efeitos colaterais. Sua eficácia terapêutica é comprometida devido à resistência adquirida pelas células tumorais e por sua baixa permeabilidade intestinal, principalmente por meio do mecanismo de efluxo da forma livre. Nesse trabalho, nanopartículas poliméricas (NPs) orais compostas por quitosana (QS), ácido hialurônico (AH) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP), polímeros que possuem propriedades como solubilidade pH dependente, mucoadesividade e de funcionalização, foram desenvolvidas como plataforma tecnológica para a vetorização do MTX para o cólon, visando o tratamento local de patologias intestinais. As análises de peso molecular e coeficiente viral demonstraram a adequação dos polímeros e solventes para a obtenção das nanoestruturas pelo método de complexação polieletrólítica. A avaliação da influência do pH no potencial zeta dos polímeros permitiu a seleção do valor ótimo (pH 5,5) para obtenção das nanoestruturas. O diâmetro médio das NPs sem fármaco, contendo ou não HP variou de 451,73-574,95 nm e a incorporação do MTX reduziu significativamente esses valores para a faixa de 216,83-345,03 nm ($p < 0,05$). A adição do HP, bem como do MTX promoveu a redução do potencial zeta das NPs ($p < 0,05$). O índice de polidispersão das NPs contendo ou não MTX variou de 0,21-0,39 a 0,26-0,33, respectivamente, indicando a homogeneidade de tamanho. A forma esférica das partículas foi também foi demonstrada. Os espectros de absorção na região IV indicaram a formação dos complexos polieletrólíticos e as análises de DRX a formação de estruturas cristalinas. A eficiência de incorporação do MTX variou de 20,06% a 36,18%, sendo as NHP0,5-1 e NHP0,2-5 as que apresentaram as maiores porcentagens (32,21% e 36,18%, respectivamente). Embora o MTX tenha promovido a redução dos valores de mucoadesão ($p < 0,05$), a elevada mucoadesividade (71,22% a 91,53%) de todas as NPs foi evidenciada. De acordo com as isotermas de adsorção, os dados de interação com a mucina apresentaram correlação com o modelo de Freundlich, que indica a adsorção reversível em multicamadas. Em pH 6,8, a interação da mucina com as NPs promoveu a redução do potencial zeta, o que pode estar relacionado a maior capacidade de adsorção nesse valor de pH. A incorporação do MTX nas NPs permitiu a redução da liberação em meio ácido em até 40%, em relação ao fármaco livre, enquanto a adição de HP à matriz das NPs reduziu a liberação em até 10%, neste pH. O mecanismo de liberação do fármaco foi avaliado por diferentes modelos matemáticos. A viabilidade nas linhagens Caco-2 e HT29-MTX para os polímeros e NPs ($0,01 - 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi demonstrada. Para as NPs contendo MTX, nas concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a viabilidade na linhagem Caco-2 após 24 h de incubação foi de aproximadamente 50%. Nos estudos de permeabilidade *in vitro*, as NPs sem adição de HP permearam aproximadamente 3 vezes mais as monocamadas de Caco-2 e de co-cultura tripla de células, em comparação às amostras contendo HP e ao fármaco livre. A maior associação celular para o fármaco incorporado às NPs, em comparação ao MTX livre, demonstrou a capacidade do sistema em modular a interação biológica.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas. Quitosana. Complexação polieletrólítica. Mucoadesão. Permeabilidade. Células Caco-2. Co-cultura tripla de células.

ABSTRACT

The pharmaceutical nanotechnology is a relevant technological tool for the development of new drug delivery systems, because of their small size they are able to circulate through capillaries that irrigate tissues, escape from phagocytosis by the immune system cells and passively permeate cells and epithelia. In addition, these systems enable the encapsulation of low stability drugs, protecting them against premature degradation and/or allowing the modulation of their physico-chemical properties, as well as the biological interaction in the biointerface. Methotrexate (MTX) is one of the most used drug in the treatment of solid tumors and inflammatory bowel diseases, however, because MTX highly cytotoxic and non-selectivity promotes several side effects. Its therapeutic efficacy is compromised due to the resistance acquired by tumor cells and its low intestinal permeability, mainly through the efflux mechanism of the free form. In this work, oral nanoparticles composed of chitosan (CS), hyaluronic acid (HA) and hydroxypropylmethylcellulose (HP) phthalate, polymers that have properties such as pH-dependent solubility, mucoadhesiveness and functionalization have been developed as a technological platform for the target of MTX to the colon, aiming the treatment of local pathologies. Molecular weight and second virial coefficient analyzes demonstrated the suitability of polymers and solvents to obtain nanostructures by the polyelectrolyte complexation method. The evaluation of the pH influence on the zeta potential of the polymers allowed the selection of the optimum value (pH 5.5) to obtain the nanostructures. The mean diameter of the MTX free nanoparticles, containing or not HP ranged from 451.73-574.95 nm and the incorporation of MTX significantly reduced these values for the range of 216.83-345.03 nm ($p < 0.05$). The addition of HP as well as MTX promoted reduction of zeta potential of nanoparticles ($p < 0.05$). The polydispersity index of the nanoparticles containing or not MTX ranged from 0.21-0.39 to 0.26-0.33, respectively, indicating homogeneity of size. The spherical shape of the particles has been demonstrated. The absorption spectra in the IV region indicated the formation of the polyelectrolyte complexes and the DRX analyzes, the formation of crystalline structures. The efficiency of drug incorporation ranged from 20.06% to 36.18%, with the NHP0.5-1 and NHP0.2-5 samples having the highest percentages (32.21% and 36.18%, respectively). Although MTX promoted the reduction of mucoadhesion values ($p < 0.05$), the high mucoadhesiveness (71.22% to 91.53%) of all nanoparticles was evidenced. According to the adsorption isotherms, the interaction data with the mucin presented a correlation with the Freundlich model, which indicates the reversible adsorption in multilayers. At pH 6.8, the interaction of mucin with the nanoparticles promoted the reduction of the zeta potential, which may be related to the higher adsorption capacity at this pH value. The incorporation of MTX in the nanoparticles allowed the reduction of MTX release in acidic media by up to 40% in relation to the free drug and the addition of HP to the nanoparticle matrix reduced the release by up to 10% at pH 1.2. The mechanism of drug release was evaluated by different mathematical models. The viability of Caco-2 and HT29-MTX lines for polymers and NPs (0.01 - $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was demonstrated. For nanoparticles containing MTX, at concentrations of $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, the viability of Caco-2 after 24 h incubation was approximately 50%. In the *in vitro* permeability studies, samples without HP permeated approximately 3-fold more monolayers of Caco-2 and triple co-culture compared to samples containing HP and the free drug. The higher cellular association for the drug incorporated into the nanoparticles, compared to free MTX, demonstrated the ability of the system to modulate the biological interaction.

Keywords: Polymeric nanoparticles. Chitosan. Polyelectrolyte complexation. Mucoadhesion. Permeability. Caco-2 cells. Triple co-culture cells model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos diferentes tipos de nanopartículas.....	26
Figura 2. Esquema ilustrativo da espessura da camada de muco ao longo do TGI.	32
Figura 3. Estrutura molecular da QS.	36
Figura 4. Estrutura molecular do HP.....	37
Figura 5. Estrutura molecular do AH.	38
Figura 6. Representação esquemática da mucosa e elementos celulares; (A) condição saudável e (B) quadro de inflamação crônica.....	41
Figura 7. Esquema ilustrativo dos estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.	44
Figura 8. Representação esquemática da secção transversal do tumor.	47
Figura 9. Fórmula estrutural do MTX.	48
Figura 10. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas poliméricas.	56
Figura 11. Esquema ilustrativo da metodologia utilizada no ensaio de mucoadesão (A- disposição do tecido no suporte, B- amostras fixadas à sonda, C- sistema montado para a análise e D- análise em andamento).	64
Figura 12. Esquema do desenvolvimento dos modelos celulares utilizados no ensaio de permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	68
Figura 13. Gráfico de Debye.	72
Figura 14. Influência do valor de pH no potencial zeta dos polímeros.....	74
Figura 15. Representação esquemática da formação das nanopartículas.	76
Figura 16. Classificação visual das nanopartículas: (A) agregado; (O) opalescente e (L) límpido.....	77
Figura 17. Estrutura química e formas ionizadas do MTX.	78
Figura 18. Diâmetro médio (nm) representado pelas barras e índice de polidispersão representado pelos pontos das nanopartículas com e sem adição de fármaco.....	80
Figura 19. Potencial zeta das nanopartículas com e sem adição de HP e MTX.....	82
Figura 20. Fotomicrografia da solução de Tween 20 utilizada como meio de diluição das amostras, nos aumentos 25.000x e 50.000x.	83
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sem fármaco, aumento 25.000x e 50.000x. A: NHP0,5-0; B: NHP0,2-0; C: NHP0,1-0.....	84

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas, aumento 25,000x e 50,000x. A: NHP0,5-1; B: NHP0,5-5; C: NHP0,2-1; D: NHP0,2-5; E: NHP0,1-1 e F: NHP0,1-5.	85
Figura 23. Distribuição granulométrica das nanopartículas sem adição de MTX.	86
Figura 24. Distribuição granulométrica das nanopartículas contendo MTX.	87
Figura 25. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do fármaco (MTX) e polímeros (HP, AH e QS) que compõe as nanopartículas.....	88
Figura 26. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das nanopartículas sem adição de fármaco.....	90
Figura 27. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das nanopartículas com adição de fármaco.....	91
Figura 28. Difrátogramas de raios X dos polímeros QS, AH, HP e MTX	93
Figura 29. Difrátogramas de raios X da nanopartículas NHP0,5-0, NHP0,2-0 e NHP0,1-0. .	94
Figura 30. Difrátogramas de raios X das nanopartículas contendo fármaco.....	94
Figura 31. Espectros de absorção na região do ultravioleta do MTX em fase móvel.....	95
Figura 32. Cromatograma do MTX (25 µg.mL ⁻¹) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel tampão acetato de amônio 50 mM (pH 6,0):metanol (70:30).	96
Figura 33. (A) Sobreposição dos cromatogramas dos polímeros e do fármaco MTX e (B) cromatograma do sobrenadante das nanopartículas.	97
Figura 34. Cromatogramas das soluções de MTX, A: em HCl pH 1,2 e B: em tampão fosfato pH 6,8.	97
Figura 35. Curva analítica do MTX obtida por CLAE.....	98
Figura 36. Quantidade de mucina adsorvida nas nanopartículas em função da quantidade de mucina adicionada nas soluções, representadas pelas barras e porcentagem de mucina adsorvida representada pelos pontos.	103
Figura 37. Isotermas de adsorção de mucina A- às nanopartículas sem adição de MTX e B- às nanopartículas com adição de MTX.....	104
Figura 38. Isotermas de adsorção de Freundlich (A) e Langmuir (B) das amostras sem adição de fármaco.	105
Figura 39. Isotermas de adsorção de Freundlich (A) e Langmuir (B) das amostras com incorporação de fármaco.	106

Figura 40. Influência da adição de soluções de mucina no potencial zeta das nanopartículas, nos valores de pH 1,2 e 6,8.....	108
Figura 41. Gráfico comparativo da força máxima de mucoadesão - $F_{m\acute{a}x}$ (N); representada pelas barras e trabalho de mucoadesão- T_{muc} (N.s); representado pelos pontos, dos polímeros.	110
Figura 42. Gráfico comparativo da força máxima de mucoadesão - $F_{m\acute{a}x}$ (N); representada pelas barras e trabalho de mucoadesão- T_{muc} (N.s); representado pelos pontos, das nanopartículas com e sem MTX.....	111
Figura 43. Curvas de calibração do MTX em HCl pH 1,2 e Tampão fosfato pH 6,8.....	113
Figura 44. Perfis de liberação in vitro do MTX livre e associado às nanopartículas, em (A) pH 1,2 e (B) pH 6,8.	114
Figura 45. Viabilidade celular (%) das linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX, após 4h e 24h de incubação com os polímeros.....	120
Figura 46. Viabilidade celular (%) das linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX, após 4h e 24h de incubação com as NPs.	122
Figura 47. Valores de TEER dos modelos de monocultura e co-cultura tripla, durante 21 dias.	124
Figura 48. Perfil de permeabilidade do MTX livre e associado às NPs e variação de TEER durante o experimento em cultura celular.	125
Figura 49. Imagem da microscopia confocal (A) monocultura de Caco-2 e (B) co-cultura tripla, após o ensaio de permeabilidade com a amostra NAH0,2-5P.	128
Figura 50. Imagem da microscopia confocal (A) monocultura de Caco-2 e (B) co-cultura tripla, após o ensaio de permeabilidade com a amostra NHP0,2-5P.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos principais tipos de sistemas nanoestruturados aplicados às ciências farmacêuticas.	25
Tabela 2. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.	59
Tabela 3. Avaliação visual da influência da variação de proporção polimérica na aparência das dispersões.	77
Tabela 4. Nomenclatura e composição das nanopartículas.	79
Tabela 5. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de MTX.....	96
Tabela 6. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva.....	98
Tabela 7. Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.	99
Tabela 8. Resultados do ensaio de precisão intercorrida.	100
Tabela 9. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de MTX.....	100
Tabela 10. Eficiência de incorporação (EI%) das NPs.....	101
Tabela 11. Parâmetros dos modelos aplicados às isotermas de adsorção.....	106
Tabela 12. Porcentagens de MTX liberado em relação ao tempo.	115
Tabela 13. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco.	117
Tabela 14. Características das nanopartículas desenvolvidas para os ensaios celulares.	119
Tabela 15. Permeabilidade aparente (Papp) das amostras, % de MTX no compartimento apical (%CA) e % de MTX associado às células e/ou à camada de muco (%ACM). Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP.	126

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

TGI: Trato gastrointestinal

AH: Ácido hialurônico

QS: Quitosana

HP: Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

MTX: Metotrexato

NPs: Nanopartículas poliméricas

CPEs: Complexos polieletrólitos

P-gp: Glicoproteína P

MDR: Resistência a múltiplas drogas

DRX: Difração de Raios X

IV: Infravermelho

JP: Junções paracelulares

MEC: Matriz extracelular

DII: Doenças inflamatórias intestinais

DC: Doença de Crohn

CU: Colite ulcerativa

5-ASA: Ácido 5-aminosalicílico

MAT: Microambiente tumoral

A₂: Segundo coeficiente virial

M_w: Massa molecular

PDI: Índice de polidispersão

EI%: Porcentagem de eficiência de incorporação

t_R: Tempo de retenção

N: Número de pratos teóricos

FC: Fator de cauda

LQ: Limite de quantificação

LD: Limite de detecção

DPR%: Desvio padrão relativo em porcentagem

F_{máx}: Força máxima de mucoadesão

T_{muc}: Trabalho de mucoadesão

NAH0,5-0: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,5, sem MTX

NHP0,5-0: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,5:0,5, sem MTX

NAH0,2-0: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,2, sem MTX

NHP0,2-0: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,2:0,2, sem MTX

NAH0,1-0: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,1, sem MTX

NHP0,1-0: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,1:0,1, sem MTX

NHP0,5-1: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,5:0,5, com 1% de MTX

NHP0,5-5: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,5:0,5, com 5% de MTX

NHP0,2-1: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,2:0,2, com 1% de MTX

NHP0,2-5: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,2:0,2, com 5% de MTX

NHP0,1-1: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,1:0,1, com 1% de MTX

NHP0,1-5: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,1:0,1, com 5% de MTX

NAH0,1-5: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,1, com 5% de MTX

NAH0,2-5: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,2, com 5% de MTX

NAH0,2-0P: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,2, 4 vezes mais concentrada, sem MTX

NAH0,2-5P: Nanopartícula de QS:AH, razão de massas 1:0,2, 4 vezes mais concentrada, com 5% de MTX

NHP0,2-0P: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,2:0,2, 4 vezes mais concentrada, sem MTX

NHP0,2-5P: Nanopartícula de QS:AH:HP, razão de massas 1:0,2:0,2, 4 vezes mais concentrada, com 5% de MTX

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Nanotecnologia farmacêutica	23
2.1.1. Nanopartículas poliméricas	26
2.2. Via oral de administração	29
2.3. Propriedade mucoadesiva	30
2.3.1. Muco e mucina	31
2.4. Polímeros	34
2.4.1. Quitosana	35
2.4.2. Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose	37
2.4.3. Ácido hialurônico	38
2.5. Doenças do TGI.....	39
2.5.1. Doenças inflamatórias intestinais	40
2.5.2. Câncer colorretal.....	43
2.6. Metotrexato.....	48
3. OBJETIVO	51
4. MATERIAIS.....	52
4.1. Principais matérias-primas e reagentes.....	52
4.2. Cultura celular	52
4.3. Principais equipamentos	53
5. MÉTODOS	53
5.1. Caracterização dos polímeros	53
5.1.1. Cálculo da massa molecular e segundo coeficiente virial	53
5.1.2. Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH.....	54
5.2. Desenvolvimento das NPs	55
5.3. Caracterização das nanopartículas	56
5.3.1. Análise de tamanho e do índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas	56

5.3.2. Análise do potencial zeta das partículas	57
5.3.3. Análise de morfologia das nanopartículas	57
5.3.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	58
5.3.5. Difração de Raios X (DRX)	58
5.4. Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	58
5.4.1. Determinação dos parâmetros para validação de metodologia analítica	59
5.4.2. Conformidade do sistema cromatográfico.....	59
5.4.3. Especificidade/Seletividade	60
5.4.4. Linearidade	60
5.4.5. Precisão.....	60
5.4.6. Exatidão	60
5.4.7. Limite de detecção e de quantificação.....	61
5.5. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)	61
5.6. Estudo das propriedades mucoadesivas.....	62
5.6.1. Ensaio <i>in vitro</i> de interação com a mucina utilizando reagente de Lowry.....	62
5.6.2. Estudo da interação entre a mucina e as nanopartículas a partir da análise do potencial zeta.....	63
5.6.3. Avaliação da força e trabalho de mucoadesão.....	64
5.7. Estudos de dissolução do MTX	64
5.7.1. Estudo de solubilidade do MTX	64
5.7.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do MTX	65
5.8. Estudos celulares	66
5.8.1. Ensaio de viabilidade celular	66
5.8.2. Permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	67
5.9. Análise estatística	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1. Avaliação dos materiais e condições para obtenção das NPs.....	71

6.1.1. Determinação da massa molecular e segundo coeficiente virial dos polímeros.....	71
6.1.2. Escolha do valor de pH para o desenvolvimento das NPs	73
6.2. Desenvolvimento das NPs	75
6.3. Caracterização das nanopartículas.....	79
6.3.1. Análise de tamanho, PDI e potencial zeta	79
6.3.2. Análise de morfologia das nanopartículas.....	83
6.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	88
6.3.4. Difração de Raios X (DRX)	92
6.4. Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	95
6.4.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	95
6.4.2. Especificidade/Seletividade.....	96
6.4.3. Linearidade	98
6.4.4. Precisão.....	99
6.4.5. Exatidão	100
6.4.6. Limite de detecção e de quantificação.....	100
6.5. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)	101
6.6. Estudo das propriedades mucoadesivas.....	102
6.6.1. Ensaio <i>in vitro</i> de interação com a mucina utilizando reagente de Lowry.....	102
6.6.2. Avaliação da força e trabalho de mucoadesão.....	109
6.6.3. Estudo da interação entre a mucina e as nanopartículas a partir da análise do potencial zeta.....	107
6.7. Estudos de dissolução do MTX	112
6.7.1. Estudo de solubilidade do MTX	112
6.7.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do MTX	113
6.8. Estudos celulares	119
6.8.1. Ensaio de viabilidade celular	119
6.8.2. Permeabilidade intestinal <i>in vitro</i>	122

7. CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS	131

1. INTRODUÇÃO

A vetorização de fármacos para órgãos, tecidos e células específicas representa um grande desafio no desenvolvimento de novos sistemas de liberação oral de fármacos, uma vez que as diversas barreiras impostas pelos ambientes do trato gastrointestinal (TGI) devem ser superadas até que o fármaco alcance com êxito o sítio alvo. Dentre os diversos segmentos do TGI, o cólon desperta particular interesse como sítio de liberação e/ou ação de fármacos, tanto para o tratamento de patologias locais, como o câncer colorretal e as inflamações intestinais, quanto sistêmicas, por apresentar tempo de trânsito mais prolongado, reduzida atividade proteolítica e pH próximo da neutralidade (PHILIP; PHILIP, 2010).

A nanotecnologia farmacêutica é uma relevante ferramenta tecnológica que permite, além da redução do tamanho para uma escala nanométrica, a obtenção de materiais com propriedades físico-químicas diferentes daquelas apresentadas pelos materiais de origem, já que a absorção, distribuição e eliminação do fármaco através do TGI não são condicionadas apenas pelas propriedades intrínsecas do fármaco, mas são fortemente influenciados pelas propriedades do nanocarreador (LI; HUANG, 2008).

Dessa forma, novos sistemas de liberação em que o fármaco é compartimentalizado em nanoestruturas com características e propriedades moduláveis de acordo com necessidades terapêuticas específicas, podem ser racionalmente delineados.

As reduzidas dimensões das nanoestruturas permitem a capacidade de circulação capilar, escape do reconhecimento por células do sistema imunológico e permeação facilitada através de tecidos e células (JANES et al., 2001; HAMIDI et al., 2008; LIU et al., 2008; SANTOS et al., 2013). Além disso, as características e propriedades dos componentes do sistema; como carga de superfície, porosidade, cristalinidade e hidrofília, possibilitam a formação de várias estruturas com propriedades de superfície diversas, as quais podem modular os padrões de interação biológica na nano-biointerface. O comportamento biológico dos sistemas nanoestruturados depende diretamente de suas interações físico-químicas com as biomoléculas e podem alterar significativamente as propriedades dessas nanoestruturas, condicionando as propriedades farmacocinéticas do fármaco.

Nesse trabalho, nanopartículas poliméricas foram obtidas pelo método de complexação polieletrólítica, o qual apresenta importantes vantagens tecnológicas como evitar o uso de solventes orgânicos e energia elevada, além de relativo baixo custo. No

entanto, deve-se considerar que apesar das referidas vantagens, o delineamento racional de nanoestruturas com propriedades adequadas ao uso pretendido, utilizando essa técnica, impõe grandes dificuldades (PICONE; CUNHA, 2013; CUI; MUMPER, 2001; TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007; LIU et al., 2008; CHEN et al., 2011; AL-QADIA et al., 2013; ALMALIK et al., 2013; NAZERI et al., 2013).

Dessa forma, o desenvolvimento racional da formulação e a adequação de parâmetros do processo para a obtenção de nanoestruturas com propriedades promissoras, constituíram uma etapa fundamental do presente estudo, em que foram selecionados os tipos de polímero, concentrações e parâmetros do método de obtenção.

Entre os polímeros selecionados, o uso do ácido hialurônico (AH) destaca-se no delineamento de nanopartículas para vetorização colônica, principalmente por apresentar interação específica com os receptores CD44 expressos na superfície de células epiteliais do intestino, atuando na funcionalização das partículas (GEORGE, 1998; BENKE; SHAFFER, 2009; JIAO et al., 2015).

A quitosana (QS) despertou interesse por ser um polissacarídeo natural, catiônico, com importante capacidade bio e mucoadesiva, atributo que pode favorecer a retenção do sistema no sítio alvo por um prolongado período de tempo, devido às interações supramoleculares com a biointerface celular e/ou com o muco (VLLASALIU et al., 2010; RINAUDO, 2011; WANG et al., 2012). No entanto, em meio ácido, os grupamentos amino da QS sofrem protonação, o que pode resultar na liberação prematura do fármaco nas porções superiores do TGI, limitando sua aplicação em sistemas de liberação cólon-específicos (RINAUDO, 2011).

Devido a essa limitação da QS, o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) também foi selecionado por ser um polímero aniônico e atóxico, com solubilidade pH dependente a qual pode agregar propriedade gastrorresistente ao sistema de liberação (GHOSH et al., 2011; PEDREIRO, 2012). Por apresentar grupamentos hidroxila, também é capaz de interagir com a mucina presente no muco, contribuindo para a mucoadesão (KIM, I. H. et al., 2003; MAKHLOF et al., 2011).

O MTX é um antineoplásico clássico, anti-inflamatório e imunorregulador, convencionalmente utilizado no tratamento de tumores sólidos e doenças inflamatórias, mas a falta de especificidade e baixa internalização celular limitam sua aplicação na terapêutica, particularmente, por via oral (JAIN et al., 1979; HIGANO; LIVINGSTON, 1989; KIM, D. Y. et al., 2003; MARTINS; YAMAMOTO, 2008; SAGGAR et al., 2013).

A veiculação do MTX em nanoestruturas racionalmente delineadas é uma estratégia promissora para se alcançar a modulação das propriedades de liberação do fármaco e dos padrões de interação biológica, permitindo dessa forma, a vetorização do MTX para o tecido alvo e maximizando sua interação celular.

Nesse trabalho, a associação dos polímeros QS, AH e HP foi explorada como estratégia racional para o desenvolvimento de nanocarreadores orais destinados a liberação cólon-específica de fármacos. A seleção dos polímeros componentes da formulação foi fundamentada no potencial desses materiais conferirem ao sistema propriedades mucoadesivas, potencial de interação com receptores superexpressos na superfície das células intestinais e tumorais, bem como comportamento pH-responsivo. Tais atributos foram considerados críticos para alcançar a vetorização, o controle das taxas de liberação e o aumento da interação com as células, promovendo, consequentemente, o aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais no tratamento local de doenças intestinais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As formas farmacêuticas sólidas de liberação convencional, após serem administradas, liberam o fármaco no sítio de ação/absorção de forma relativamente rápida, dependendo principalmente das características de solubilidade e permeabilidade do fármaco (PEZZINI et al., 2007).

Em contrapartida, os sistemas de liberação modificada são delineados buscando-se alcançar o controle temporal e/ou espacial da liberação do fármaco, podendo reduzir, conseqüentemente, as variações dos níveis plasmáticos e a frequência de administração, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais, além de contribuir para a adesão do paciente ao tratamento (DHAWAN et al., 2004; PINTO, 2010).

Dentre os vários tipos de sistemas de liberação, os destinados a via oral de administração, são de particular interesse, devido as vantagens inerentes a esse via, como a fácil adesão e administração por parte do paciente, flexibilidade de dose, segurança e a possibilidade de explorar a capacidade absorptiva do TGI (FASANO, 1998; KHAFAGY et al., 2007; PINTO, 2010; ISHA et al., 2012).

Neste contexto, o avanço do conhecimento, bem como a descoberta de novos materiais e tecnologias tem permitido novas possibilidades para o desenvolvimento de nanoestruturas com ampla gama de propriedades físico-químicas, as quais podem ser moduladas de acordo com o uso pretendido.

2.1. Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica representa a área que associa nanotecnologia com as ciências farmacêuticas, com o objetivo principal de aumentar a eficácia e segurança de fármacos convencionalmente utilizados na terapia, ou de novos fármacos sintéticos, a partir do delineamento racional de estruturas em dimensões nanométricas (SINHA et al.; SANTOS et al., 2013).

Empregando-se a nanotecnologia é possível compartimentalizar e modificar as propriedades dos fármacos e sua interação com o meio biológico, sem alterar a estrutura da molécula ativa, através da modulação da composição e características do sistema para agregar propriedades inerentes aos materiais e responsividade frente a estímulos específicos (OLIVEIRA et al., 2010).

Embora convencionalmente consideram-se os sistemas com dimensões na faixa de 1-100 nm como nanoestruturas, de acordo com a aplicação e efeito biológico, o tamanho dos sistemas nanoestruturados pode variar de 1-1000 nm.

O comportamento biológico dos sistemas nanotecnológicos, os quais apresentam elevada energia superficial livre, depende fundamentalmente de suas interações físicas e químicas com as biomoléculas presentes no organismo e, portanto, o tamanho e as propriedades de superfície destes sistemas frente à exposição ao ambiente fisiológico devem ser considerados (PARK; HAMAD-SCHIFFERLI, 2010).

Essas questões de nano biointerface, que compreendem as interações entre as superfícies dos nanomateriais e as superfícies de componentes biológicos, podem influenciar fortemente processos, como o de internalização celular. Os eventos de adsorção e absorção requerem interações específicas e não específicas, para superar as forças repulsivas existentes, a capacidade dos sistemas de interagir ativamente com os componentes da membrana celular regulando funções e mecanismos de defesa, resultando no maior grau de internalização e permeação, é uma das vantagens da nanotecnologia (NEL et al., 2009).

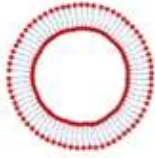
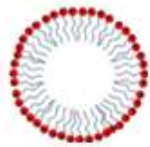
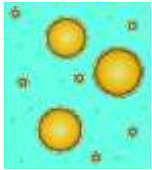
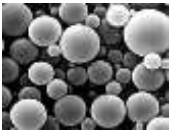
Características como tamanho, carga de superfície, rugosidade e morfologia do sistema, associadas às forças envolvidas na nano biointerface, podem ainda modular comportamentos como o de biocompatibilidade e biodistribuição (NEL et al., 2009).

Diversos sistemas nanoestruturados podem ser desenvolvidos, apresentando características específicas, conforme descrito na Tabela 1.

Dentre esses tipos de sistemas, as nanopartículas poliméricas vem despertando particular interesse na nanotecnologia farmacêutica, por serem sistemas versáteis para a incorporação de diversos fármacos e, por poderem ser obtidas por meio de diferentes técnicas, de acordo com o material escolhido (KUMARI et al., 2010).

Devido à potencial utilização no diagnóstico e tratamento de patologias crônicas degenerativas, como o câncer, esse tipo de sistema é foco de diversos estudos atualmente (SOPPIMATH et al., 2001; BRIGGER et al., 2002; ANDREANI et al., 2014; BARBI et al., 2015; PEDREIRO et al., 2016; KIILL et al., 2017).

Tabela 1. Descrição dos principais tipos de sistemas nanoestruturados aplicados às ciências farmacêuticas.

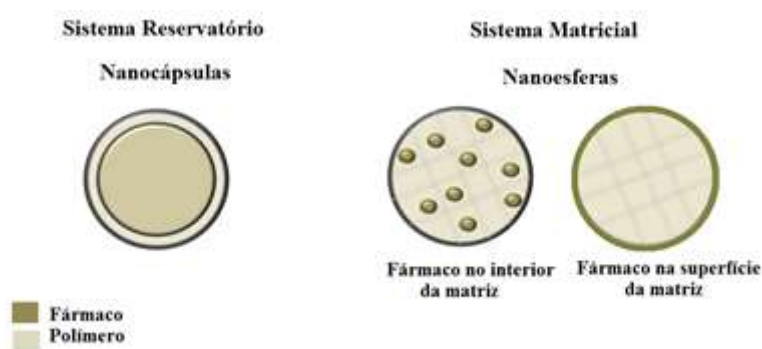
Tipo de sistema	Principal característica	Diâmetros	Representação esquemática	Referências
Lipossomas	Vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas, capazes de encapsular fármacos de característica hidrofílica ou hidrofóbica em seus compartimentos aquosos ou membrana lipídica, respectivamente.	30-1000 nm		(Batista et al., 2007)
Micelas	Agregados de moléculas de surfactantes ou macromoléculas anfifílicas que se formam espontaneamente em condições específicas de concentração e temperatura. São muito utilizadas com o objetivo de aumentar a solubilidade de fármacos.	< 100 nm		(Torchilin, 2007)
Dendrímeros	Estruturas de macromoléculas, complexas e muito organizadas, com estrutura tridimensional regular e altamente ramificada, nas quais pode-se incorporar fármacos ou outras moléculas ativas.	10-20 nm		(Fischer e Vögtle, 1999)
Nanoemulsões	São formadas por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma das fases dispersa como gotículas na outra e, estabilizada com o uso de surfactantes.	>100 nm		(Shafiq et al., 2007)
Nanopartículas lipídicas sólidas	Estruturas sólidas, estáveis, formadas a partir de lipídios líquidos e sólidos. O fármaco pode ser incorporado à matriz ou na superfície da partícula.	>10 nm		(Souto et al., 2011)
Nanopartículas poliméricas	Estruturas sólidas, compostas por polímeros naturais ou sintéticos. Podem ser do tipo matricial ou reservatório.	<1000 nm		(Andreani et al., 2015; Pedreiro et al., 2016)

2.1.1. Nanopartículas poliméricas

Dentre os nanocarreadores, é crescente o interesse no estudo e desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (NPs), visando o potencial de direcionamento e proteção de fármacos, bem como a capacidade de modulação de propriedades físico-químicas e biológicas (MISRA et al., 2010; ESTANQUEIRO et al., 2015).

As NPs são sistemas de diâmetro reduzido (< 1000 nm) e, de acordo com o processo de obtenção, composição e organização estrutural, as NPs podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas são sistemas reservatórios, constituídos de um ou mais núcleos internos, revestidos por uma membrana controladora das taxas de liberação. Já as nanoesferas são sistemas do tipo matricial, constituídas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido no seu interior ou superfície (Figura 1) (PINTO REIS et al., 2006; LIU et al., 2008).

Figura 1. Estrutura dos diferentes tipos de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Silva e colaboradores (2003).

Diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção das NPs, dentre elas, emulsificação/microemulsificação seguida da extração do solvente por evaporação, no qual a natureza do fármaco encapsulado depende do tipo inicial de emulsão e, usualmente utiliza-se solventes orgânicos, como metanol e acetato de etila. A geleificação ionotrópica também é uma técnica muito empregada, na qual realiza-se o gotejamento ou nebulização dos polímeros carregados positivamente ou negativamente, contendo ou não fármaco, em soluções de íons de cargas opostas, formando uma rede tridimensional, pela reticulação iônica das cadeias poliméricas. Outras técnicas também podem ser empregadas na obtenção tanto de nanoesferas quanto nanocápsulas, variando o tipo de material e/ou as condições experimentais, como a

polimerização interfacial, spray-drying e coacervação simples ou complexa. No entanto, estas técnicas além de utilizarem solventes com grau considerável de toxicidade, necessitam de elevada energia; que pode causar a degradação do fármaco incorporado e o alto custo do processo (CUI; MUMPER, 2001; TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007; LIU et al., 2008; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; KUMARI et al., 2010; CHEN et al., 2011).

Como alternativa aos métodos citados, a complexação polieletrólítica apresenta vantagens tecnológicas como as condições reacionais amenas, já que dispensa o uso de solventes orgânicos e elevadas temperaturas, relativo baixo custo e a possibilidade de utilização de solventes aquosos e biopolímeros para a síntese de partículas (BERGER et al., 2004; SCHATZ et al., 2004).

Os complexos polieletrólíticos (CPEs) formados empregando esse método podem originar diferentes estruturas, entre elas partículas eletronicamente carregadas, estáveis, em escala nanométrica, as quais vêm sendo exploradas como sistemas de liberação para diferentes fármacos (MAO et al., 2006; SARMENTO; RIBEIRO; VEIGA, et al., 2007; SADEGHI et al., 2008; BIRCH; SCHIFFMAN, 2014; MALI et al., 2015).

A formação de CPEs nanométricos, de estrutura esférica, envolve três etapas, a primeira é a de constituição dos complexos principais, governada primordialmente pela atração eletrostática, de forma difusa e aleatória, entre os polieletrólitos de cargas opostas. Em seguida, ocorre a etapa de nucleação, na qual se formam ligações hidrofóbicas, de hidrogênio e de Van der Waals entre as cadeias que compõe o complexo principal, nesta etapa as cadeias poliméricas tendem a sofrer uma adaptação conformacional. A terceira e última etapa envolve a agregação dos complexos secundários ao redor do núcleo e, conseqüentemente, o crescimento do diâmetro das partículas, formando uma rede de elevada hidrofília (LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009).

Diversos parâmetros podem influenciar a formação das partículas, destacando-se o tipo de polieletrólito, sua massa molecular, densidade de carga, pH do meio, força iônica, concentração e razão dos materiais os quais influenciam na força de atração entre as cadeias e na formação de ligações iônicas, de hidrogênio, hidrofóbicas e forças de Van der Waals (MAKHLOF et al., 2011). Dessa forma, o conhecimento da complexidade das variáveis que influenciam o processo, bem como da possibilidade de manipulação de cada uma delas, impõe grandes dificuldades ao desenvolvimento de NPs pelo método de complexação polieletrólítica.

A incorporação de fármacos em NPs pode permitir sua proteção contra degradação prematura, evitar/minimizar a interação com elementos biológicos não específicos, modificar o padrão de interação biológica do fármaco na biointerface, além da possibilidade de aumentar o tempo de residência no sítio alvo; através da mucoadesão, atributo que pode contribuir para melhorar a interação biológica no sítio de ação/liberação (PEER et al., 2007).

Deve-se ainda considerar que os eventos biológicos ocorrem em sua maioria na escala nanométrica e, os componentes celulares consistem em biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e seus complexos. As células funcionam por meio de várias interações específicas entre essas nanoestruturas, para guiar e mediar funções celulares e eventos fisiológicos. Dessa forma a organização e interação dos sistemas biológicos assemelham-se de certa forma às das NPs e, portanto a interface criada entre esses sistemas e os substratos biológicos, é um diferencial, principalmente, em relação aos sistemas micronizados (WANG; DONG, 2015).

O reduzido tamanho e extensa área de superfície desses sistemas facilitam a permeação através de tecidos e células e, o escape dos mecanismos de resistência, o conjunto destas propriedades pode ser denominado como direcionamento passivo (*passive targeting*) (SINHA et al., 2006; PEER et al., 2007; CHO et al., 2008; SANTOS et al., 2013; ESTANQUEIRO et al., 2015).

Um conjunto de estratégias tecnológicas, baseadas nas características morfológicas e fisiológicas do sítio alvo, podem ainda ser empregadas no desenvolvimento das NPs. Uma das estratégias é a funcionalização das NPs, com a adição de ligantes de elevada especificidade aos receptores de superfície celular, como anticorpos, ácidos nucléicos, peptídeos ou polissacarídeos, chamado de *active targeting*. Entretanto, em alguns tipos celulares, há evidências de que interações de elevada afinidade, entre a nanopartícula e o receptor de superfície, podem dificultar a internalização do sistema (ALBANESE et al., 2012).

Neste contexto, associado ao direcionamento ativo (*active targeting*), o direcionamento passivo com a modulação do tamanho e densidade de carga das NPs, podem ser aplicados para se alcançar um comportamento desejável (JANES et al., 2001; HAMIDI et al., 2008; LIU et al., 2008).

Dessa forma, a escolha adequada dos materiais que irão compor as NPs é de extrema importância para a modulação de suas propriedades e características.

2.2. Via oral de administração

O desenvolvimento de nanocarreadores para administração oral de fármacos como os antineoplásicos e imunomoduladores, representa uma estratégia racional e inovadora considerando essa via como preferencial, devido às vantagens de não ser invasiva, mais confortável e segura; em relação às vias parenterais, além de possibilitar a maior flexibilidade de dose e posologia (FASANO, 1998; KHAFAGY et al., 2007; PINTO, 2010; ISHA et al., 2012).

A via oral agrega ainda importante vantagem por explorar a capacidade absorptiva do TGI, através de uma extensa área de superfície (300-400m²), com a presença de vilosidades e microvilosidades na superfície das células intestinais. Quando administradas pela via oral, as NPs podem permear mais facilmente a barreira intestinal, sendo uma vantagem principalmente para a veiculação de fármacos pertencentes às classes II (elevada solubilidade e baixa permeabilidade) e IV (baixa solubilidade e permeabilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (PLAPIED et al., 2011).

Dentre os segmentos do TGI, o intestino delgado apresenta a maior área disponível para a absorção, sendo assim considerado o órgão principal para o direcionamento da liberação de fármacos (SCHENK; MUELLER, 2008). Em contrapartida, o cólon como sítio de liberação ou absorção de fármacos, no tratamento de patologias sistêmicas ou locais, pode ser uma interessante estratégia, considerando suas características como; tempo de trânsito mais prolongado, reduzida atividade proteolítica e pH próximo da neutralidade (VARUM et al., 2010; PREZOTTI et al., 2014).

Além disso, a região colônica apresenta reduzida taxa de renovação da camada de muco e menor motilidade, em comparação com o estômago e intestino delgado, podendo facilitar o contato entre o nanocarreador e a mucosa, ideal para a eficaz interação e liberação do fármaco, principalmente aqueles de baixa permeabilidade e/ou que apresentam problemas de estabilidade nas porções superiores do TGI (PHILIP; PHILIP, 2010; VARUM et al., 2010; BONI et al., 2016).

Contudo, deve-se considerar as diversas e importantes barreiras fisiológicas impostas para a vetorização dos sistemas para esse local. Dentre elas, destaca-se a extensa variação de pH entre as diferentes regiões do TGI (valores de pH menores que 1,2 até 7,4), a diferença de

viscosidade dos fluidos biológicos e presença de microbiota e conteúdo enzimático complexos (DATE et al., 2016).

Portanto, para o desenvolvimento racional de nanocarreadores orais para ação ou absorção na região colônica, as potenciais barreiras a serem superadas, após a administração, devem ser estudadas a fim de que os atributos críticos para o desempenho do sistema possam ser estabelecidos como, por exemplo, proteção do fármaco frente ao pH ácido do estômago e à degradação enzimática, capacidade de interação com membranas biológica e, a habilidade de ser internalizado pelas células ou de permear o tecido (VARMA et al., 2010).

Dentre esses atributos, a capacidade de interação com o muco que reveste a região colônica, foi o foco desse estudo, considerando as vantagens inerentes às NPs com propriedade mucoadesiva.

2.3. Propriedade mucoadesiva

A mucoadesão pode ser definida como a interação entre uma macromolécula com o muco que recobre as células epiteliais (CARVALHO et al., 2010). A propriedade mucoadesiva agrega importantes vantagens aos sistemas de liberação de fármacos, por promover um contato mais íntimo com mucosa intestinal; reduzindo a barreira de difusão e prolongando o tempo de retenção no sítio de ação/absorção, ambos fatores que podem aumentar a interação com o meio biológico, a permeabilidade ou biodisponibilidade dos fármacos (SIMONOSKA CRCAREVSKA et al., 2008).

A mucosa é composta por uma barreira epitelial, pela lâmina própria e pela musculatura lisa (VARUM et al., 2008). A camada mucosa diferencia-se ao longo do TGI em composição, organização e superfície de acordo com a funcionalidade da região que reveste. Cada tipo celular que compõe a barreira epitelial apresenta diferentes projeções da membrana plasmática, resultando em vilosidades e microvilosidades diferentes em cada região. A organização celular também difere entre as regiões, implicando em rugosidades desiguais ao longo do TGI (FERRUA; SINGH, 2010; SOSNIK et al., 2014). Nas porções inferiores do TGI, que compreendem intestino delgado e grosso (cólon), as células absorptivas frequentemente assumem projeções na forma digitiforme e, evidencia-se a presença das pregas intestinais (MASOOD et al., 2006).

A mucosa é revestida externamente por uma camada de muco com as funções principais de proteção e lubrificação. Os sistemas de liberação com propriedade mucoadesiva

devem ser capazes de aderir à essa camada de muco, por meio de interações supramoleculares, até serem eliminados pelo *clearance*, com o tempo (SOSNIK et al., 2014).

A partir desse processo de adesão, o sistema poderá permanecer no sítio alvo independente, por exemplo, do tempo de trânsito que em alguns casos, como nas doenças inflamatórias intestinais, pode ser inadequado para a liberação de uma quantidade efetiva do fármaco. Portanto o conhecimento das características desta biointerface é extremamente importante para o delineamento de sistemas de liberação com propriedades mucoadesivas.

2.3.1. Muco e mucina

O muco é uma secreção visco-elástica, produzido pelas células caliciformes do epitélio e majoritariamente constituído de água, sais, lipídios, enzimas, fragmentos celulares e glicoproteínas, como a mucina (SCHACHTER; WILLIAMS, 1982; KHANVILKAR et al., 2001), dentre as funções já citadas do muco, esta secreção também desempenha importante papel na homeostase, regulando o equilíbrio hídrico e o transporte de íons, atuando na limpeza de detritos celulares e na imunorregulação (LITT, 1984; SOSNIK et al., 2014). Nas porções inferiores do TGI, o muco é constantemente produzido e secretado pelas células caliciformes, formando uma camada mais fortemente aderida à mucosa, de espessura variável (de 16 μm a 116 μm , na região intestinal) (Figura 2).

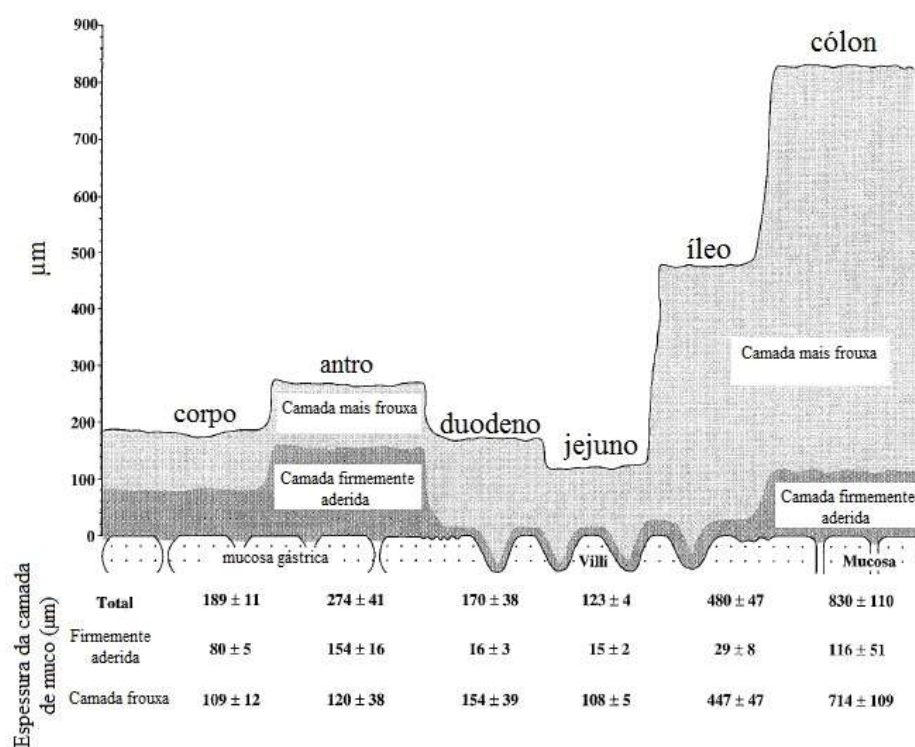
Em contrapartida, o muco voltado à face luminal sofre constante degradação enzimática e erosão pelos fluídos fisiológicos e peristaltismo, formando uma camada mais frouxa, importante na proteção contra patógenos, que pode alcançar 714 μm de espessura na região colônica (Figura 2) (ATUMA et al., 2001).

Além da espessura, a quantidade de mucina presente no muco é variável ao longo do TGI. Na porção gástrica, o muco contém cerca de 3% de mucina, no intestino delgado essa porcentagem é menor; 1% devido as condições mais amenas principalmente de pH, enquanto no intestino grosso há um aumento de mucina na composição do muco, podendo chegar ao valor de 5% (SOSNIK et al., 2014).

As mucinas podem ser divididas em duas classes, as transmembrana (MUC1, MUC4, MUC13 e MUC16) que compõe a camada de muco firmemente aderida à mucosa e as MUC2, MUC5 e MUC6, que constituem a camada mais externa de muco, de malha relaxada, voltada ao lúmen (ENSIGN et al., 2012).

As mucinas são proteínas de elevada massa molecular, que possuem uma estrutura de oligossacarídeos ligados através de ligações do tipo O-glicosídicas, associada a uma cadeia polipeptídica. A porção proteica é constituída de repetidas sequências de serina, treonina e prolina. A estrutura de oligossacarídeos possui em suas cadeias laterais resíduos de ácido sulfônico e ácido siálico, que permanecem ionizados em pH fisiológico (BAFNA et al., 2010; JOHANSSON et al., 2013).

Figura 2. Esquema ilustrativo da espessura da camada de muco ao longo do TGI.



Fonte: Adaptada de Atuma et al., 2001.

As moléculas de mucina, por meio de ligações covalentes, formam uma rede tridimensional altamente enovelada, responsável pela estrutura e características reológicas do muco (MADSEN et al., 1998; ANDREWS et al., 2009; SOSNIK et al., 2014). Essa rede de macromoléculas além de participar da manutenção da homeostase, promove a proteção da superfície celular e, funciona também, como sinalizadora frente a estímulos do microambiente fisiológico, conduzindo sinais de proliferação, diferenciação e apoptose das células (BANSIL; TURNER, 2006; JOHANSSON et al., 2013). Por essa característica, a mucina vem sendo relacionada à malignidade de diversos tipos de tumores, como o de cólon, nos quais as células

cancerígenas produzem elevados níveis de mucina, como forma de proteção ao microambiente ácido e com altas concentrações de proteases e fatores indutores de apoptose (BRESALIER et al., 1991).

Nas doenças inflamatórias intestinais, devido à intensa atividade das células do sistema imunológico, há uma alteração significativa na morfologia e composição da mucosa, com redução localizada no número e tamanho das células caliciformes (KIM; HO, 2010). Como resultado, podem ocorrer duas situações distintas, a de redução na secreção principalmente de MUC2, tornando a camada de muco menos espessa e descontínua ou o aumento na produção de muco, pelas células da periferia, resultando em uma camada mais espessa ao redor de áreas particularmente ulceradas, como forma de proteção do tecido (CORFIELD et al., 2000).

Esta variação da produção e secreção de mucina frente às diferentes patologias deve ser considerada e explorada como estratégia no desenvolvimento de sistemas de liberação, visando a otimização terapêutica.

2.3.1.1. Teorias envolvidas no processo de mucoadesão

Os mecanismos envolvidos no processo de mucoadesão das NPs não são totalmente elucidados, mas acredita-se que esse processo ocorra em duas etapas, sendo a primeira, a de contato. Após a administração, as NPs dispersas em fluídos fisiológicos, por meio dos movimentos peristálticos, se movimentam até se aproximarem do muco, entrando em contato com um conjunto de forças repulsivas e atrativas, como as eletrostáticas e forças de Van der Waals. As NPs devem vencer estas forças repulsivas, estabelecendo um contato íntimo com o muco para que ocorra a segunda etapa do processo, a de consolidação, no qual estão envolvidas diversas teorias (HÄGERSTRÖM et al., 2003; SMART, 2005; CARVALHO et al., 2010).

Por ser um processo complexo, apenas uma teoria de forma isolada não é capaz de explicar a mucoadesão. Entre tais teorias, a eletrônica descreve a presença de cargas elétricas opostas entre as NPs e o muco, em que a transferência de elétrons entre os substratos é responsável por consolidar a adesão. Pela teoria de adsorção, ocorre a atração entre o muco e a partícula, normalmente de carga negativa, via ligações secundárias como as de hidrogênio e /ou hidrofóbicas, resultando em uma forte interação. De acordo com a teoria do intumescimento, ocorre a difusão de líquido do muco para o interior da matriz do sistema, a

qual é responsável por expandir a malha polimérica, facilitando a interpenetração nas cadeias da mucina. Esta teoria está relacionada com a mucoadesão da maioria dos sistemas compostos por polímeros hidrofílicos. Por fim, a teoria de fratura, envolve a avaliação da força necessária para a separação dos substratos sem considerar as questões de difusão e interpenetração que podem ocorrer e, a teoria mecânica que considera que o processo de adesão ocorre devido ao preenchimento das irregularidades em uma superfície rugosa por um líquido mucoadesivo. Essa rugosidade aumenta a área interfacial disponível para as interações, auxiliando a dissipação de energia e pode ser considerado o fenômeno mais importante do processo, no entanto, essas teorias são poucos usuais no estudo dos mecanismos relacionados a mucoadesão de NPs (LEHR et al., 1992; ANDREWS et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Nas NPs, a capacidade mucoadesiva pode ser modulada de acordo com a seleção dos polímeros que irão compor o sistema. A massa molecular e estrutura química dos polímeros são características que podem influenciar no processo de adesão. A presença de grupamentos hidroxila, carboxila ou amina podem contribuir para a formação de ligações de hidrogênio ou pontes dissulfeto, no caso de presença de grupos sulfidrilo, com a mucina presente no muco. Polímeros hidrofílicos com grupamentos ionizáveis podem ainda interagir por forças eletrostáticas com o muco, carregado negativamente, dependendo do valor de pH do meio (VARUM et al., 2008).

2.4. Polímeros

A utilização de polímeros no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados demonstra ser uma vantajosa ferramenta, devido à grande variedade de estruturas desses materiais, como presença de grupamentos hidrofílicos e cargas de superfície, as quais permitem sua modificação química e/ou física, originando novos materiais com propriedades específicas e moduladas de acordo com o uso pretendido, como para a modificação ou controle da liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Diversos polímeros naturais e sintéticos podem encontrar aplicação no desenvolvimento de partículas, para vetorização dos fármacos à região colônica (CURY, 2005; FRIEND, 2005; CARBINATTO et al., 2012; MENEGUIN et al., 2014; PREZOTTI et al., 2014).

O emprego de biopolímeros representa uma estratégia racional, visto sua ampla disponibilidade na natureza, segurança, estabilidade bem como biodegradabilidade microbiana e biocompatibilidade. Estes materiais são facilmente degradados em cadeias de

menor massa molecular, que após a liberação do fármaco, são metabolizadas, eliminadas ou absorvidas pelo organismo, evitando a toxicidade crônica e respostas imunogênicas (MAIOR et al., 2008; AVADI et al., 2010; WANG et al., 2012; PREZOTTI et al., 2014).

Os biopolímeros podem ainda atuar desencadeando respostas biológicas através de interações diretas ou sinérgicas com receptores celulares, citocinas ou fatores de crescimento, potencializando e/ou atuando de forma complementar ao efeito do fármaco (WANG; DONG, 2015).

Devido à versatilidade estrutural desses materiais, sua interação com a interface biológica pode mimetizar a interação natural entre os complexos biomacromoleculares no organismo. Os biopolímeros podem interagir com elementos celulares, criando ou alterando uma nanoestrutura existente e, assim, ativando ou bloqueando importantes processos de sinalização celular. A investigação e o estudo dessas interações, com biomoléculas fisiológicas, podem gerar diversas possibilidades de desenvolvimento de novos nanocarreadores poliméricos com atividade mais específica e efetiva (WANG; DONG, 2015).

2.4.1. Quitosana

Dentre os polímeros naturais, a quitosana (QS) vem sendo alvo de inúmeros estudos na área de desenvolvimento de novos sistemas de liberação nanoestruturados. Rampino e co-autores (2013) obtiveram e caracterizaram nanopartículas de QS reticuladas com tripolifosfato, comprovando a segurança do sistema desenvolvido em ensaios *in vivo* com membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) (RAMPINO et al., 2013).

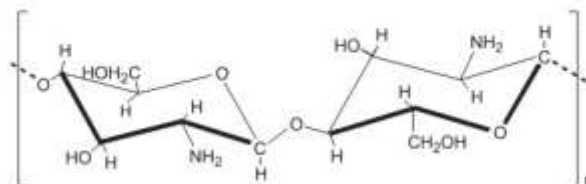
Sarmento e colaboradores (2007) desenvolveram nanopartículas de QS e alginato como sistemas para a administração oral da insulina, observando desempenho promissor no aumento da permeabilidade intestinal do fármaco (SARMENTO; RIBEIRO; VEIGA, et al., 2007; SARMENTO; RIBEIRO; VEIGA, et al., 2007).

A obtenção da QS é realizada a partir da desacetilação parcial alcalina da quitina, um componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Durante a reação, os grupamentos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados em grupamentos amina. A desacetilação pode ocorrer em diferentes graus, variando de 56% a 96%, dependendo da origem da quitina e do processamento realizado (RINAUDO, 2011).

A QS é um polissacarídeo linear, semicristalino e catiônico; devido à desprotonação de seus grupamentos amino. Sua estrutura molecular está apresentada na Figura 3, na qual

observa-se as unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β -1,4. O pKa da QS é de aproximadamente 6,0, tornando-a um polímero de solubilidade pH dependente (RINAUDO, 2011; WANG et al., 2012).

Figura 3. Estrutura molecular da QS.



Fonte: Adaptado de Borgognoni e colaboradores (2006).

A QS é atóxica, biodegradável, biocompatível, amplamente disponível na natureza e sua capacidade de estabelecer interações eletrostáticas com os resíduos de ácido siálico da mucina, faz da QS um material com importantes propriedades mucoadesivas. O contato mais íntimo do sistema com o substrato biológico é uma estratégia para prolongar o tempo de permanência do sistema no sítio alvo, aumentando a concentração local do fármaco e facilitando a interação e internalização celular (SIMONOSKA CRCAREVSKA et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; SOSNIK et al., 2014).

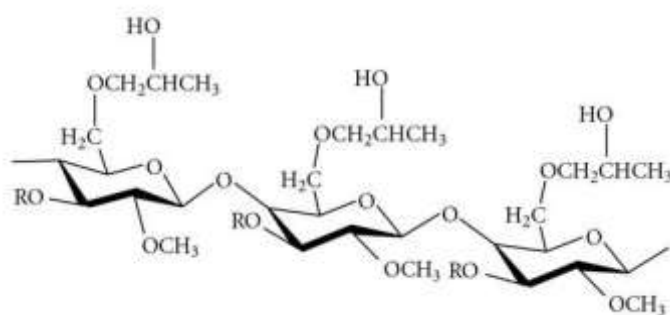
Outra importante propriedade da QS, que vem sendo estudada atualmente é sua capacidade de atuar de forma sinérgica aos antitumorais, no tratamento do câncer, por meio da ativação da apoptose das células tumorais, via ativação da caspase-3, inibindo a progressão tumoral (DASS; CHOONG, 2008; WEI et al., 2013; YANG et al., 2014; PRABAHARAN, 2015).

Entretanto, apesar das vantagens relacionadas à utilização da QS em sistemas de liberação, uma das principais limitações para seu uso em sistemas para a administração oral é sua elevada solubilidade em meio ácido, que pode resultar na liberação prematura do fármaco, no meio gástrico. A complexação polieletrólítica da QS com polímeros aniônicos pode permitir a formação de nanocarreadores com organização estrutural e propriedades que podem ser moduladas e, particularmente sua associação com polímeros gastrorresistentes pode minimizar a ocorrência de liberação prematura do fármaco (PEDREIRO, 2016).

2.4.2. Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) é um polímero muito utilizado na indústria farmacêutica para obtenção de filmes de revestimento entérico de formas farmacêuticas sólidas, devido a sua solubilidade pH dependente, prevenindo a dissolução e liberação precoce do fármaco em porções superiores do TGI. É um derivado da celulose, biodegradável, de pKa de aproximadamente 5,3, constituído por grupamentos hidroxila, que podem ser substituídos por éster metílico, éster 2-hidroxipropílico ou éster ftálico (Figura 4).

Figura 4. Estrutura molecular do HP.



Fonte: Adaptado de Yao e colaboradores (2011).

O HP é obtido por meio da esterificação da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) com anidrido ftálico. O grau de substituição alcóxi ou carboxibenzoíla, determina as propriedades do HP, de forma mais específica, o pH de solubilidade em meio aquoso (MEEHAN, 2006; FERRARI, 2011).

Além de sua utilização em sistemas de liberação convencionais, muitos estudos têm utilizado o HP na composição de sistemas micro e nanoestruturados, para a liberação controlada de fármacos e biofármacos. Singh e colaboradores (2015) desenvolveram micropartículas baseadas em HP para administração oral de antígenos, buscando alternativas à vacinação convencional. As microesferas foram capazes de proteger o antígeno da degradação na região gástrica, liberando-o na porção intestinal para a absorção (SINGH et al., 2015).

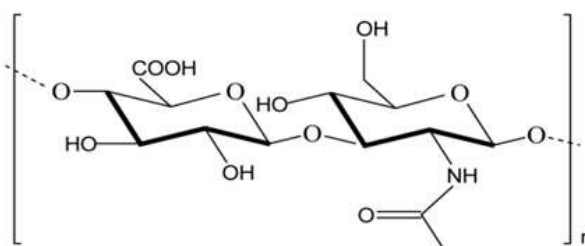
Jin e co-autores (2012), desenvolveram nanoesferas de HP para incorporação de insulina pelo processo de fluido supercrítico. Como resultado, obtiveram nanopartículas com diâmetro entre 138 e 342 nm e teor de incorporação de aproximadamente 90%. Nos estudos de liberação *in vitro*, menos de 10% de insulina foi liberada em 720 min de ensaio em pH 1,2 e 100% após 50 min, em meio com valor de pH 7,8 (Jin et al., 2012).

Devido à mobilidade das cadeias e a presença de os grupos hidroxila, o HP também apresenta potencial de interação com a mucina que, no entanto, é pouco explorada em comparação às suas propriedades gastrorresistentes (MAKHLOF et al., 2011).

2.4.3. Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero, membro da família das glicosaminoglicanas, presente na matriz extracelular (MEC), tecidos e cápsulas bacterianas. É um poliânion linear, hidrofílico, de elevada massa molecular (10^3 a 10^7 Da), composto por unidades de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, através de ligações glicosídicas β -1,4 e β -1-3, alternadas (Figura 5).

Figura 5. Estrutura molecular do AH.



Fonte: <https://www.google.com/patents/WO2013055832A1?cl=en>.

Na MEC, a principal função do AH é a de sustentação das células, agindo também na diferenciação e adesão intercelular. Três diferentes enzimas HAS transmembrana (HAS-1, HAS-2 e HAS-3) são responsáveis pela produção do AH de elevada massa molecular (200 a 2000 kDa) que é secretado na região pericelular e sofre clivagem por enzimas específicas, as hialuronidases. Em células cancerígenas, essa glicosaminaglicana é superexpressa (KIMURA et al., 2013). Os fragmentos de baixa massa molecular produzidos (<200 kDa e oligômeros) interagem de forma específica com receptores celulares RHAMM e CD44, induzindo diretamente uma série de sinais de transdução relacionados à progressão tumoral e sinalização pró-inflamatória (TOOLE, 2004).

Devido à interação específica com os receptores CD44, presentes na superfície das células do epitélio intestinal e com as isoformas CD44v, expressas em grande quantidade na

superfície das células tumorais, o AH, encontra aplicação na funcionalização de NPs, atuando como um direcionador ativo do sistema (LIAO et al., 2005; BECKER et al., 2009).

Diversas nanopartículas baseadas em AH vem sendo exploradas como forma de facilitar a internalização celular de fármacos. Almalik e colaboradores (2013) comprovaram que a interação com os receptores CD44 é responsável pelo processo de internalização de partículas de QS reticuladas com tripolifosfato de sódio e revestidas com AH, de elevada massa molecular. Resultado semelhante foi encontrado por LI e co-autores (2013), com nanopartículas baseadas em QS e AH para veiculação de paclitaxel, em que a maior taxa de internalização das NPs por células HepG2, em comparação ao fármaco livre, foi relatada (ALMALIK et al., 2013; LI et al., 2013).

Devido à presença de grupamentos hidroxila em sua estrutura, assim como o HP, o AH é capaz de estabelecer interações supramoleculares com a mucina, formando ligações hidrogênio e/ou Van der Waals, que resultam em forças atrativas fortes, responsáveis pela consolidação do processo de adesão (SOSNIK et al., 2014).

2.5. Doenças do TGI

Atualmente, como consequência da modificação no estilo de vida e hábitos alimentares da população, observa-se uma transição epidemiológica caracterizada pela diminuição da incidência de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas (WATERS, 2001; GUERRA et al., 2005; FERLAY et al., 2015). Dentre essas, as doenças que acometem o TGI, mais especificadamente a região intestinal, são as de maior incidência nos países em desenvolvimento (ZALTMAN, 2007).

A mucosa intestinal apresenta extensa área de superfície, mantendo contato direto com bactérias, antígenos e diversos compostos de característica tóxica ou cancerígena. Consequentemente, deve atuar como uma barreira eficiente capaz de evitar a absorção de agentes potencialmente nocivos. No entanto, falhas e desregulação na resposta imunológica, mutações nos genes que controlam o ciclo celular dentre outras alterações podem ocorrer, desencadeando processos patológicos (HOLLANDER, 1999).

As doenças inflamatórias intestinais e o câncer colorretal são doenças do TGI muito comuns, multifatoriais, que atingem diversas faixas etárias. Por serem patologias altamente debilitantes, seu progresso resulta em uma série de limitações nas habilidades funcionais do paciente e na capacidade de desenvolver suas atividades diárias. Além do prejuízo

psicológico, a debilidade física que causam ao paciente é rapidamente perceptível, destacando-se a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, que tornem o tratamento dessas doenças mais eficaz e de maior aceitação por parte dos pacientes (JANSSEN-HEIJNEN et al., 2005; RÊGO et al., 2012).

2.5.1. Doenças inflamatórias intestinais

A doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) são classificadas como doenças inflamatórias intestinais (DII). As DII são crônicas e de crescente incidência, sendo consideradas as doenças mais prevalentes do TGI. Estima-se que mais de 2 milhões de indivíduos apresentam DII nos Estados Unidos, com incidência de 5 novos casos a cada 100 mil habitantes por ano (ZALTMAN, 2007). Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a prevalência de DII é menor, no entanto, em decorrência das melhorias socioeconômicas e, consequente mudança no estilo de vida e hábitos alimentares da população, o número de novos casos têm aumentado (LOFTUS, 2004).

As DII acometem indivíduos de uma ampla faixa etária, sendo a maioria dos casos entre jovens de 15 a 30 anos e idosos entre 60 e 70 anos. A causa das DII parece ser multifatorial, sendo fatores de risco para o desenvolvimento dessas patologias a exposição a infecções que causem alterações na flora intestinal, sedentarismo e tabagismo. No entanto, indivíduos com predisposição genética ao entrarem em contato com fatores ambientais tem maior probabilidade de desenvolver o intenso processo inflamatório intestinal, resultante da resposta imunológica descontrolada (HANAUER, 2006).

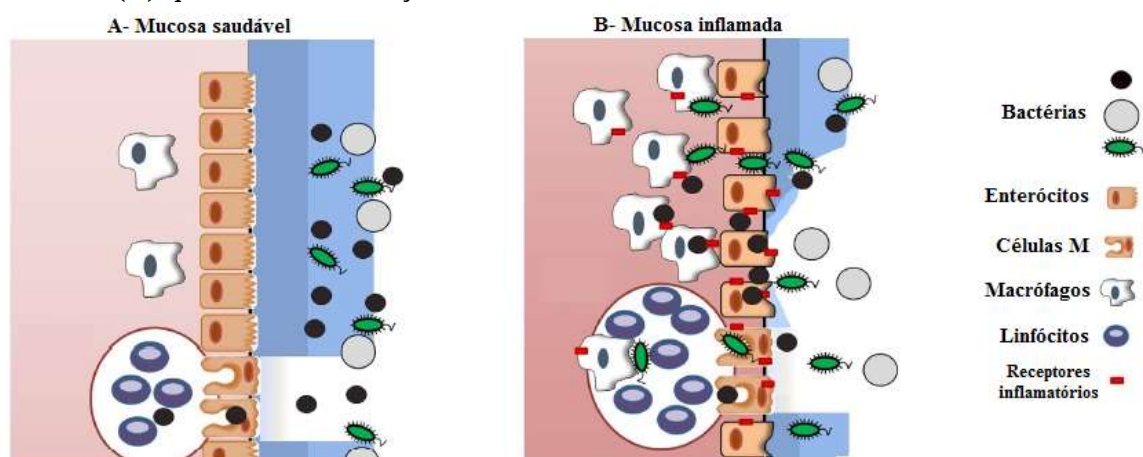
A DC e a CU apresentam manifestações clínicas distintas, porém ambas são caracterizadas por ciclos de inflamação recidiva/remitente da mucosa do TGI (HUA et al., 2015). Para a CU, a inflamação é confinada a região colônica, podendo se estender até o reto. Os sintomas se apresentam normalmente de forma aguda ou subaguda assemelhando-se com um quadro de infecção, com manifestação como diarreia e hemorragia retal. Em casos mais avançados da doença o paciente pode apresentar náusea, dor abdominal e febre (BAUMGART; SANDBORN, 2007; COSNES et al., 2011). Já a DC pode afetar qualquer região do TGI, sendo na maioria dos casos, a porção terminal do íleo e o cólon, as regiões afetadas. Pode haver episódios de remissão, mas a inflamação geralmente é contínua. Devido aos sintomas, é uma doença altamente limitante ao paciente, por causar diarreia intensa como a presença de sangue e muco nas fezes, dor abdominal e febre. Em alguns casos pode ocorrer

a formação de fistulas, abscessos e obstrução intestinal, muito dolorosos ao paciente (BAUMGART; SANDBORN, 2007; HUA et al., 2015).

Por serem doenças em que as taxas de morte e proliferação celular são constantes, os portadores de DII apresentam maior risco de desenvolver câncer colorretal, dependendo da intensidade e extensão da inflamação e, se há o controle adequado com tratamento medicamentoso.

A condição de inflamação crônica que ocorre nas DII, provoca importantes alterações na fisiologia do TGI. Alterações na superfície da mucosa e rupturas podem ocorrer com disfunções na formação das junções paracelulares e aparecimento de úlceras. A redução ou aumento na produção de muco e alterações de suas propriedades reológicas são muito comuns, tornando a mucosa mais vulnerável a infecções. Infiltração de células do sistema imunológico como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas, também são observados com frequência (Figura 6). Durante os episódios agudos, é muito comum ocorrer alterações da motilidade e do volume de fluídos intestinais, principalmente devido ao quadro de diarreia intensa (ANTONI et al., 2014).

Figura 6. Representação esquemática da mucosa e elementos celulares; (A) condição saudável e (B) quadro de inflamação crônica.



Fonte: Adaptada de Hua e colaboradores (2015).

O valor do pH intestinal de indivíduos portadores de DII, também pode sofrer alterações. Os processos de fermentação pelos microrganismos, componentes da microbiota, ação dos sais biliares, metabolismo de ácidos graxos e tempo de trânsito, influenciam diretamente o valor de pH dos fluídos do TGI. Tanto na DC quanto na CU, todos estes fatores

sofrem alteração, provocando a acidificação do pH luminal (IBEKWE et al., 2008; HUA et al., 2015).

Tais alterações fisiológicas na região intestinal devem influenciar decisivamente a eficácia do sistema no tratamento das DII.

2.5.1.1. Tratamento farmacológico das DII

Atualmente a terapia para as DII se baseia no tratamento farmacológico, associado ou não a abordagens nutricionais e cirúrgicas. O objetivo geral da terapia farmacológica é induzir a remissão dos quadros inflamatórios e prevenir episódios recidivos (PERTUIT et al., 2007).

Fármacos de diversas classes são utilizados no tratamento das DII, dentre eles os anti-inflamatórios e imunossupressores. O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) é o anti-inflamatório de primeira escolha no tratamento da CU leve e moderada e, também é eficaz no tratamento da DC, nos períodos ativos da doença e na manutenção da remissão (SUTHERLAND; MACDONALD, 2006). Entretanto, para as formulações orais contendo 5-ASA, é necessário a administração de múltiplas doses diárias. Este regime posológico complexo pode interferir na rotina do paciente, resultando em um impacto negativo na adesão ao tratamento que em longo prazo pode gerar desistência e consequentemente complicações ao paciente (KANE, 2006).

Além disso, apenas 1/3 da dose administrada por via oral é absorvida na forma inalterada, o restante sofre transformação pelas bactérias intestinais ou é excretada pelos rins (MOTA et al., 2007).

Entre os imunossupressores, os mais utilizados no tratamento de DII são o tacrolimus, da classe dos inibidores de calcineurina, o micofenolato de mofetil; inibidor de síntese de purina e o MTX; antagonista de ácido fólico (VAN DIEREN et al., 2006).

Apesar de muito utilizados, a principal desvantagem recorrente dessa terapia é a falta de especificidade dos fármacos alcançarem o local da inflamação. Os mecanismos de liberação de sistemas convencionais são desencadeados por fatores independentes das condições fisiológicas observadas na inflamação e sua localização ao longo do TGI. Consequentemente, o fármaco atua em áreas do tecido que não apresentam inflamação, ao longo do trânsito gastrointestinal. Como resultado, ocorre a diminuição da concentração do fármaco no sítio de ação e também uma série de efeitos adversos resultantes da ação em tecidos saudáveis (KANE, 2006; LAMPRECHT, 2010).

Comumente, os anti-inflamatórios podem causar ulcerações e sensibilidade no jejuno, íleo e cólon, além de manifestações como diarreia, dor abdominal, náusea, má absorção de

nutrientes e rash cutâneo. Entre os imunossupressores, podem ocorrer alterações relacionadas ao sistema nervoso central, como cefaleia, insônia, febre e manifestações dermatológicas, com pruridos. Podem ocorrer também possíveis interações entre esses fármacos, resultando principalmente em alteração nas taxas de absorção (VAN DIEREN et al., 2006).

Considerando os efeitos adversos potencialmente prejudiciais ao paciente, provenientes da falta de especificidade e seletividade destes fármacos em atuarem apenas nos tecidos inflamados, novas ferramentas tecnológicas podem ser exploradas, como o uso da nanotecnologia farmacêutica, para se alcançar a vetorização da liberação dos fármacos no local de ação, tornando o tratamento das DII mais eficaz.

2.5.2. Câncer colorretal

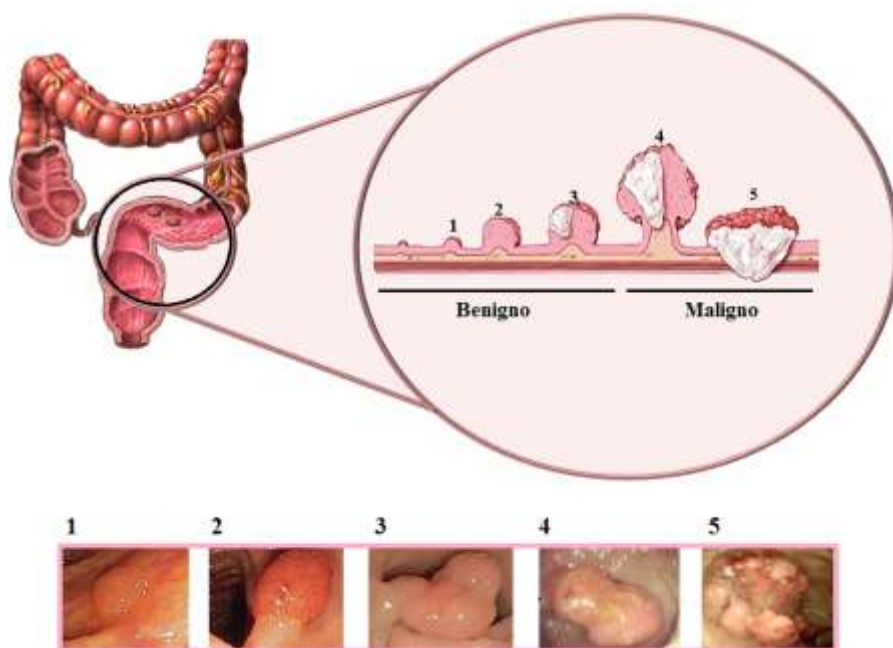
Dentre os tipos mais comuns de câncer, destacam-se o de mama, pulmão, próstata e colorretal, o qual está entre os três de maior taxa de mortalidade, entre homens e mulheres, mundialmente. No ano de 2016, de acordo com a *American Cancer Society*, houve mais de 95 mil diagnósticos, nos Estados Unidos, chegando a 49 mil mortes. Cenário semelhante observa-se no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), em 2014, cerca de 32 mil indivíduos foram diagnosticados com câncer de cólon e reto e constatou-se um aumento de ao menos 10%, no ano de 2016, evidenciando a urgente necessidade de novas alternativas para o tratamento desta doença.

Na maioria dos casos, o fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer envolve hábitos e estilo de vida; como consumo excessivo de carnes vermelhas e alimentos processados, dieta deficiente em fibras; que alteram o esvaziamento entérico, sedentarismo e alcoolismo. Doenças subsequentes e idade são outros importantes fatores de risco, sendo que portadores de algum tipo de inflamação crônica na região colônica apresentam risco 30 vezes maior de desenvolver este tipo de câncer (JASS; MORSON, 1986; EDWARDS, 2011).

Cerca de 85% dos indivíduos diagnosticados estão na faixa dos 50 à 70 anos, sendo poucos os casos associados a mutações genéticas hereditárias (JASS; MORSON, 1986; EDWARDS, 2011).

No câncer de cólon e reto, a evolução do tumor e a transição de lesão benigna para maligna é facilmente distinguida, ocorrendo em cinco estágios bem definidos, como pode ser observado na Figura 7 (PEREZ et al., 1998; COTTI et al., 2000; PINHO, 2005; MISHRA et al., 2013; STRUM, 2016).

Figura 7. Esquema ilustrativo dos estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.



Fonte: Adaptada de Takayama et al., 1998, Johns Hopkins Medicine <hopkinsmedicine.org>.

As células cancerígenas são elementos fundamentais para a iniciação da carcinogênese, entretanto, há uma interação dinâmica e complexa destas células iniciadoras com os elementos celulares recrutados para a região e com a MEC, criando um microambiente tumoral (MAT). Esta interação desempenha papel fundamental na manutenção dos sinais proliferativos, de indução da angiogênese e ativação de mecanismos de invasão, nos estágios de promoção e progressão do câncer (EVAN; VOUSDEN, 2001; SWARTZ et al., 2012).

Nos carcinomas colorretais, a produção e secreção das macromoléculas constituintes da MEC, como o AH, é mais elevada em relação aos tecidos adjacentes; esses componentes interagem com as células neoplásicas por meio de receptores proteicos transmembrana, ativando vias de sinalização necessárias para os processos de adesão, proliferação, motilidade e invasão (LIOU; STORZ, 2010; KEHLET et al., 2016). O AH produzido, apresenta elevada afinidade pelas isoformas do receptor de superfície CD44v, os quais são superexpressos na maioria das células tumorais, especialmente nas do câncer colorretal (MACDONALD et al., 2009).

Todaro e coautores (2014), a partir de estudos imuno-histoquímicos e ensaios *in vivo*, identificaram a expressão da isoforma CD44v6 em todas as células tumorais do cólon, principalmente as de elevada malignidade, sugerindo este receptor como um importante biomarcador e potencial alvo terapêutico. A mesma isoforma foi identificada por Zhao e colaboradores (2015), em tecidos tumorais de pacientes com câncer colorretal, nos estágios 2 e 3 de desenvolvimento, sendo a expressão desse receptor menor nos tecidos saudáveis da região peritumoral (TODARO et al., 2014; ZHAO et al., 2015). Kimura e coautores (2013), identificaram em linhagem de células de câncer colônico a expressão pronunciada de outra isoforma do receptor CD44, a CD44v9. Os autores observaram também, nestas células, a elevada capacidade de proliferação e colonização, além do desenvolvimento de resistência à quimioterápicos clássicos, destacando sua influência na progressão tumoral e malignidade (KIMURA et al., 2013). Zhao e coautores (2015) avaliaram a expressão dos receptores CD44 e suas isoformas em tecidos da região colônica saudáveis e neoplásicos. Os resultados comprovaram a reduzida expressão destes receptores nos tecidos saudáveis desta região, assim como nos tecidos que circundam o tumor e comprovaram a superexpressão, em especial, da isoforma CD44v6 nas células tumorais do cólon (DU et al., 2008; ZHAO et al., 2015).

Frente à compreensão da fisiologia do tumoral e da interação entre os componentes do MAT, novos alvos terapêuticos podem ser explorados.

2.5.2.1. Alternativas terapêuticas

A escolha terapêutica para o câncer colorretal depende de uma série de fatores tais como a localização e extensão do tumor, presença de obstruções, invasão vascular e/ou linfática e do quadro geral de saúde do paciente (GOMES et al., 2009).

Nos dias atuais, o desenvolvimento de biofármacos, proveniente dos avanços na área biofarmacêutica e biotecnológica, representa uma modalidade terapêutica muito estudada e explorada. Estes fármacos apresentam interação específica com receptores celulares, podendo atuar de forma direta nos mecanismos proliferativos ou indireta; vetorizando o agente terapêutico para a célula tumoral. Entre os biofármacos, destacam-se no tratamento do câncer de cólon e reto, os anticorpos monoclonais como o Bevacizumabe (Avastin®), um anticorpo monoclonal humanizado, que age inibindo os VEGFs responsáveis pela angiogênese e, o

cetuximab que atua especificamente no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (HSU; WAKELEE, 2009; WEINER et al., 2010; CORDEIRO et al., 2014).

Entretanto aliado à elevada efetividade destes fármacos está o impacto econômico significativo que eles representam para os sistemas de saúde públicos e privados. O preço de uma dose de um anticorpo monoclonal pode variar de cerca de US\$ 1 mil, no caso dos mais antigos, a US\$ 26 mil, cobrados pelos de gerações recentes, restringindo seu uso para a grande maioria da população. Além deste fator, por serem fármacos relativamente novos, pesquisas sobre os efeitos colaterais e perda de efetividade em longo prazo ainda devem ser realizados (HSU; WAKELEE, 2009; HYEDA; DA COSTA, 2015).

Portanto a quimioterapia convencional, associada ou não a radioterapia e ressecção cirúrgica, ainda é a abordagem terapêutica mais utilizada atualmente, na maioria dos casos e estágios do câncer (TILLY et al., 2003).

A grande maioria dos fármacos clássicos utilizados no tratamento de tumores sólidos como o colorretal pertencem a subclasse dos ciclo-específicos; os ciclo-fase específicos, destacando-se o 5-fluoracil e o metotrexato (MTX) (FISTER; PANETTA, 2000; TILLY et al., 2003; CHABNER; ROBERTS, 2005; DE ALMEIDA et al., 2005).

Independente da classe do antineoplásico, da diversidade de características químicas e mecanismos farmacológicos, a quimioterapia quase sempre ocorre por meio da administração intravenosa. Vias alternativas como a intramuscular, subcutânea e oral são pouco usuais e estão relacionadas a terapia adjuvante e a estágios iniciais da patologia (KEIZER; PINEDO, 1985; O'NEILL; TWELVES, 2002).

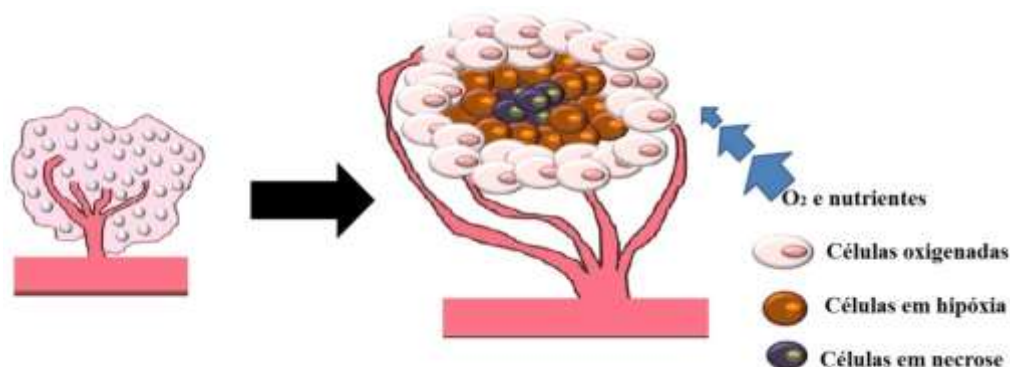
Entre os principais obstáculos enfrentados na quimioterapia intravenosa, destaca-se os diversos efeitos colaterais ocasionados principalmente pela falta de especificidade/seletividade destes fármacos que, por serem agentes citotóxicos, ao atingirem os tecidos sadios provocam severos efeitos colaterais, de grande impacto na qualidade de vida do paciente (ESTANQUEIRO et al., 2015).

Outros problemas acerca do tratamento convencional são a predisposição das células tumorais em tornarem-se resistentes aos fármacos clássicos e a dificuldade dos antineoplásicos em atingirem o local de ação na concentração necessária para exercer o efeito terapêutico (GAO et al., 2012).

No caso do câncer colônico, durante o desenvolvimento do tumor, há a compressão ou obstrução de vasos sanguíneos pré-existent, gerando regiões de hipóxia e necrose celular,

pelo menor aporte nutricional e de oxigênio. Em resposta a esse processo, ocorre a formação de novos vasos, pelo mecanismo de angiogênese. Essa neovascularização tem como característica ser muito ramificada, com vasos de baixo calibre tornando, consequentemente, a irrigação sanguínea irregular e, reduzida em algumas regiões mais internas do tecido (Figura 8) (DE OLIVEIRA, 2002).

Figura 8. Representação esquemática da secção transversal do tumor.



Fonte: Adaptado de De Oliveira e colaboradores (2002).

Quando administrado pela via intravenosa, o fármaco deve vencer diversas barreiras até atingir as células cancerígenas. Inicialmente deve se distribuir pela corrente sanguínea, até atingir a vascularização do tumor, atravessando a parede dos vasos em direção ao interstício celular, penetrando a matriz até atingir as células em concentração efetiva. Devido à compressão dos vasos, ocorre menor fluxo no interior da massa tumoral, reduzindo a taxa de distribuição do fármaco na região de hipóxia, este processo caracteriza um importante mecanismo de resistência à quimioterapia (DE OLIVEIRA, 2002; GOTTESMAN, 2002; JAIN et al., 2014).

Neste sentido, a utilização da via oral para administração dos quimioterápicos pode ser vantajosa, considerando que a massa tumoral é voltada ao lúmen, o tecido estaria mais exposto à ação do fármaco carregado pelo sistema, evitando os problemas associados principalmente a alteração na vascularização e aos efeitos adversos sistêmicos.

Dessa forma, considerando os efeitos inerentes à falta de especificidade dos agentes quimioterápicos clássicos e os mecanismos de resistência, destaca-se a urgência na elaboração de novas estratégias que permitam a vetorização do quimioterápico em concentrações

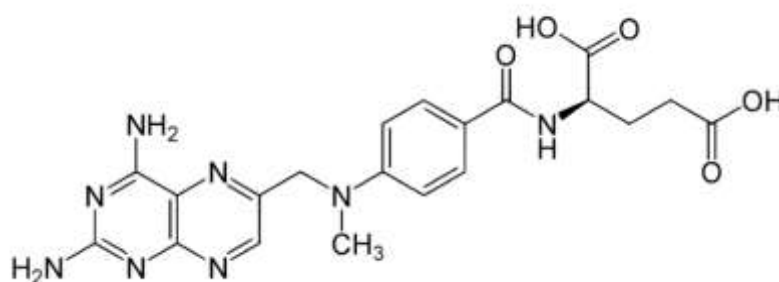
efetivas, para o tecido alvo, associadas à fácil administração. Tais estratégias poderiam aumentar a efetividade do tratamento, fornecendo maior conforto ao paciente e facilidade na adesão ao tratamento, melhorando a qualidade de vida do indivíduo e consequentemente, sua expectativa de recuperação.

2.6. Metotrexato

O MTX é caracterizado como um pó alaranjado, de massa molecular 454,44 g/mol e quimicamente constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4-diaminosubstituído) ligada à porção *p*-aminobenzoil que está ligada à unidade de ácido glutâmico (Figura 9).

Apresenta três valores de pKa; 3,4 e 4,7 (referentes aos grupamentos carboxil) e 5,7 do grupamento nitrogenado do anel pterina, por isso sua solubilidade, em meio aquoso, é pH-dependente, sendo pouco solúvel em pH ácido e muito solúvel em pH alcalino. O MTX é classificado como classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade, característica que limita sua administração oral, no tratamento de patologias como o câncer colônico (JAIN et al., 1979; HIGANO; LIVINGSTON, 1989; KIM, D. Y. et al., 2003; MARTINS; YAMAMOTO, 2008; SAGGAR et al., 2013).

Figura 9. Fórmula estrutural do MTX.



Por ser um análogo do ácido fólico, o MTX tem a capacidade de se ligar fortemente ao transportador de folato reduzido para ser transportado para o meio intracelular, onde sofre poliglutamação pela enzima folipoliglutamil sintase, sendo convertido em derivados

poliglutamatos de mesma atividade. Este processo permite a retenção e aumento da meia-vida intracelular do MTX, que na forma livre sofre efluxo (ABOLMAALI et al., 2013).

O MTX pertence à classe dos quimioterápicos clássicos, sendo muito utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, como os colorretais. Apresenta elevada afinidade pelas enzimas diidrofolato redutase (DFHR); envolvidas nas vias de síntese de purinas e pirimidinas. Estas bases nitrogenadas são precursoras da síntese de DNA e de RNA, portanto, como resultado da inibição das vias, há a interrupção da replicação do DNA e morte celular (LONGO-SORBELLO; BERTINO, 2001; ABOLMAALI et al., 2013).

Diversos regimes posológicos podem ser adotados na terapia com MTX, frequentemente a via de administração utilizada no tratamento de câncer é a intravenosa. A dose recomendada pode variar entre os pacientes sendo normalmente de 14 mg/m² a 40 mg/m², administrado de forma fracionada (GORLICK et al., 1997; WIDEMANN; ADAMSON, 2006).

Nas DII, o MTX atua como imunossupressor e anti-inflamatório, sendo muito eficaz na manutenção e remissão dos quadros inflamatórios, principalmente em pacientes resistentes a corticoides e ao tratamento com 5-ASA.

Normalmente, nas DII, administra-se menores doses de MTX, comparado às utilizadas no tratamento de câncer. Uma dose semanal de 25 mg, intramuscular ou subcutânea, é eficaz para induzir a remissão da DC ou CU e, a dose de 15 mg semanais é suficiente para a manutenção do quadro de remissão (WAHED et al., 2009).

Além de atuar na inibição da proliferação celular, o MTX em baixas doses também é capaz de induzir a apoptose de linfócitos T e reduzir as taxas de produção de citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IL-10 (VAN DIEREN et al., 2006).

Apesar de ser um dos fármacos de escolha para o tratamento do câncer colorretal e das DII, sua elevada citotoxicidade e baixa seletividade são responsáveis por uma série de efeitos indesejáveis em órgãos e tecidos saudáveis, apresentando diversos efeitos adversos que dificultam a adesão do paciente e o ajuste posológico (GAIES et al., 2012).

A mucosa gastrointestinal e medula óssea são os tecidos de maior vulnerabilidade aos efeitos do MTX, principalmente pela intensa taxa de proliferação celular (LEVÊQUE et al., 2011). O MTX pode induzir uma série de distúrbios, como dor abdominal, vômito, náusea e diarreia, efeitos que são acentuados na administração oral (LEVÊQUE et al., 2011). Hepatotoxicidade e nefrotoxicidade também podem ser causadas durante a terapia com MTX,

por isso o acompanhamento médico e ambulatorial do paciente é indispensável. (SYNOLD et al., 1994; LEVÊQUE et al., 2011).

Além dos efeitos adversos, outro obstáculo que afeta a efetividade do MTX administrado pela via oral é a resistência adquirida pelas células, por meio do mecanismo de efluxo pela glicoproteína P (P-gp) (BARRUECO et al., 1992).

A P-gp é uma proteína transportadora de membrana, de elevada massa molecular, com duas sub-unidades cada uma com 12 segmentos transmembrana. Apresenta diversas isoformas, codificadas por variantes do gene de resistência a múltiplas drogas (MDR), primeiramente descritos por Juliano & Ling em 1976. Nos seres humanos, o gene MDR-1 é o principal codificador da P-gp expressa na superfície das células do epitélio colunar do intestino delgado e cólon (STAUD et al., 2010).

Células cancerígenas também apresentam esse transportador, dependente de ATP, Weinstein e co-autores (1991) identificaram a expressão aumentada da P-gp em células de carcinoma colônico, de potencial invasivo e maligno, indicando a contribuição dessa glicoproteína para a redução do efeito farmacológico e aumento do nível de agressividade tumoral (WEINSTEIN et al., 1991).

A atuação da P-gp sobre a permeabilidade da membrana previne o acúmulo intracelular do MTX, sendo muitas vezes necessária a administração de elevadas doses para alcançar o efeito terapêutico.

Frente aos obstáculos impostos ao tratamento convencional das doenças intestinais, destaca-se a necessidade de explorar novas tecnologias farmacêuticas, que tornem a terapia mais direcionada e eficaz. O desenvolvimento racional de nanopartículas poliméricas para a veiculação desses fármacos, que permitam a administração oral e a maior interação biológica pode ser alcançado, empregando-se materiais com propriedades de funcionalização, mucoadesividade e gastrorresistência como o AH, QS e o HP.

3. OBJETIVO

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas mucoadesivas, compostas de quitosana e ácido hialurônico com ou sem ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, contendo metotrexato para liberação cólon específica.

Para alcançar os objetivos propostos as seguintes etapas foram realizadas:

- Avaliação dos materiais utilizados (QS, AH e HP) e escolha das condições de obtenção das nanopartículas;
- Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas;
- Determinação da porcentagem de fármaco associado às nanopartículas;
- Estudo da mucoadesividade dos sistemas;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do metotrexato;
- Estudo de citotoxicidade dos materiais e sistemas desenvolvidos;
- Avaliação da permeabilidade intestinal *in vitro* do metotrexato associado às nanopartículas, em monocultura e co-cultura tripla de células.

4. MATERIAIS

4.1. Principais matérias-primas e reagentes

- Quitosana de baixo peso molecular (grau de desacetilação de 90%, Sigma Aldrich®);
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (Shin-Etsu®);
- Metotrexato (Fagron);
- Hialuronato de sódio (ViaFarma);
- Mucina tipo II (Sigma-Aldrich®);
- Acetato de amônio P.A (Synth®), ácido clorídrico- teor 37% (Qhemis), ácido acético P.A (Qhemis), fosfato de potássio monobásico (Vetec), fosfato de sódio tribásico (Henrifarma) e hidróxido de sódio (Grupo Química®).

4.2. Cultura celular

- Linhagem celular Caco-2 (clone CBBel) obtida da Coleção de Microorganismos Norte Americana (ATCC - American Type Culture Collection);
- Linhagem celular HT29-MTX fornecida pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178);
- Linhagem celular Raji-B fornecida pelo Dr. Alexandre Carmo (Cellular and Molecular Biology Institute – IBMC);
- Meio de cultura DMEM (do inglês Dulbecco's modified Eagle médium, Lonza) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais;
- Reagente MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo], DAPI [4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorídrico] e dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®);
- Triton X-100 (Spi-Chem);
- Paraformaldeído (Billerica);
- Alexa Fluor® 546 faloidina, Alexa-Fluor 488® conjugado com anticorpo secundário anti-occludina (Molecular Probes®);
- Anticorpo anti-occludina (Santa Cruz Biotechnology);
- Frascos de cultura celular e placa de 96 poços (Corning Inc.);
- Placas de 6 poços Transwell™ com membrana transparente de PET e poro de 3 µm (Corning Inc.).

4.3. Principais equipamentos

- Agitador magnético (Quimis);
- Balança analítica (Owa labor; Bel Engineering);
- Peagômetro (Micronal);
- Centrífuga (Sorvall TC);
- Ultracentrífuga (ThermoScientific);
- Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments) acoplado ao autotitulado MPT –2;
- Analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro System®);
- Espectrofotometro de UV-VIS (Hewlett Packard 8453)- ChemStation Software;
- HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies);
- Microscópio eletrônico de varredura JSM-7500F (JEOL);
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 (JEOL) - câmera Gatan SC 1100 ORIUS CCD (Warrendale);
- Microscópio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica);
- Incubadora, com atmosfera controlada (Binder® CB).

5. MÉTODOS

5.1. Caracterização dos polímeros

5.1.1. Cálculo da massa molecular e segundo coeficiente virial

A massa molecular média e o segundo coeficiente virial dos polímeros QS, AH e HP foram determinados em equipamento Zetasizer Nano ZS®, por meio da técnica de espalhamento de luz estático à 25°C, com o auxílio do software Zetasizer nano ZS v7.11.

Os resultados foram calculados por meio do software, a partir da equação de Rayleigh (Equação 1) que descreve a intensidade de luz espalhada a partir de uma partícula em solução (KRATOCHVIL, 1987; RODEMBUSCH, 2001).

$$\frac{Kc}{R\theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: $R\theta$ = a razão de luz espalhada pela amostra em relação à luz incidente, M_w = massa molecular média da amostra, A_2 = segundo coeficiente virial, C = concentração da amostra, $P(\theta)$ = dependência angular da intensidade de espalhamento da amostra e K = constante óptica, calculada segundo a Equação 2 (KRATOCHVIL, 1987; RODEMBUSCH, 2001).

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: N_A = constante de Avogadro, λ_0 = comprimento de onda do laser, n_0 = índice de refração do solvente e dn/dc = índice de refração diferencial do polímero em determinado solvente.

Os índices de refração diferencial (dn/dc) utilizados para os polímeros foram de 0,181 mL.g⁻¹ para a QS, 0,152 mL.g⁻¹ para o HP e 0,167 mL.g⁻¹ para o AH (FUKASAWA; OBARA, 2003; HOKPUTSAA et al., 2003; SCHATZ et al., 2003) e, como padrão para as medidas utilizou-se o tolueno, previamente filtrado em membrana de politetrafluoretileno (PTFE, 0,2 µm). O tolueno foi selecionado por permitir medidas mais precisas, ser um solvente de fácil acesso, elevado pureza e $R\theta$ conhecido (MURPHY, 1997).

A QS, HP e AH foram dispersos na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em ácido acético 0,1 mol.L⁻¹, hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.L⁻¹ e água purificada, respectivamente, por 24 horas. A partir das dispersões, realizou-se as diluições nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,7 e 0,9 mg.mL⁻¹, para a QS e HP e, 0,02; 0,05; 0,1 e 0,4 mg.mL⁻¹, para o AH. Todas as etapas de preparo das amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar para evitar contaminação com partículas que pudessem interferir na eficiência da medida (FERREIRA, 2015).

Para cada concentração, mediu-se a intensidade de espalhamento ($Kc/R\theta$) em triplicata, resultando na construção do gráfico de Debye, o qual relaciona concentração vs ($Kc/R\theta$), para a determinação da massa molecular média dos polímeros.

5.1.2. Análise do potencial zeta dos polímeros em função do pH

Para a determinação do melhor valor de pH para a reação de complexação polieletrólítica, realizou-se a titulação ácido-base dos polímeros. Para tanto, a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada, em equipamento Zetasizer Nano-ZS®, acoplado

ao autotitulado MPT-2. Para o ensaio, a QS e o HP foram dispersos em ácido acético 0,1N e NaOH 0,1N, respectivamente, e o AH em água purificada, todos na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. As dispersões foram incubadas em banho de ultrassom, sem aquecimento, para eliminação de bolhas que pudessem interferir na análise. A titulação foi realizada, em triplicata, utilizando-se HCl 0,1N; NaOH 0,01N e 0,25N (PICONE; CUNHA, 2013).

Avaliou-se o potencial zeta dos polímeros em diferentes valores de pH, a partir de uma curva de titulação que variou dos valores de pH 3,0 a 7,5 (com aumento de 0,5 ± 0,2 unidades por medida).

5.2. Desenvolvimento das NPs

As nanopartículas poliméricas (NPs) foram obtidas por meio da técnica de complexação polieletrólítica do polímero catiônico (QS) com os aniônicos (AH e HP), segundo o método proposto por Makhlof e coautores (2011a) e adaptado por Pedreiro (2016) (MAKHLOF et al., 2011; PEDREIRO, 2016).

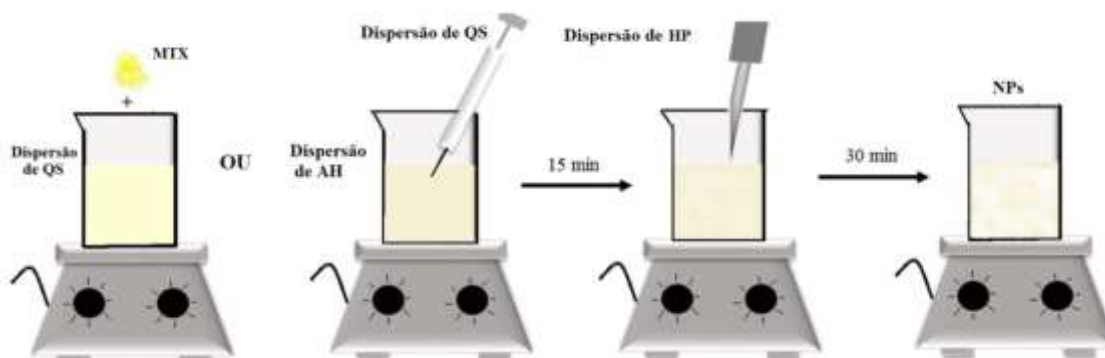
A QS e o HP foram dispersos em ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹, respectivamente, na concentração 0,5 mg.mL⁻¹. O AH foi disperso em água purificada na concentração 0,1 mg.mL⁻¹, ajustando-se o valor de pH das dispersões poliméricas.

Para as NPs compostas por QS:AH, realizou-se a adição lenta da dispersão de QS sobre a de AH, utilizando seringa e agulha sem bisel 23G 1” (0,6 x 25 mm), sob agitação magnética de 15 minutos.

Para as NPs contendo HP, passo semelhante ao citado anteriormente foi realizado, sendo que ao final dos 15 min de agitação realizou-se a adição da dispersão do polímero gastrorresistente (HP) à dispersão pré-formada, mantendo a agitação por 30 minutos adicionais (Figura 10).

Testou-se a obtenção de partículas contendo QS:AH e QS:AH:HP, em diversas proporções de massa polimérica. As partículas com fármaco foram obtidas nas mesmas condições, sendo o MTX previamente adicionado à dispersão de QS, nas concentrações de 5,0% ou 1,0%, em relação à massa polimérica final (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas poliméricas.



Fonte: Próprio autor.

5.3. Caracterização das nanopartículas

5.3.1. Análise de tamanho e do índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas

O diâmetro médio e o PDI das nanopartículas foram determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, no equipamento Zetasizer Nano-ZS à 25°C, em um ângulo de detecção de 173°.

O software do equipamento é capaz de medir a difusão aleatória das nanopartículas no fluído em que estão dispersas, convertendo esse resultado no diâmetro hidrodinâmico das partículas e em distribuição de tamanhos, a partir da relação de Stokes-Einstein (Equação 3) (PERCORA, 2000).

$$Dh = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: Dh= diâmetro hidrodinâmico, K= constante de Boltzman, T= temperatura absoluta, η= viscosidade do meio de dispersão e D= coeficiente de difusão.

As medidas foram conduzidas para as nanopartículas obtidas pela mistura de QS:AH e para as compostas por QS:AH:HP. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, com 10

determinações do diâmetro para cada uma das amostras, sem e com a incorporação de fármaco.

5.3.2. Análise do potencial zeta das partículas

O potencial zeta das dispersões de nanopartículas foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética, por meio da equação de Smoluchowski (Equação 4), em analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS, sob ângulo de 173°.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: ζ = potencial zeta, μ = mobilidade eletroforética, η = viscosidade do meio de dispersão e ε = constante dielétrica.

A carga de superfície das partículas pode variar de acordo com os parâmetros experimentais utilizados, como a proporção dos componentes e presença de fármaco. A influência desses parâmetros foi avaliada para se encontrar as condições favoráveis e de maior estabilidade para o sistema desenvolvido.

Todas as medidas foram conduzidas em triplicata para as NPs (QS:AH e QS:AH:HP) sem e com a incorporação de MTX.

5.3.3. Análise de morfologia das nanopartículas

A morfologia das NPs foi analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F. As amostras obtidas no item 5.2 foram diluídas na proporção 1:30 (v/v) em uma dispersão de Tween 20 (0,5%-v/v), para evitar a aglomeração das partículas durante o processo de secagem. O material foi disposto sobre suporte metálico e seco em temperatura ambiente por três dias. Após a secagem, o suporte foi revestido com material condutor (Carbono). O software ImageJ foi utilizado para medir o tamanho das nanopartículas a partir das fotomicrografias.

5.3.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

(IV)

A caracterização por IV foi realizada com os polímeros QS, AH, HP, com o MTX e nanopartículas, para avaliação das possíveis interações entre os componentes da amostra. Para esse ensaio de caracterização, as amostras foram previamente congeladas em Ultra Low Freezer (Sanyo, MDF-U76VC), a -80°C e liofilizadas por 48 h (Micro Modulyo 115, Thermo Scientific). O ensaio foi realizado em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 (BRUKER), abrangendo uma região de 3500 a 400 cm^{-1} . Utilizou-se o acessório ATR, pelo método de reflexão total atenuada (cristal de diamante).

5.3.5. Difração de Raios X (DRX)

Realizou-se a análise por difração de raios-X, em difratômetro de raios X modelo D5000-DIFFRAC PLUS XRD Commander (SIEMENS), sob radiação monocromática Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), em temperatura ambiente. Para este ensaio, foram analisados os polímeros, o fármaco e, as NPs sem e com MTX, previamente liofilizadas. As amostras foram analisadas com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 70° e velocidade do goniômetro de 0,05/min.

5.4. Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Na validação do método analítico para quantificação do MTX por CLAE e detecção na região do ultravioleta, os seguintes parâmetros foram avaliados: conformidade do sistema, linearidade, precisão intracorrida e intercorrida, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), como preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; USP, 2011).

5.4.1. Determinação dos parâmetros para validação de metodologia analítica

Com o objetivo de garantir a quantificação do MTX nas formulações escolhidas, assim como nos ensaios de solubilidade e dissolução do fármaco, validou-se a metodologia analítica segundo adaptação de GAO & JIANG, 2005 e Von Zuben (2012) (GAO et al., 2005; VON ZUBEN, 2012). O equipamento utilizado foi um HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC, com detector UV-Vis. Os parâmetros empregados na metodologia estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas empregadas na metodologia analítica.

Parâmetros	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250X4,6 mm; 5 µm ZORBAX C18
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 50 mM (pH 6,0) : metanol (70:30)
Fluxo	1,0 mL/min
λ de detecção	303 nm
Volume de injeção	20 µL
Tempo de retenção	±3,20 min

As soluções teste foram preparadas a partir de diluições de uma solução estoque do fármaco MTX, em fase móvel, na concentração de 100 µg.mL⁻¹.

5.4.2. Conformidade do sistema cromatográfico

Para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados são aptos a fornecer resultados aceitáveis e confiáveis, realizou-se a análise de cinco injeções da solução de MTX (25 µg.mL⁻¹) preparada em fase móvel, a partir da solução estoque.

O espectro de absorção do fármaco bem como o comprimento de onda de máxima absorção foi verificado e, a partir dos picos cromatográficos de cada injeção, avaliou-se o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das áreas, dos tempos de retenção (tR), dos números de pratos teóricos (N), do fator de cauda (FC) e da assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento utilizado.

5.4.3. Especificidade/Seletividade

Neste ensaio avaliou-se a interferência da matriz polimérica e dos meios utilizados no ensaio de dissolução, no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco. A especificidade/seletividade foi determinada verificando-se o resultado da injeção dos polímeros em solução e do filtrado das nanopartículas sem fármaco. Analisou-se também a interferência do meio de dissolução no Cromatograma do MTX. Todas as análises foram realizadas em triplicata com solução do fármaco e dos polímeros na concentração 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.4.4. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas do MTX, a partir da solução estoque. Foram preparadas 8 diluições com concentrações variando de 0,25 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A linearidade foi avaliada a partir da média dos valores das áreas encontradas e a equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

5.4.5. Precisão

A repetibilidade ou precisão intradia foi realizada a partir da injeção de três diluições da solução estoque de MTX, nas concentrações 5,0, 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ representantes, respectivamente, das concentrações baixa, média e alta, para análise na região do UV. As injeções foram realizadas no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do DPR% entre as determinações foi analisado. Para a precisão intermediária, realizou-se a análise das diluições da solução estoque de MTX em dois dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores de DPR% calculados.

5.4.6. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da solução estoque de MTX, diluída em fase móvel para as concentrações 5, 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (baixa, média e alta, respectivamente).

Realizou-se cinco injeções de cada concentração e a exatidão foi calculada por meio da Equação 5.

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{C}{C_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: C é a concentração média determinada experimentalmente e C_0 é a concentração teórica.

5.4.7. Limite de detecção e de quantificação

Para determinação do LD e do LQ, utilizou-se soluções do fármaco nas concentrações crescentes de 0,10; 0,15 e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtendo-se três curvas analíticas.

As áreas em triplicata foram obtidas e o LD e LQ calculados utilizando as Equações 6 e 7:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que: LD = limite de detecção, DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do y, IC = inclinação da curva de calibração e LQ = limite de quantificação.

5.5. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)

Após a formação das partículas, uma alíquota das formulações foi centrifugada a 14.000 rpm, em ultracentrifuga (ThermoScientific), por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,20 μm e a concentração de fármaco livre analisada por meio do método cromatográfico validado no item 5.4.

Para a determinação da porcentagem de MTX incorporada, aplicou-se a Equação 8.

$$EA\% = \frac{\text{massa total de MTX adicionada} - \text{massa de MTX livre no sobrenadante}}{\text{massa total de MTX adicionada}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

5.6. Estudo das propriedades mucoadesivas

5.6.1. Ensaio *in vitro* de interação com a mucina utilizando reagente de Lowry

A fim de estudar a capacidade mucoadesiva dos sistemas desenvolvidos, avaliou-se a capacidade de adsorção da mucina nas NPs, por meio do ensaio colorimétrico (DHAWAN et al., 2004; PREZOTTI et al., 2014; BONI et al., 2016).

Para o teste, uma massa de 20 mg de amostra liofilizada foi mantida em contato com 10 mL de solução aquosa de mucina tipo II (pH 5,5) em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), durante 1 hora, à 37°C. As amostras foram centrifugadas a 3.600 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de mucina livre, através do ensaio colorimétrico utilizando reagentes de Lowry (kit *Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification*-Sigma-Aldrich).

Adicionou-se às alíquotas de 1 mL do sobrenadante, 1 mL do reagente de Lowry e as soluções foram mantidas em repouso por 20 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu's. Após 30 minutos, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro UV-Visível em 749 nm. As concentrações de mucina livre no sobrenadante foram calculadas utilizando a equação obtida a partir da curva padrão de albumina (BSA): $y = 0,0085x + 0,0741$ e $r^2 = 0,9972$.

A quantidade de mucina adsorvida foi determinada indiretamente a partir da quantificação da mucina livre no sobrenadante, através da Equação 9.

$$Q_{\text{mucina adsorvida}} = Q_{\text{mucina adicionada}} - Q_{\text{mucina livre}} \quad (\text{Eq. 9})$$

5.6.1.1. Isotermas de adsorção de mucina

Com o objetivo de identificar os mecanismos relacionados ao processo de adsorção, foram plotadas isotermas, as quais relacionam os dados de concentração de mucina livre no sobrenadante (mg.L^{-1}) vs massa adsorvida às nanopartículas (mg.g^{-1}).

A partir das isotermas de adsorção, aplicou-se os modelos linearizados de Freundlich (Equação 10) e Langmuir (Equação 11).

$$\log Q_e = \log K + \frac{1}{n} \times \log C_e \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{\text{máx}} b} + \frac{C_e}{Q_{\text{máx}}} \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que: Q_e = massa de mucina adsorvida por massa de amostra, C_e = concentração de mucina livre no sobrenadante, K = constante de Freundlich que representa a capacidade de adsorção do material e n = constante que representa a intensidade da adsorção. $Q_{\text{máx}}$ e b são parâmetros da equação de Langmuir, em que: $Q_{\text{máx}}$ = constante que representa a máxima capacidade de adsorção na monocamada e b = constante de equilíbrio de adsorção, relacionada à energia de adsorção (LAN et al., 2001; LI et al., 2005).

Para aplicação do modelo de Freundlich, plotou-se o gráfico de $\log Q_e$ (mg.g^{-1}) vs $\log C_e$ (mg.L^{-1}) e, para o modelo de Langmuir plotou-se o gráfico C_e/Q_e (g.L^{-1}) vs C_e (mg.L^{-1}). Por meio da regressão linear, os valores das constantes para cada modelo foram obtidos, avaliando-se o que melhor se correlacionou aos dados, através dos maiores valores do coeficiente de determinação (r^2).

5.6.2. Estudo da interação entre a mucina e as nanopartículas a partir da análise do potencial zeta

De forma adicional, realizou-se o estudo da influência da interação com a mucina no potencial zeta das partículas, em valores de pH correspondentes ao meio gástrico e colônico. Soluções de mucina nas mesmas concentrações utilizadas no item 5.6.1. (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas e os valores de pH ajustados para 1,2 e 6,8, utilizando HCl 0,1N e NaOH 0,2N. Adicionou-se 500 μL da dispersão de nanopartículas em 1500 μL de dispersão de mucina e as misturas foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora à 37°C, em banho termostático. Em seguida, o potencial zeta das amostras foi determinado em equipamento Zetasizer Nano-ZS, em triplicata e, os resultados comparados com os valores das amostras sem adição de mucina (ANDREANI et al., 2015).

5.6.3. Avaliação da força e trabalho de mucoadesão

A força mucoadesiva das nanopartículas foi determinada utilizando o Analisador Universal de Textura (*TA-XT2 Texture Analyser - Stable Micro Systems*) no modo compressão. Como substrato biológico utilizou-se o tecido intestinal suíno, previamente hidratado em tampão fosfato (pH 6,8), (VARUM et al., 2010), à 37°C. Secções da mucosa de aproximadamente 4 cm² foram fixadas no suporte de acrílico, acessório do equipamento, e fixado à mesa do analisador.

As amostras liofilizadas foram fixadas, com o auxílio de fita dupla face Scotch® (3M™), na sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro (Figura 11). A sonda contendo a amostra foi movida perpendicularmente em direção à mucosa com velocidade constante de 0,5 mm.s⁻¹ e, introduzida em 0,5 mm de profundidade, a partir da superfície do tecido, permanecendo em contato por 120 s. Em seguida, a sonda foi removida em velocidade constante de 0,5 mm.s⁻¹ até a total separação das duas superfícies. A partir do gráfico de força *versus* distância, gerado pelo *software Texture Exponent Lite*, determinou-se a força máxima de mucoadesão, ou seja, a força necessária para separar a sonda com amostra ($F_{máx}$) e o trabalho de mucoadesão (T_{muc}), calculado a partir da área sob a curva do gráfico gerado.

Figura 11. Esquema ilustrativo da metodologia utilizada no ensaio de mucoadesão (A- disposição do tecido no suporte, B- amostras fixadas à sonda, C- sistema montado para a análise e D- análise em andamento).



Fonte: Próprio autor.

5.7. Estudos de dissolução do MTX

5.7.1. Estudo de solubilidade do MTX

A solubilidade do MTX foi determinada nos meios utilizados para o ensaio de dissolução – HCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8 (USP, 2011). Quantidades de fármaco

suficientes para se atingir a saturação foram adicionadas aos diferentes meios e submetidas a agitação mecânica por 48 horas, em velocidade constante e ao abrigo de luz. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 min e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45 µm. Os sobrenadantes foram diluídos, analisados pelo método cromatográfico validado e, quantificados a partir da equação da reta em cada meio testado. Os testes foram realizados em triplicata.

5.7.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do MTX

Para avaliação do perfil de liberação do fármaco incorporado às NPs, realizou-se o teste de dissolução *in vitro*, em incubadora com agitação orbital (digital shaker MA 420 – Marconi®), à $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, sob agitação de 60 rpm, de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Noronha e colaboradores (2017) (FERREIRA et al., 2017).

O teste foi conduzido em diferentes meios, buscando mimetizar as variações de pH ao longo do TGI: HCl 0,1 N (pH 1,2) durante 120 minutos e tampão fosfato (pH 6,8), durante 240 minutos.

De acordo com as condições *sink*, um volume da dispersão de nanopartículas respectivo a 8 µg de MTX foi adicionado à 1,1 mL dos respectivos meios de dissolução, em tubos eppendorf e, incubados nas condições descritas. Nos tempos pré-determinados, o meio foi coletado, filtrado em membrana de acetato de celulose 0,20 µm e a quantidade de fármaco liberada foi quantificada por meio do método analítico de CLAE, desenvolvido e validado no item 5.4.

O ensaio foi realizado com as amostras que apresentaram maior eficiência de associação (item 6.5), em triplicata, para cada tempo de coleta e meio de dissolução.

5.7.2.1. Análise da cinética de liberação do fármaco

Aos dados da dissolução *in vitro* foram aplicados diferentes modelos matemáticos (Primeira ordem, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixon & Crowell), utilizando o software Sigma Plot 10.0, para a avaliação do que melhor representasse a cinética de dissolução do MTX e seu mecanismo de liberação (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; DASH et al., 2010).

5.8. Estudos celulares

Os estudos celulares foram realizados durante o período de estágio no exterior (BEPE), financiado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP), junto ao grupo de pesquisa “Nanomedicines and Translational Drug Delivery” coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Sarmento, no Instituto de Inovação e Inovação em Saúde – I3S, da Universidade do Porto, Portugal.

Considerando a sensibilidade do método analítico empregado na quantificação do fármaco, para os testes de viabilidade e permeabilidade celular foi necessário o aumento da concentração polimérica das NPs, a fim de se alcançar maior teor de incorporação do fármaco. No entanto, a razão polimérica foi mantida de acordo com o item 6.2, a fim de não alterar as propriedades gerais do sistema. Dessa forma, as NPs obtidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro, potencial zeta, eficiência de associação e morfologia (item 6.8).

5.8.1. Ensaio de viabilidade celular

O experimento foi realizado com as linhagens celulares colorretais Caco-2 e HT29-MTX, utilizando o reagente MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo). Este ensaio de viabilidade é um ensaio colorimétrico, que se baseia na redução do sal de tetrazolium pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, presente na matriz mitocondrial de células viáveis. Como resultado da redução do sal de tetrazolium, que em solução apresenta coloração amarela, formam-se cristais de formazan, de cor violeta após a solubilização (SCUDIERO et al., 1988).

A concentração dos cristais formados é diretamente proporcional à intensidade da coloração e, conseqüentemente, à concentração de células viáveis e, pode ser avaliada quantitativamente por espectrofotometria (GOES et al., 2012).

Para o ensaio, ambas as linhagens celulares foram cultivadas em frascos individuais, contendo meio de cultura DMEM completo, de composição descrita no item 4.2. As células Caco-2 e HT29-MTX foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^4 células/poço e 1×10^4 células/poço, respectivamente e, incubadas à 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 24 h, para a adesão e formação de uma monocamada. Em seguida, o meio de cultura dos poços foi removido e as células lavadas 1 vez com tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4). Diluições em meio de cultura DMEM, do fármaco livre, polímeros e NPs sem e com

incorporação de fármaco, na faixa de concentração 0,01 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram preparadas e adicionou-se a cada poço 200 μL dessas preparações. As placas foram incubadas em 37°C, em atmosfera de CO_2 (5%) por 4 ou 24 h. Como *background* utilizou-se o meio DMEM e como controles positivo e negativo as células incubadas com meio de cultura e Triton X-100 1% (v/v), respectivamente. Após o período de incubação, as amostras foram removidas e as células lavadas com PBS (37°C), adicionando-se em seguida a cada poço 200 μL de solução de MTT (0,5 mg.mL^{-1}). As placas foram mantidas sob agitação, ao abrigo de luz, por 2 a 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e adicionou-se DMSO para a solubilização dos cristais de formazan, sob agitação, por 30 minutos.

A absorbância foi medida utilizando leitor de microplacas (Biotek Synergy 2, Winooski, EUA) em 570 e 630 nm (ALMEIDA, 2017; SILVA, 2017) e a porcentagem de viabilidade celular calculada a partir da Equação 12.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{valor de ABS experimental} - \text{valor de ABS do controle negativo}}{\text{valor de ABS do controle positivo} - \text{valor de ABS do controle negativo}} \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

5.8.2. Permeabilidade intestinal *in vitro*

O experimento de permeabilidade foi realizado em monocultura de Caco-2 e co-cultura tripla de células Caco-2:HT29-MTX:Raji B, de acordo com metodologia previamente padronizada por Antunes et al. (2013) e Araújo et al. (2013).

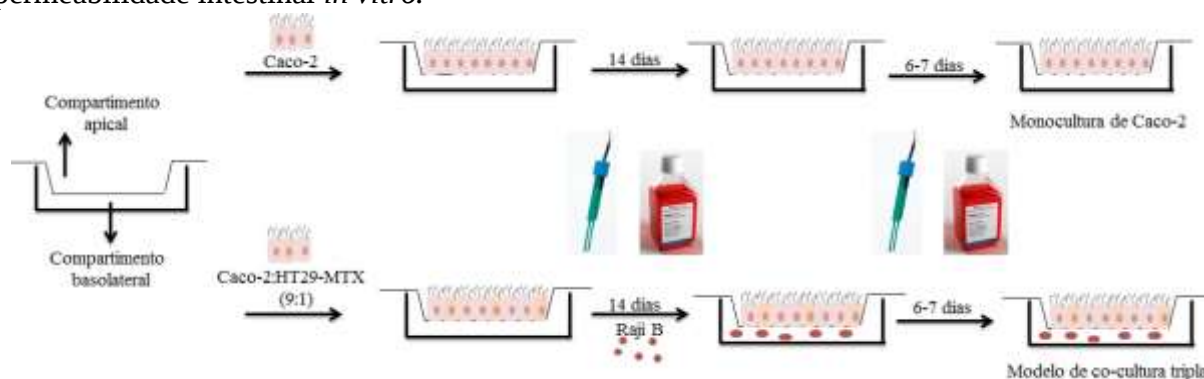
Para isso, as linhagens Caco-2 e Caco-2:HT29-MTX (proporção 9:1) foram semeadas no compartimento apical de insertes Transwell™ (membrana polimérica permeável e transparente, poro de 3 μm e área de 4.67 cm^2) para placas de 6 poços, na densidade de 1×10^5 células/ cm^2 , para cada poço. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições por 14 dias, com troca de meio de cultura a cada dois dias.

Para o acompanhamento da viabilidade celular e formação da monocamada realizou-se a medição da resistência transepitelial (TEER), utilizando o voltímetro epitelial EVOM equipado com eletrodo chopstick (World Precision Instruments, EUA). Um inserte contendo meio de cultura DMEM sem células foi mantido sob as mesmas condições, como um branco da resistência imposta pela membrana permeável. O valor final de TEER (Ω/cm^2) ajustado foi calculado a partir da Equação 13.

$$\text{TEER} = (\text{TEER medido} - \text{TEER branco}) \times \text{área inserte} \quad (\text{Eq. 13})$$

Após os 14 dias, adicionou-se ao compartimento basolateral de cada inserto, contendo as linhagens Caco-2:HT29-MTX, as células Raji B na densidade de 1×10^5 células/cm², para completar a formação do modelo triplo. Ambos os modelos foram mantidos em cultivo por mais 6 a 7 dias, com reposição do meio de cultura DMEM todos os dias, seguido da medição do valor de TEER, até a observação da confluência da monocamada (ANTUNES et al., 2013; ARAUJO; SARMENTO, 2013) (Figura 12).

Figura 12. Esquema do desenvolvimento dos modelos celulares utilizados no ensaio de permeabilidade intestinal *in vitro*.



Fonte: Próprio autor

Para o ensaio de permeabilidade, o meio de cultura do compartimento apical e basolateral dos insertos foi removido e as células lavadas duas vezes com solução balanceada de Hank's (HBSS). Os dois compartimentos foram então completados com HBSS e mantidos por 30 min, à 37°C, em incubadora com agitação orbital (IKA® KS 4000 IC) de 100 rpm, para o equilíbrio do sistema.

Os estudos foram conduzidos com dispersões do fármaco livre e NPs com incorporação de MTX, na concentração de $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em HBSS, em triplicata, para cada modelo, por 240 min. Nos tempos pré-determinados (5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min), retirou-se alíquotas de 200 μL do compartimento basolateral do inserto e o volume foi imediatamente repostado. Ao final do experimento uma alíquota do meio do compartimento apical foi coletada para quantificação do fármaco não permeado (ALMEIDA et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Após, os insertos foram lavados 2 vezes com HBSS e incubados sob as mesmas condições descritas anteriormente, por 30 min. As células aderidas à membrana foram então destacadas, utilizando 200 μL de tripsina e, lisadas com 1,5 mL de Triton-X, *overnight*. O

lisado de células foi centrifugado por 20 min a 14.000 rpm para a separação dos fragmentos celulares e o sobrenadante removido e filtrado para a quantificação de MTX internalizado ou associado às células e/ou a camada de muco (SHRESTHA et al., 2016).

O MTX foi quantificado, utilizando leitor de microplacas (Biotek Synergy 2, Winooski, EUA), por meio de espectrofotometria UV-Vis, em 303 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de permeabilidade, porcentagem de fármaco no compartimento apical do inserto e porcentagem associado às células ou camada de muco.

Calculou-se também a permeabilidade aparente (Papp) utilizando a Equação 14:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{A \times C_0 \times \Delta t} \quad (\text{Eq. 14})$$

Em que ΔQ representa a quantidade de MTX quantificado no compartimento basolateral (μg), A é a área superficial do inserto (cm^2), C_0 a concentração inicial de MTX no compartimento apical do Transwell™ ($\mu\text{g/mL}$) e Δt representa a duração do experimento (segundos).

5.8.2.1. Microscopia confocal de varredura a laser

Após o ensaio de permeabilidade avaliou-se visualmente a confluência e integridade das monocamadas por meio da microscopia confocal, conforme protocolo desenvolvido pelo grupo. Para isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% (m/v) por 30 min e permeabilizadas com Triton X-100 em PBS 0.2% (v/v) por 7 min. O bloqueio foi realizado utilizando PBST (PBS com 0.05% (v/v) de Tween-20) com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB)), por 30 minutos. Para a marcação das junções paracelulares utilizou-se anticorpo primário anti-occludina, produzido em coelhos (1:50, v/v), com incubação por 2 h, em temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a lavagem e incubação com o anticorpo secundário correspondente, conjugado a Alexa-Fluor 488 (1:200m v/v), durante 1 hora. Ambas as diluições dos anticorpos foram realizadas em PBST contendo 5% (v/v) de SFB. O núcleo celular foi contrastado utilizando DAPI (1:1000, v/v) com incubação de 1 h, à temperatura ambiente. Após a marcação, a membrana PET contendo as células foi lavada três vezes com PBS e fixada à lâmina para análise (LECHANTEUR et al., 2017).

5.9. Análise estatística

Utilizou-se a análise de variância ANOVA, com comparação de médias de acordo com o pós teste de Tukey, para o tratamento dos resultados. Foi considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação dos materiais e condições para obtenção das NPs

Os materiais selecionados para o desenvolvimento do sistema foram avaliados quanto a massa molecular, segundo coeficiente virial e densidade de carga. A partir dos resultados, realizou-se a escolha das condições mais favoráveis para a formação das nanopartículas.

6.1.1. Determinação da massa molecular e segundo coeficiente virial dos polímeros

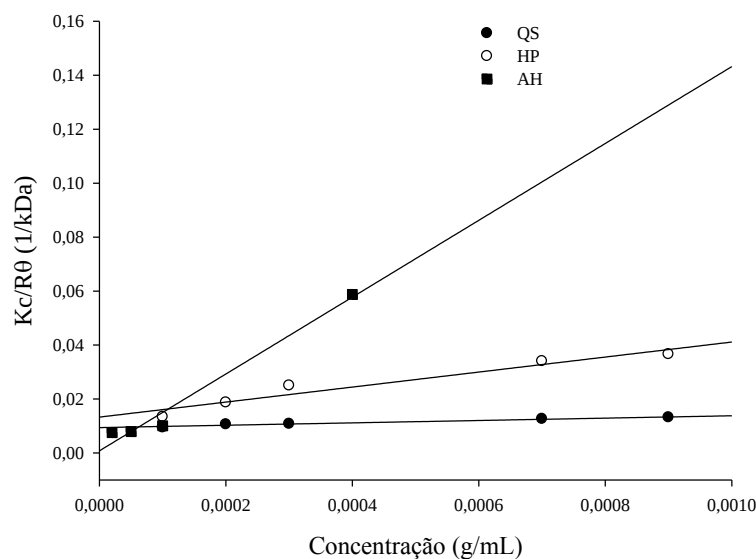
O conhecimento da massa molecular (M_w) dos polímeros utilizados na obtenção das nanopartículas é fundamental pois esta propriedade pode influenciar as características do sistema desenvolvido tais como conformação estrutural, tamanho, forma, eficiência de encapsulação e capacidade mucoadesiva. Já o segundo coeficiente virial (A_2) é um importante parâmetro, obtido da equação da reta do gráfico de Debye, que descreve a força de interação do polímero com o solvente e pode indicar a disposição espacial da cadeia polimérica (WYATT, 1993; RODEMBUSCH, 2001).

A técnica de espalhamento de luz estático é uma técnica amplamente utilizada para a análise das propriedades estruturais dos polímeros em solução. Nesta técnica, a intensidade total de luz dispersa pelas partículas presentes na amostra, durante um tempo médio se correlaciona com sua respectiva concentração (MURPHY, 1997). Dessa forma pode-se determinar com um único experimento a M_w e o A_2 , propriedades estáticas da molécula solvatada (WYATT, 1993; RODEMBUSCH, 2001).

Como a intensidade de luz dispersa por uma partícula é proporcional à sua concentração, a M_w foi obtida a partir do intercepto da reta com a concentração zero do gráfico de Debye (Figura 13).

A QS e o HP apresentaram M_w de $106,38 \pm 3,78$ kDa e $75,18 \pm 3,99$ kDa, respectivamente, enquanto para o AH a M_w foi de $1294,067 \pm 41,94$ kDa.

A QS é um polissacarídeo linear e, dependendo da fonte de extração e processo de obtenção, pode apresentar M_w na faixa de 50-2000 kDa (MEERA; ABRAHAM, 2006; RINAUDO, 2011). De acordo com o resultado, é possível classificar a QS utilizada na obtenção das NPs, como de baixa massa molecular.

Figura 13. Gráfico de Debye.

A QS de baixa massa molecular (LMW) apresenta características promissoras para a aplicação no desenvolvimento de nanopartículas. Comparando-se a QS LMW com a de elevada massa molecular, esta apresenta maior biodegradabilidade e biocompatibilidade (CHAE et al., 2005). Gun e coautores (2005) estudaram o efeito da massa molecular da QS no tamanho de nanopartículas reticuladas com tripolifosfato (TPP) e observaram que a utilização da QS de baixa massa molecular reduziu significativamente o tamanho das nanopartículas. Efeito semelhante foi observado por Yang e Hon (2009) em estudos com nanopartículas de QS reticuladas com TPP para veiculação de 5-fluoracil, em que foi relatado o aumento da esfericidade com a redução da Mw da QS (YANG et al., 2014).

O HP analisado é de elevada Mw, o qual apresenta maior resistência ao pH ácido e consequentemente é mais eficiente no desenvolvimento de sistemas que visam o controle das taxas de liberação do fármaco nas porções superiores do TGI (MEEHAN, 2006). Wang e coautores (2004) utilizaram HP na obtenção de nanoesferas pelo método de evaporação do solvente, alcançando alta eficiência de encapsulação de ciclosporina e elevado controle das taxas de liberação do fármaco em meio ácido (WANG et al., 2004).

O AH é uma glicosaminaglicana capaz de estabelecer ligações específicas a receptores de superfície celular e pode ser constituído de até 10.000 dissacarídeos, característica que confere uma estrutura volumosa e rígida à molécula. Dependendo das características, o AH

pode apresentar diversas funções biológicas. De acordo com o resultado encontrado, o AH analisado é de elevada massa molecular. O uso deste tipo de AH é vantajoso no desenvolvimento de sistemas para liberação direcionada à região colônica, principalmente por ser biodegradável, não imunogênico e apresentar potencial ação antiangiogênica, diferentemente dos AH de baixa massa molecular, os quais funcionam como sinalizadores de importantes eventos inflamatórios, metastáticos e imunogênicos (LEE; SPICER, 2000; STERN et al., 2006). Em estudo com nanopartículas lipídicas revestidas com AH, Mizrahy e co-autores demonstraram que o aumento da afinidade da ligação com os receptores CD44 foi proporcional ao aumento da Mw. A baixa imunogenicidade dessas nanopartículas também foi evidenciada (MIZRAHY et al., 2011).

Os valores de A_2 obtidos foram $0,002435 \pm 9,12 \cdot 10^{-5} \text{ mL.mol/g}^2$ para a QS, $0,0136 \pm 9,9 \cdot 10^{-4} \text{ mL.mol/g}^2$ para o HP e $0,0702 \pm 8,51 \cdot 10^{-3} \text{ mL.mol/g}^2$ para o AH.

Quando o valor de A_2 é positivo, considera-se que a interação polímero-solvente é grande e o solvente escolhido é adequado para a solvatação das cadeias poliméricas. Caso ocorra forte interação polimérica inter e intramolecular, o valor de A_2 será negativo, consequentemente o solvente escolhido favorece a aglomeração molecular (MURPHY, 1997; RODEMBUSCH, 2001).

Para todos os polímeros analisados os valores foram positivos, portanto, os solventes utilizados são adequados para a posterior utilização na obtenção das nanopartículas, já que devem minimizar a agregação intermolecular, tornando os grupamentos amina da quitosana e carboxila do AH e HP mais disponíveis para a interação eletrostática e formação das partículas durante o processo de complexação (VALENTE et al., 2005).

6.1.2. Escolha do valor de pH para o desenvolvimento das NPs

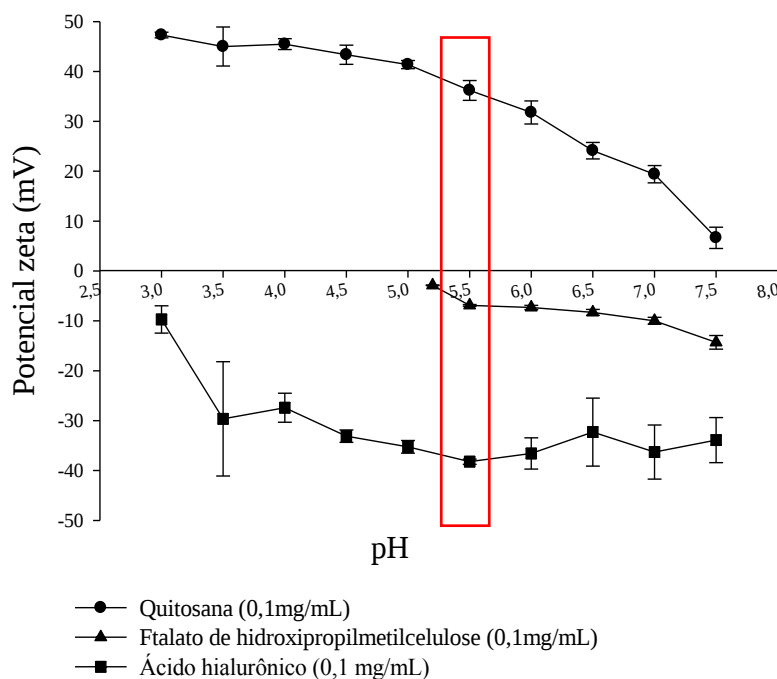
Os CPEs são formados a partir da mistura de, ao menos, dois polieletrólitos de cargas opostas, em meio aquoso. O processo de complexação ocorre de forma difusa e aleatória, levando a formação de uma malha hidrofílica, eletronicamente carregada (BERGER et al., 2004; SCHATZ et al., 2004; PEDREIRO, 2016).

Dentre os parâmetros que podem influenciar a formação e as propriedades dos CPEs, pode-se destacar a densidade de carga polimérica, uma vez que para que a reação de complexação ocorra deve haver uma forte interação entre os grupamentos ionizados dos polímeros (BUCHHAMMER et al., 2003; PICONE; CUNHA, 2013).

A densidade de carga do polímero depende de sua ionização, a qual pode ser controlada pelo pH do meio de dispersão.

Dessa forma, realizou-se o estudo do potencial zeta dos polímeros em função do pH do meio, resultando no perfil representado na Figura 14.

Figura 14. Influência do valor de pH no potencial zeta dos polímeros.



Para os valores de pH entre 3 e 5,5, a QS apresentou valores de potencial zeta entre +50 mV e +45 mV e uma redução da densidade de carga foi observada a partir do valor de pH 6,0, alcançando +6,5 mV em pH 7,5. A redução do potencial zeta observada deve-se ao valor de pKa da QS (~6,0) (RINAUDO, 2011; PICONE; CUNHA, 2013). Em valores de pH próximos ao pKa, a redução da carga positiva é resultante da desprotonação dos grupamentos amino primários da QS.

Diferentemente, o AH é um polissacarídeo aniônico, devido a ionização dos grupamentos carboxílicos das unidades de ácido- β -glicurônico, em valores de pH acima do seu valor de pKa ~3,0. A partir do valor de pH 3,5, houve aumento significativo da densidade de carga negativa do AH, para a faixa de -35 mV.

Devido a limitação de solubilidade do HP, em valores de pH inferiores ao seu pKa (~5,3), a análise foi realizada em valores de pH de 5,3 a 7,5. O grau de substituição dos

grupos alcóxi e carboxibenzoíla determina as propriedades desse polímero, dentre elas a solubilidade, proveniente da dissociação dos respectivos ácido carboxílicos presentes nos substituintes (MEEHAN, 2006). Com o estudo do HP utilizado, não observou-se significativa alteração de potencial zeta, que foi mantido em torno de -10 mV na faixa de pH 5,3-7,5.

Para que ocorra a formação dos CPEs, os polímeros devem apresentar elevada densidade de cargas opostas, reduzindo as interações intramoleculares e favorecendo a interação eletrostática intermolecular. Portanto, foi selecionado o pH 5,5 para o desenvolvimento das NPs.

6.2. Desenvolvimento das NPs

A associação dos polímeros explorada nesse trabalho foi uma estratégia racional para se agregar ao sistema as propriedades favoráveis de cada um dos materiais como as propriedades mucoadesivas da QS e a possibilidade de funcionalização com o AH, possibilitando uma interação mais específica com as células intestinais e tumorais. A incorporação do HP, um polímero com solubilidade pH dependente, por sua vez, foi realizada com objetivo de prevenir a degradação do sistema no ambiente ácido do estômago, após a administração oral, uma vez que a terapia vetorizada para o cólon pode permitir regimes posológicos alternativos, exposição contínua das células/tecidos ao fármaco, em concentrações mais seguras (WIN; FENG, 2005; CARBINATTO et al., 2012; SOARES et al., 2013; MENEGUIN et al., 2014; PREZOTTI et al., 2014).

Considerando as vantagens inerentes à técnica e as propriedades físico-químicas destes polímeros, utilizou-se para obtenção dos sistemas de liberação a técnica de complexação polieletrólítica (CUI; MUMPER, 2001; TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007; LIU et al., 2008; CHEN et al., 2011).

No presente estudo, a QS utilizada, como descrito no item 6.1.1, é de baixa massa molecular e de alto grau de desacetilação (90%), características que conferem alta densidade de carga positiva e uma conformação estrutural mais rígida (KAWAHARA et al., 2003; Pedreiro, 2016). Em comparação à QS, o AH apresenta menor densidade de carga negativa (item 6.1.2), devido ao teor de ácido glicurônico de 46,62% (dado do fabricante). Entretanto, é um polissacarídeo de elevada massa molecular que em meio aquoso, em concentrações maiores que 0,1%, assume uma conformação enovelada randômica, semiflexível e estável,

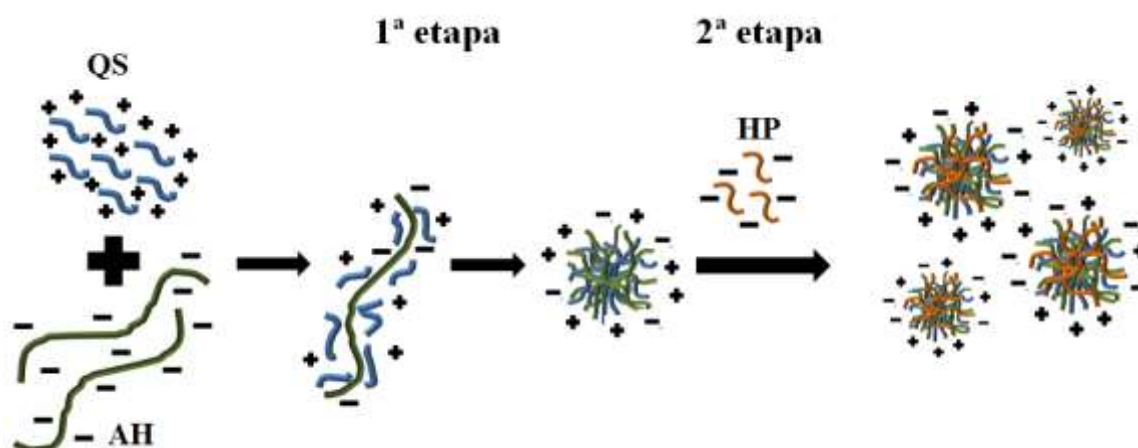
proveniente das interações entre suas cadeias laterais (HARGITTAI; HARGITTAI, 2008; BECKER et al., 2009; PAN et al., 2013).

O HP apresenta 31% de grupamentos ftalil. Sua conformação molecular depende principalmente do pH do meio, em valores abaixo de 5,3 as moléculas de HP se organizam como esferas rígidas, formando precipitados, enquanto que em valores superiores as moléculas se arranjam de forma aleatória (MEEHAN, 2006).

A compreensão dessas características dos materiais e da organização espacial das macromoléculas em solução pode auxiliar no entendimento de sua organização durante o processo de complexação e formação da estrutura supramolecular do sistema.

Baseado na teoria de formação dos CPEs e nas características dos polímeros, citadas anteriormente, é possível admitir que durante a formação das nanopartículas, apesar de menor densidade de cargas do AH, sua elevada massa molecular associada a uma conformação aleatória permita a interação eletrostática com diversas moléculas de QS, as quais apresentam elevada densidade de cargas positivas, porém estrutura mais rígida (SCHATZ et al., 2004). Para as partículas contendo HP, o polímero deverá interagir com o sistema QS:AH pré-formado, depositando-se ao redor e no interior da matriz (Figura 15).

Figura 15. Representação esquemática da formação das nanopartículas.



Fonte: Próprio autor.

Na fase preliminar de desenvolvimento, a formação das NPs foi conduzida utilizando-se diferentes proporções poliméricas (Tabela 3), sem adição de fármaco. Realizou-se então uma análise macroscópica das dispersões formadas. Para a classificação visual utilizou-se os

seguintes critérios: A para agregado, O para dispersão opalescente e L para límpido (Figura 16).

Figura 16. Classificação visual das nanopartículas: (A) agregado; (O) opalescente e (L) límpido.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3. Avaliação visual da influência da variação de proporção polimérica na aparência das dispersões.

Proporção QS:AH:HP (m/m/m)	Classificação visual
1:1:0	L
1:0,5:0	O
1:0,2:0	O
1:0,1:0	O
1:1:1	L
1:0,5:0,5	O
1:0,2:0,2	O
1:0,1:0,1	O
1:1:2	A
1:1:5	A
1:1:8	A
1:1:10	A
1:1:12	A
1:1:20	A

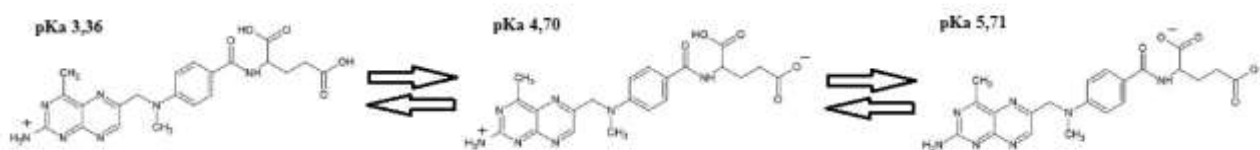
A mistura das dispersões de QS e AH sob agitação magnética, em todas as proporções testadas, exceto 1:1:0, permitiu a formação dos sistemas particulados, que pôde ser detectado visualmente pelo efeito de turvação do meio.

Para as amostras contendo QS:AH:HP, houve a formação de agregados para todas as amostras com maior proporção do poliânion, em relação à QS. Provavelmente, as partículas obtidas formadas com a mistura de QS:AH apresentavam carga positiva em excesso, pela maior proporção de QS. À medida que o HP foi adicionado ao sistema, a densidade de carga foi reduzida, aproximando-se do potencial zeta nulo (ponto isoelétrico). Consequentemente, houve a redução da repulsão eletrostática entre as partículas, induzindo uma forte e rápida agregação secundária das partículas por meio de interações fracas, ocasionando uma separação de fase macroscópica, caracterizada por um sobrenadante límpido e um precipitado volumoso (MAKHLOF et al., 2011).

Para adição do fármaco e posterior caracterização do sistema, foram selecionadas as partículas com maior proporção de QS em relação aos polímeros aniônicos, as quais visualmente apresentaram a característica opalescente.

Considerando a importância das cargas superficiais no processo de complexação, a incorporação do MTX ao sistema foi realizada com base em seus três valores de pKa: 3,36; 4,70 e 5,71. Em valores de pH entre 4,7 e 3,36, o MTX é praticamente insolúvel por estar na forma zwitteriônica (Figura 17), no entanto ao adicioná-lo na solução de QS de valor de pH 5,5, provavelmente ocorre o predomínio de cargas negativas na molécula, favorecendo a interação eletrostática com o polycation e, consequentemente sua incorporação no sistema, de acordo com a teoria de formação dos CPEs (RAHMAN et al., 1998).

Figura 17. Estrutura química e formas ionizadas do MTX.



Fonte: Próprio autor.

Após a adição do MTX aos sistemas selecionados, o pH e aparência opalescente foi mantida. Cada amostra foi denominada utilizando o prefixo N seguido de AH para as NPs contendo QS:AH ou HP para aquelas contendo QS:AH:HP, o número na sigla representa a proporção de AH ou AH:HP, no sistema. A ausência de fármaco foi indicada com sufixo -0,

para as NPs contendo 1% de MTX utilizou-se o sufixo -1 e para as contendo 5% de MTX, o sufixo -5, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Nomenclatura e composição das nanopartículas.

Sigla	(QS:AH:HP)	Concentração de fármaco (%)
NAH0,5-0	1:0,5:0	0
NHP0,5-0	1:0,5:0,5	0
NHP0,5-1	1:0,5:0,5	1
NHP0,5-5	1:0,5:0,5	5
NAH0,2-0	1:0,2:0	0
NAH0,2-5	1:0,2:0	5
NHP0,2-0	1:0,2:0,2	0
NHP0,2-1	1:0,2:0,2	1
NHP0,2-5	1:0,2:0,2	5
NAH0,1-0	1:0,1:0	0
NAH0,1-5	1:0,1:0	5
NHP0,1-0	1:0,1:0,1	0
NHP0,1-1	1:0,1:0,1	1
NHP0,1-5	1:0,1:0,1	5

6.3. Caracterização das nanopartículas

6.3.1. Análise de tamanho, PDI e potencial zeta

Entre os principais desafios no desenvolvimento e desempenho de NPs, como sistema de liberação vetorizada de fármacos, destaca-se a obtenção de um sistema fisicamente estável e com diferencial interação biológica (Kumari et al., 2010). Neste sentido, a modulação de características como tamanho da partícula e potencial zeta pode, além de conferir a estabilidade desejada ao sistema pode favorecer as interações na nano-biointerface (WIN; FENG, 2005; NEL et al., 2009).

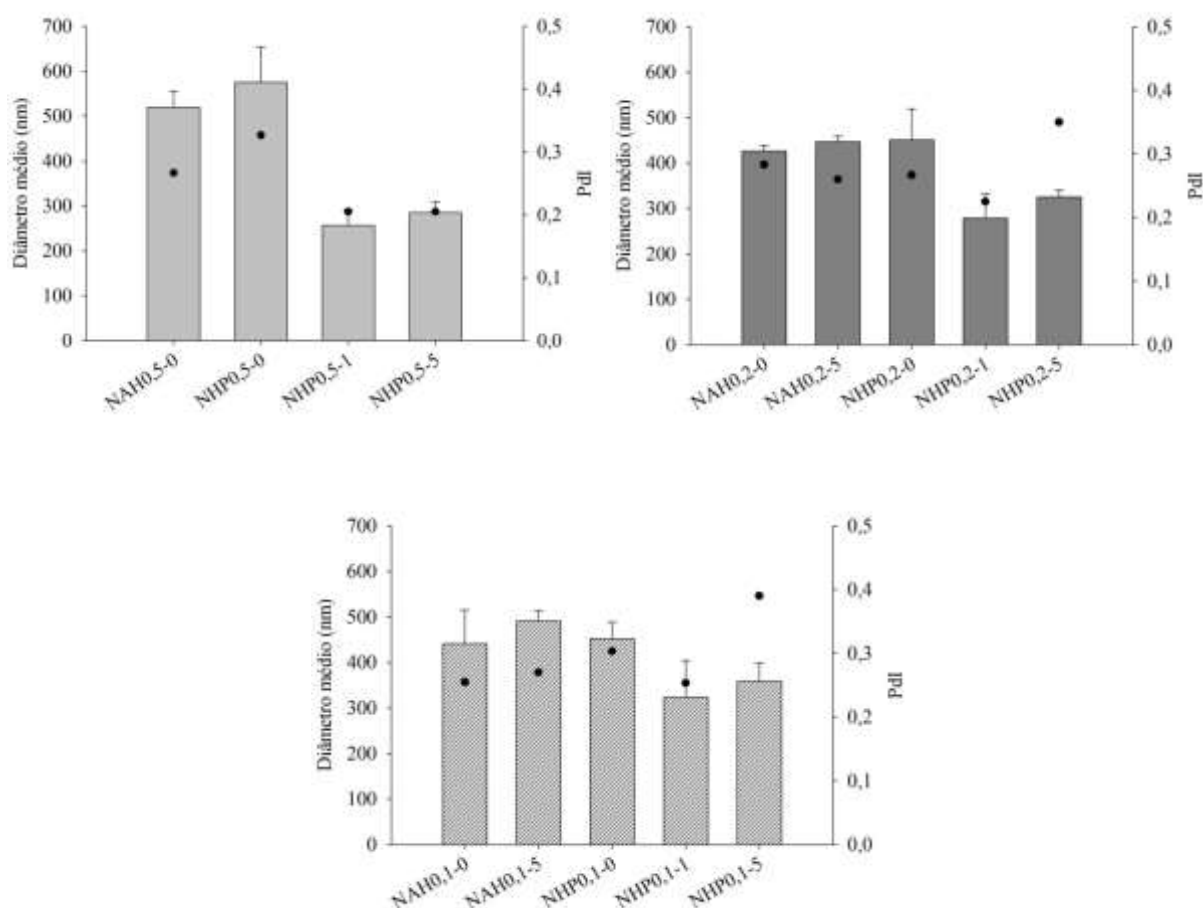
Diversos fatores podem influenciar o tamanho e potencial zeta das partículas, como o material utilizado, a concentração polimérica e o grau de complexação (AVADI et al., 2010).

Como demonstrado na Figura 18, as NPs compostas por QS:AH apresentaram diâmetro médio entre 426,53 e 519,08 nm. Para as compostas por QS:AH:HP, o diâmetro

manteve-se na faixa de 451,73 a 574,95 nm, indicando que a adição de HP à matriz não alterou de forma significativa o tamanho das NPs ($p>0,05$). Entre essas amostras, a NHP0,1-0 apresentou menor diâmetro médio (451,73 nm), comparado à NHP0,5-0 e a NHP0,2-0 (574,95 nm e 495,73 nm, respectivamente) ($p<0,05$).

O PDI das amostras sem adição de MTX variou de 0,26 a 0,33 (Figura 18), demonstrando a homogeneidade na distribuição de tamanho, já que valores de PDI acima de 0,5 classificam os sistemas como polidispersos (GAUMET et al., 2008; AVADI et al., 2010).

Figura 18. Diâmetro médio (nm) representado pelas barras e índice de polidispersão representado pelos pontos das nanopartículas com e sem adição de fármaco.



Da mesma forma, as nanopartículas com adição de MTX foram analisadas e os resultados estão também apresentados na Figura 18.

A adição de MTX não alterou de forma significativa o diâmetro médio das amostras NAH0,2-5 e NAH0,1-5, em contrapartida, em todas as amostras compostas por QS:AH:HP, a

adição do fármaco provocou uma redução significativa nos diâmetros médios ($p < 0,05$), que variaram de 216,83 a 345,03 nm (Figura 18).

O MTX, no valor de pH da dispersão polimérica, apresenta-se carregado negativamente. Possivelmente, o fármaco promoveu pontos adicionais de interação eletrostática entre os grupamentos ionizáveis dos polímeros, causando um rearranjo das cadeias poliméricas e a formação de uma malha mais compacta e consequentemente uma partícula de menor tamanho (KULKARNI et al., 2011; ABOLMAALI et al., 2013).

Observou-se ainda, que o aumento da concentração de MTX de 1% para 5% promoveu um discreto aumento no diâmetro médio das partículas (Figura 18), provavelmente pelo maior número de moléculas de fármaco disponíveis para ocupar os espaços intersticiais da malha polimérica, expandindo sua estrutura (PREZOTTI et al., 2012).

O valor de PDI observado para essas amostras variou de 0,21 a 0,39, indicando homogeneidade da distribuição de tamanhos, mesmo após a associação do MTX (Figura 18).

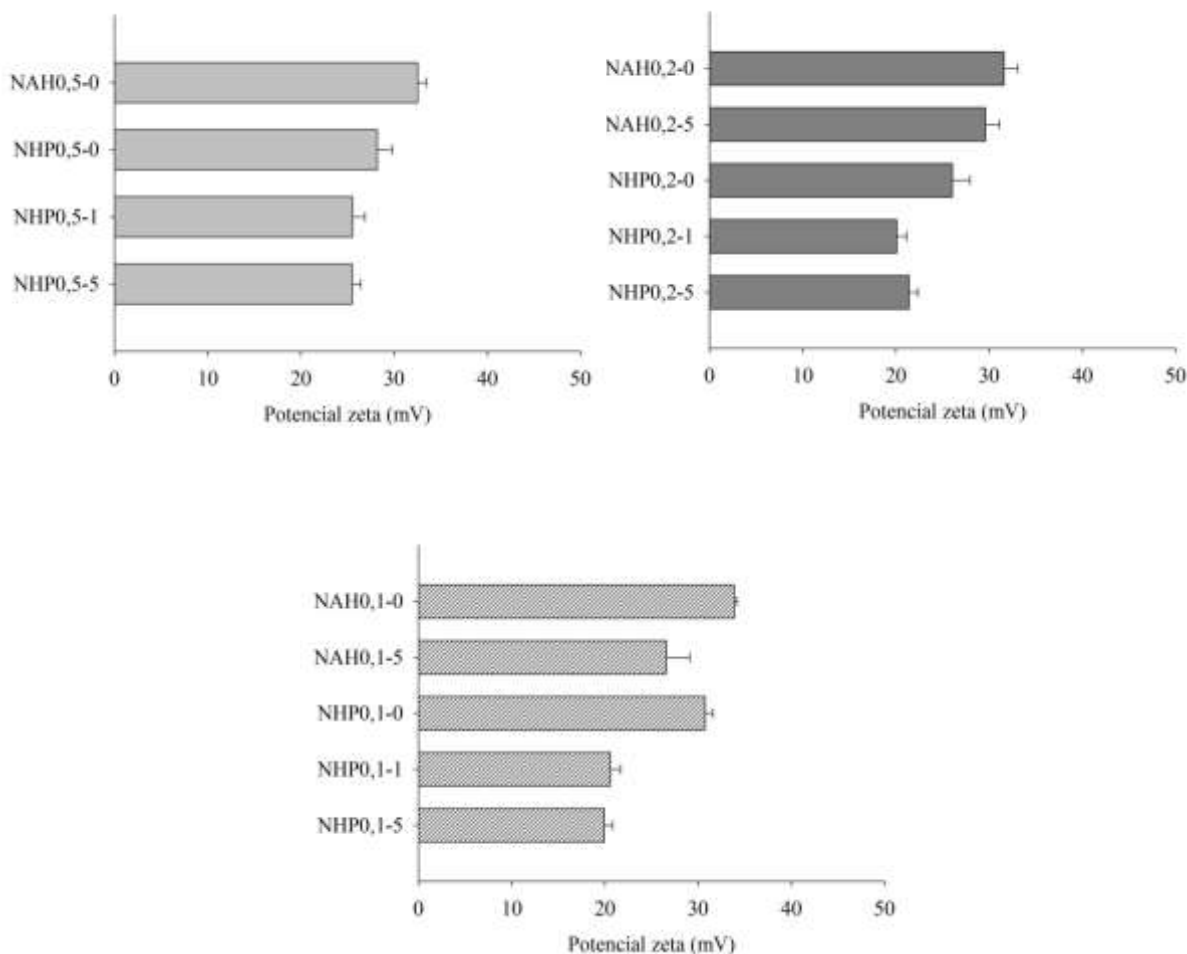
A redução no diâmetro das nanopartículas, após a incorporação do fármaco, pode representar uma vantajosa característica, considerando que partículas com diâmetro na faixa de 200-500 nm, devem estabelecer interações mais fortes e por períodos mais longos com a mucina (SOSNIK et al., 2014). Além disso, o reduzido tamanho (< 500 nm) pode resultar no aumento da internalização celular (SHANG et al., 2014).

Em relação ao potencial zeta, as amostras sem adição de MTX, apresentaram elevada densidade de carga positiva, com valores entre +33,80 e +26,07 mV, como pode ser observado na Figura 19.

As NPs obtidas podem ser consideradas estáveis, uma vez que valores elevados de potencial zeta, em módulo na faixa de 30 mV, indicam formulações fisicamente mais estáveis, pois há repulsão eletrostática entre as partículas, prevenindo a agregação (PARVEEN; SAHOO, 2010).

Nas partículas compostas por QS:AH, a elevada carga positiva, mesmo após a adição de fármaco, deve ser resultante do maior número de grupamentos amina protonados livres da QS, que não interagiram com os grupamentos COO⁻ do AH e do MTX.

A partir da Figura 19, também é possível observar que as nanopartículas contendo HP apresentaram menor valor de potencial zeta ($p < 0,05$). Dessa forma, a redução do potencial zeta observada para as NPs compostas de QS:AH:HP, pode indicar que houve a incorporação do polímero gastrorresistente à matriz.

Figura 19. Potencial zeta das nanopartículas com e sem adição de HP e MTX.

A incorporação de MTX às NPs compostas por QS:AH:HP resultou em uma redução significativa nos valores de potencial zeta ($p < 0,05$), em comparação com as amostras sem fármaco, permanecendo entre +19,88 e +25,30 mV, como pode ser observado na Figura 19.

A concentração de fármaco de 1% para 5% não alterou de forma significativa o potencial zeta das amostras ($p > 0,05$).

A carga superficial das partículas desempenha um papel importante no processo de interação com a membrana celular, de característica aniônica devido à presença de proteoglicanas com grupamentos livres como o ácido siálico.

Portanto, o potencial zeta positivo das NPs contendo MTX é desejável, por favorecer uma forte adesão à superfície das células, facilitando consequentemente a translocação da partícula através da membrana por endocitose (ALBANESE et al., 2012).

Villanueva e coautores (2009), em estudo com nanopartículas magnéticas, avaliaram que as partículas revestidas com polímero catiônico apresentaram elevadas taxas de internalização em células de adenocarcinoma cervical, comparando-se com as nanopartículas neutras e aniônicas (VILLANUEVA et al., 2009).

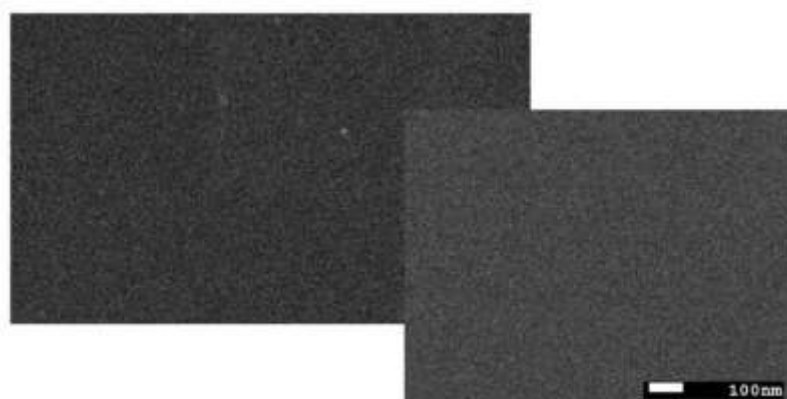
6.3.2. Análise de morfologia das nanopartículas

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) é uma técnica versátil para análise de forma e tamanho de materiais sólidos, micro e nanoestruturados. Possui alta resolução e fornece imagens em que a aparência tridimensional da amostra pode ser observada, como resultado da grande profundidade de campo. Contudo, a imagem é capturada sob alto vácuo, o que requer tratamento prévio da amostra (DUBES et al., 2003; GAUMET et al., 2008).

Neste estudo, além da morfologia, avaliou-se o tamanho das partículas a partir das imagens, com base no diâmetro de Feret a 0°, o qual é determinado a partir da distância média estabelecida entre duas linhas paralelas tangenciais ao perímetro projetado da partícula (WALTON, 1948).

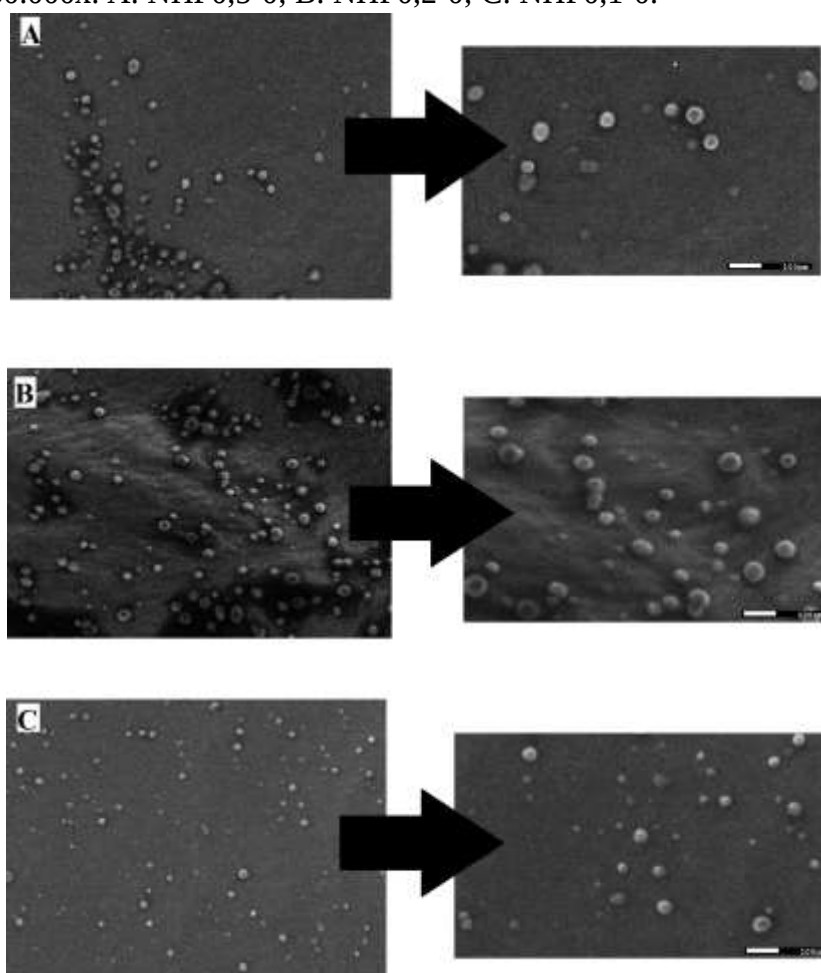
A solução de Tween 20 utilizada na diluição das amostras foi avaliada para garantir que não houvesse interferência na avaliação da estrutura das nanopartículas, com por exemplo a formação de micelas do surfactante. Como pode ser observado na Figura 20, não houve formação de nenhuma estrutura que pudesse interferir na visualização do sistema.

Figura 20. Fotomicrografia da solução de Tween 20 utilizada como meio de diluição das amostras, nos aumentos 25.000x e 50.000x.



Seguindo o estudo com as amostras QS:AH:HP, a partir das fotomicrografias obtidas é possível observar a escala nanométrica e a forma esférica da nanopartículas, sem adição de MTX (Figura 21).

Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sem fármaco, aumento 25.000x e 50.000x. A: NHP0,5-0; B: NHP0,2-0; C: NHP0,1-0.

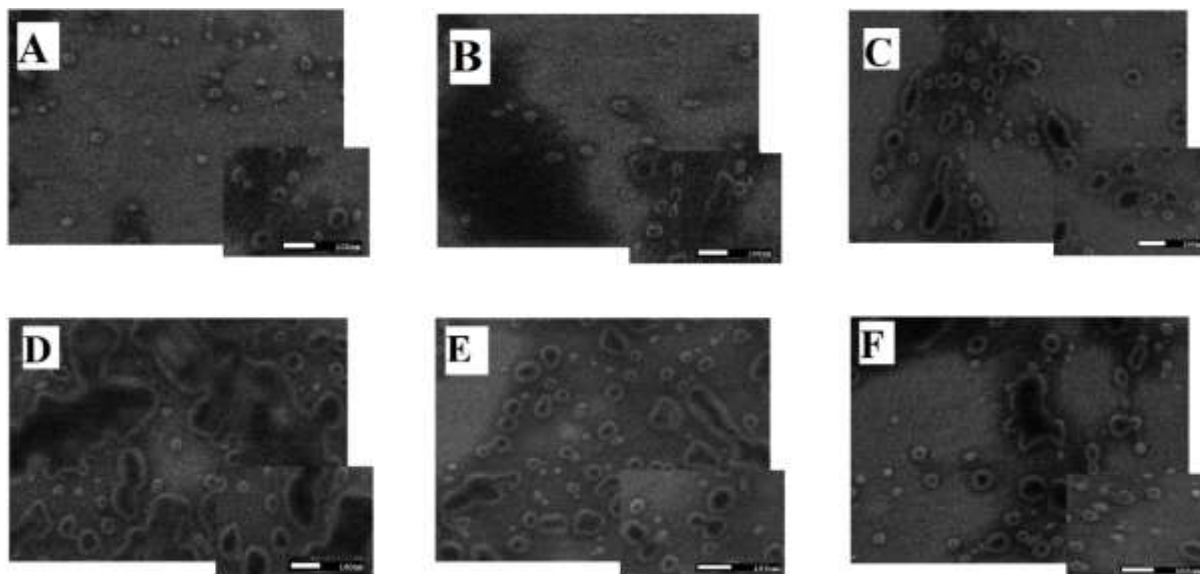


Para as nanopartículas contendo MTX, as fotomicrografias estão apresentadas na Figura 22.

É possível observar que a adição de fármaco não alterou a estrutura das partículas, que manteve-se esférica, assim como a escala nanométrica. No entanto, comparando-se com a Figura 21, é possível observar a presença de uma maior variedade de tamanhos de partícula, provavelmente devido à incorporação do fármaco à matriz.

É possível sugerir também que houve maior aglomeração dessas amostras, em comparação com as sem fármaco, possivelmente pela redução do potencial zeta observada no item 6.3.1 e, conseqüentemente da repulsão entre as nanopartículas.

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas, aumento 25,000x e 50,000x. A: NHP0,5-1; B: NHP0,5-5; C: NHP0,2-1; D: NHP0,2-5; E: NHP0,1-1 e F: NHP0,1-5.



Baseando-se nas imagens, realizou-se a medida do diâmetro de Ferret 0° para 100 nanopartículas, determinando-se os perfis de distribuição granulométrica das amostras sem (Figura 23) e com adição de MTX (Figura 24).

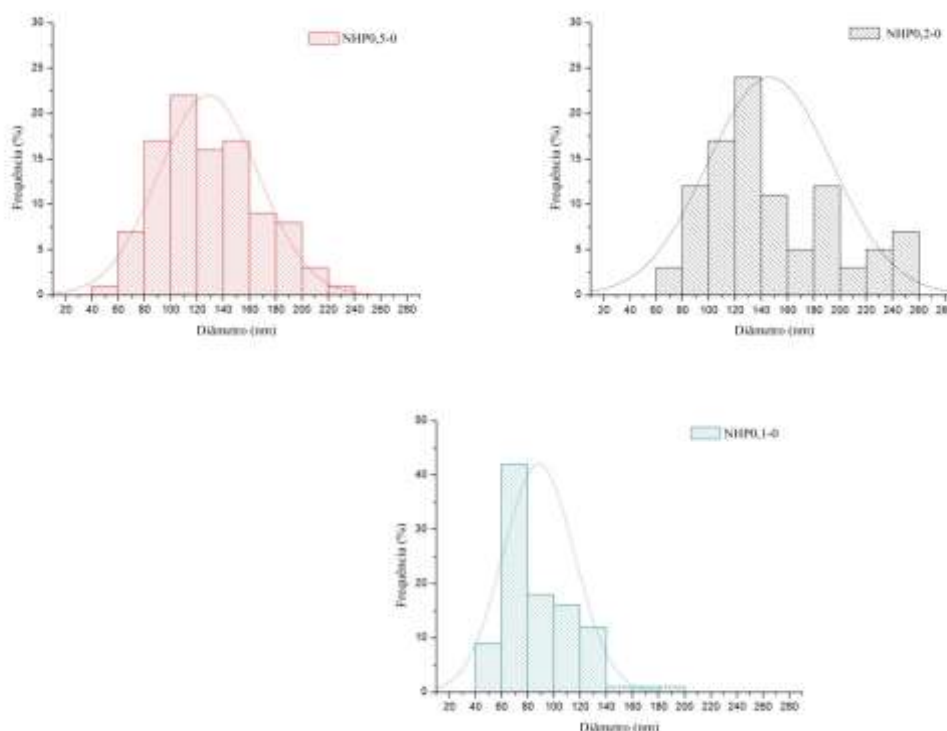
Como é possível observar na Figura 23, as amostras NHP0,5-0 e NHP0,2-0, apresentaram perfis de distribuição semelhantes. A amostra NHP0,1-0 com menor proporção de polímeros aniônicos, apresentou 42% das partículas na faixa de tamanho de 60 a 80 nm, enquanto a NHP0,5-0 e NHP0,2-0 apresentaram maior frequência de 22,5% e 25% das partículas na faixa de 100 a 120 nm e 120 a 140 nm, respectivamente.

Os perfis representados na Figura 23 evidenciam diâmetros aproximadamente cinco vezes menores do que os obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, para todas as amostras.

Observa-se na Figura 24, que mesmo com a adição de MTX, as amostras NHP0,5-1, NHP0,5-5, NHP0,2-1 e NHP0,2-5 continuaram apresentando perfis de distribuição

semelhantes, enquanto as amostras NHP0,1-1 e NHP0,1-5, apresentaram distribuições de tamanho mais heterogêneas.

Figura 23. Distribuição granulométrica das nanopartículas sem adição de MTX.



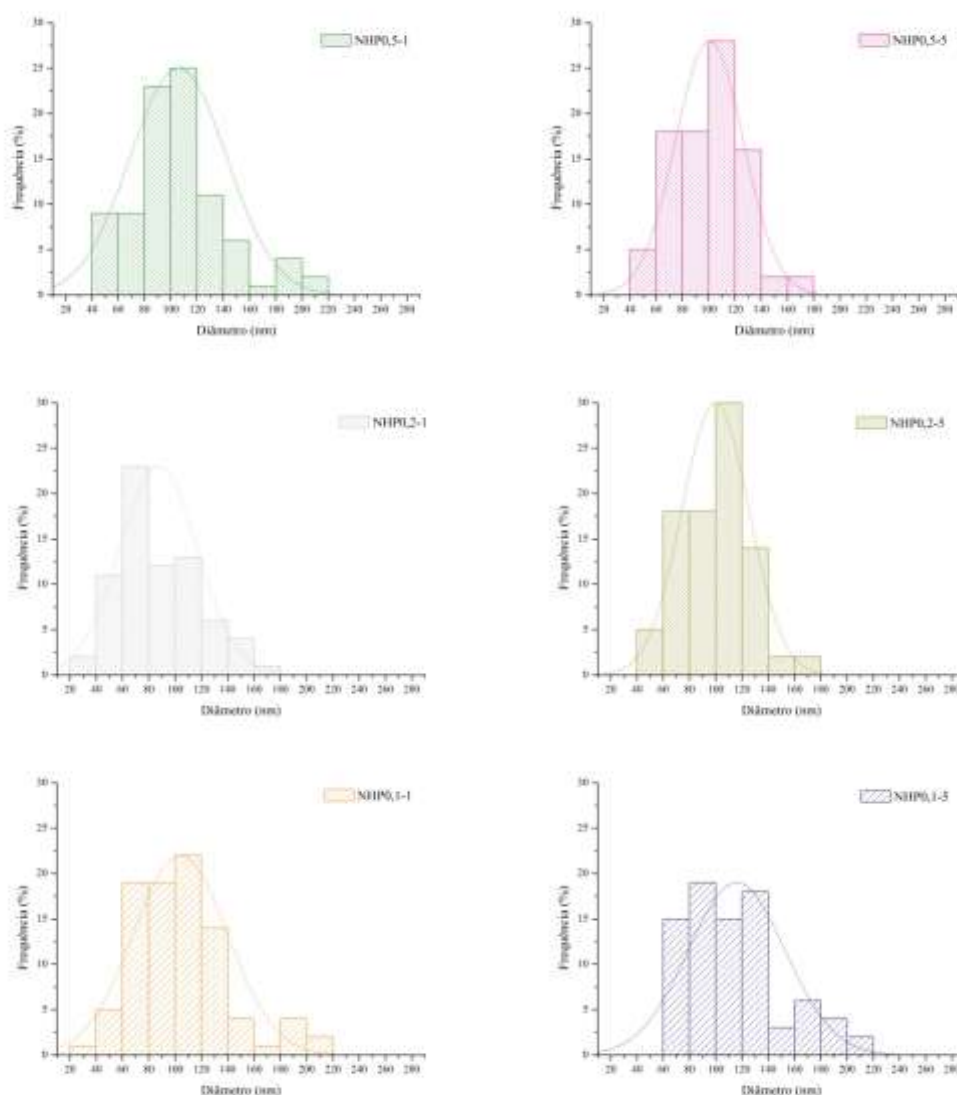
Os resultados estão em acordo com os obtidos utilizando a técnica de espalhamento de luz, observando para as nanopartículas contendo MTX, a distribuição de tamanhos deslocada para uma faixa de diâmetros menores.

Contudo, as Figuras 23 e 24 evidenciam diâmetros menores do que os obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A técnica de DLS é uma técnica hidrodinâmica que realiza as medidas quantitativas de tamanho de acordo com a mobilidade da partícula, ou seja, com seu coeficiente de difusão.

Portanto, para a análise, as nanopartículas encontravam-se dispersas em meio líquido e por serem estruturas compostas por polímeros hidrofílicos ionizáveis, podem permitir a acomodação das moléculas do líquido entre os segmentos locais das cadeias, promovendo assim a expansão do sistema. Dessa forma, os maiores diâmetros das nanopartículas avaliadas no item 6.3.1 são justificáveis e, considerando que no organismo, com a presença de fluídos

fisiológicos, provavelmente a matriz polimérica estará intumescida, nesse estudo, foram assumidos os valores de diâmetro obtidos pela técnica de DLS.

Figura 24. Distribuição granulométrica das nanopartículas contendo MTX.



Assim, apesar da técnica de MEV ser eficaz para a análise morfológica das nanopartículas, deve-se considerar que o processamento da amostra pode ser um interferente ao utilizá-la como técnica para a avaliação do tamanho.

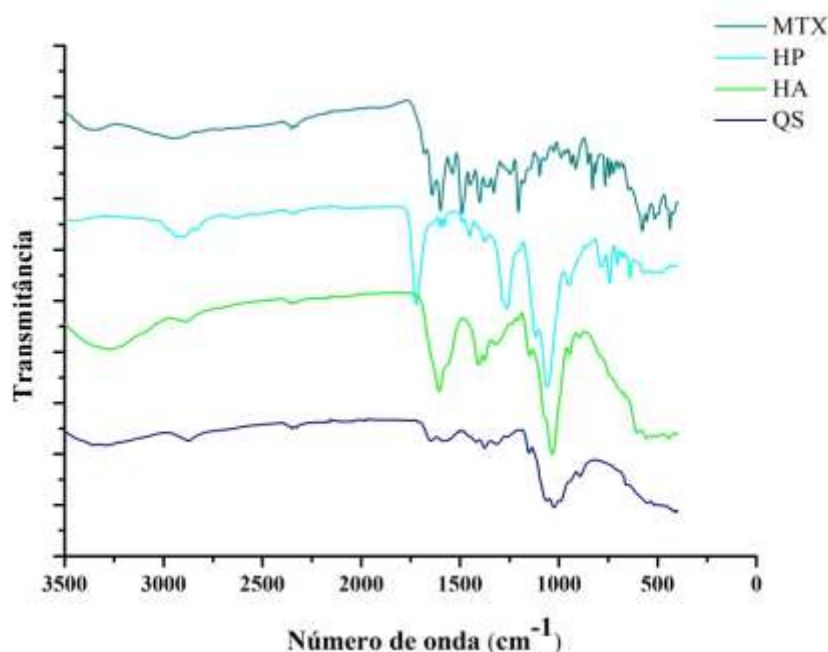
6.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

(IV)

Todos os compostos orgânicos, assim como os inorgânicos, que apresentam ligações covalentes absorvem diversas frequências de radiação eletromagnética na região do IV. Esta região envolve comprimentos de onda localizados entre os associados à luz visível e a micro-ondas, interessando na área da química analítica, a região vibracional do IV. Cada tipo de ligação da molécula apresenta sua própria frequência de vibração que pode variar entre os diferentes compostos pelo ambiente molecular em que se encontram. Dessa forma, cada composto apresenta seu próprio espectro infravermelho, funcionando como uma forma de impressão digital, tornando a espectroscopia de absorção na região do IV uma importante ferramenta de identificação estrutural (PAVIA et al., 2010).

Os espectros do MTX, HP, AH e QS estão representados na Figura 25.

Figura 25. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do fármaco (MTX) e polímeros (HP, AH e QS) que compõe as nanopartículas.



Na análise do MTX, é possível observar duas bandas largas de absorção entre 3400 e 3150 cm^{-1} referentes ao estiramento N-H da amina primária alifática e a hidroxila (OH) do ácido carboxílico. Em aproximadamente 1650 cm^{-1} observou-se absorção referente ao

estiramento C=C do anel aromático e em 1608 cm^{-1} , absorção referente a vibração N-H da amida. Na região de 1641 cm^{-1} evidencia-se a banda de absorção da ligação C=O e, em 1240 cm^{-1} a banda atribuída à absorção do estiramento C-N e 1470 cm^{-1} referente aos anéis aromáticos (CHADHA et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

No espectro do HP observou-se uma banda larga entre 3500 e 3250 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo OH. Também foi identificado, em aproximadamente 2800 cm^{-1} , a absorção atribuída à ligação CH de hibridização sp^3 . Em 1725 cm^{-1} , observa-se a banda forte característica da ligação C=O da função éster que provavelmente se sobrepõe ao estiramento C=O do ácido carboxílico. Entre 1600 e 1500 cm^{-1} observa-se uma banda de baixa intensidade do estiramento C=C do anel aromático.

Próximo a 1260 cm^{-1} , a absorção da ligação C-O de éster, em aproximadamente 1100 cm^{-1} , a banda bem definida referente a C-O da função éter e uma banda fraca em 690 cm^{-1} característica do anel aromático orto-dissubstituído fora do plano podem ser observadas (PEDREIRO, 2016).

Para o AH, estavam presentes no espectro a banda do estiramento OH entre 3500 e 3250 cm^{-1} , em 2850 cm^{-1} , a banda de baixa intensidade atribuída ao estiramento C-H. O sinal do estiramento C=O do ácido carboxílico em 1625 cm^{-1} provavelmente sobrepõe a ligação C=O da função amida secundária que também apresenta banda característica de estiramento C-N e dobramento N-H, em aproximadamente 1490 cm^{-1} . Em 1125 cm^{-1} observa-se a banda de baixa intensidade provavelmente referente a ligação assimétrica C-O-C do grupo glicosídico e, em aproximadamente 1000 cm^{-1} , a absorção de elevada intensidade pode ser atribuída ao estiramento C-O (HAXAIRE et al., 2003; REDDY; KARUNAKARAN, 2013).

Para a QS, observou-se bandas entre 3500 e 3250 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo OH, em 1680 cm^{-1} a banda atribuída a $(-\text{CO})\text{NH}_2$ da amida primária, em 1580 cm^{-1} referente à deformação axial do grupamento NH_2 e, bandas na entre 1100 e 850 cm^{-1} referentes à estrutura polissacarídica (Figura 25) (LI et al., 2013; PEDREIRO, 2016).

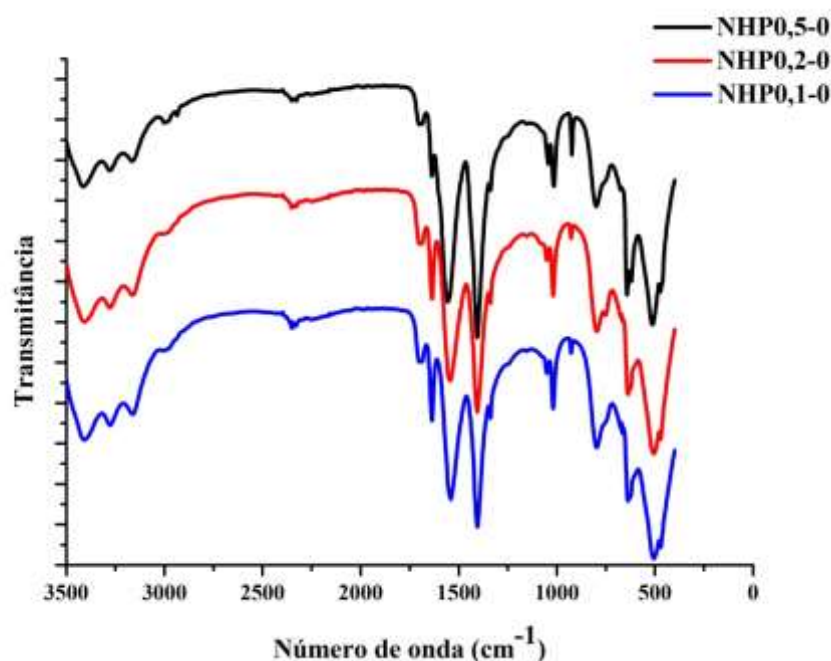
Após a análise dos materiais isolados, as nanopartículas sem adição de fármaco foram avaliadas e os espectros correspondentes encontram-se representados na Figura 26.

Em relação aos polímeros livres, é possível observar alterações para os espectros de absorção das nanopartículas, sendo que as três amostras analisadas foram muito semelhantes.

Os grupamentos ionizáveis dos polímeros QS, AH e HP estão envolvidos no processo de complexação e formação das partículas. Neste sentido, buscou-se avaliar a interferência

nas frequências de absorção, com deslocamentos de bandas e surgimento de novas bandas, que possam indicar a ocorrência das interações intermoleculares.

Figura 26. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das nanopartículas sem adição de fármaco.



Na QS, a ligação eletrostática ocorre por meio dos grupamentos (-CO)NH₂ e NH₂, que de acordo com a Figura 25, apresentam bandas características em 1680 e 1580 cm⁻¹.

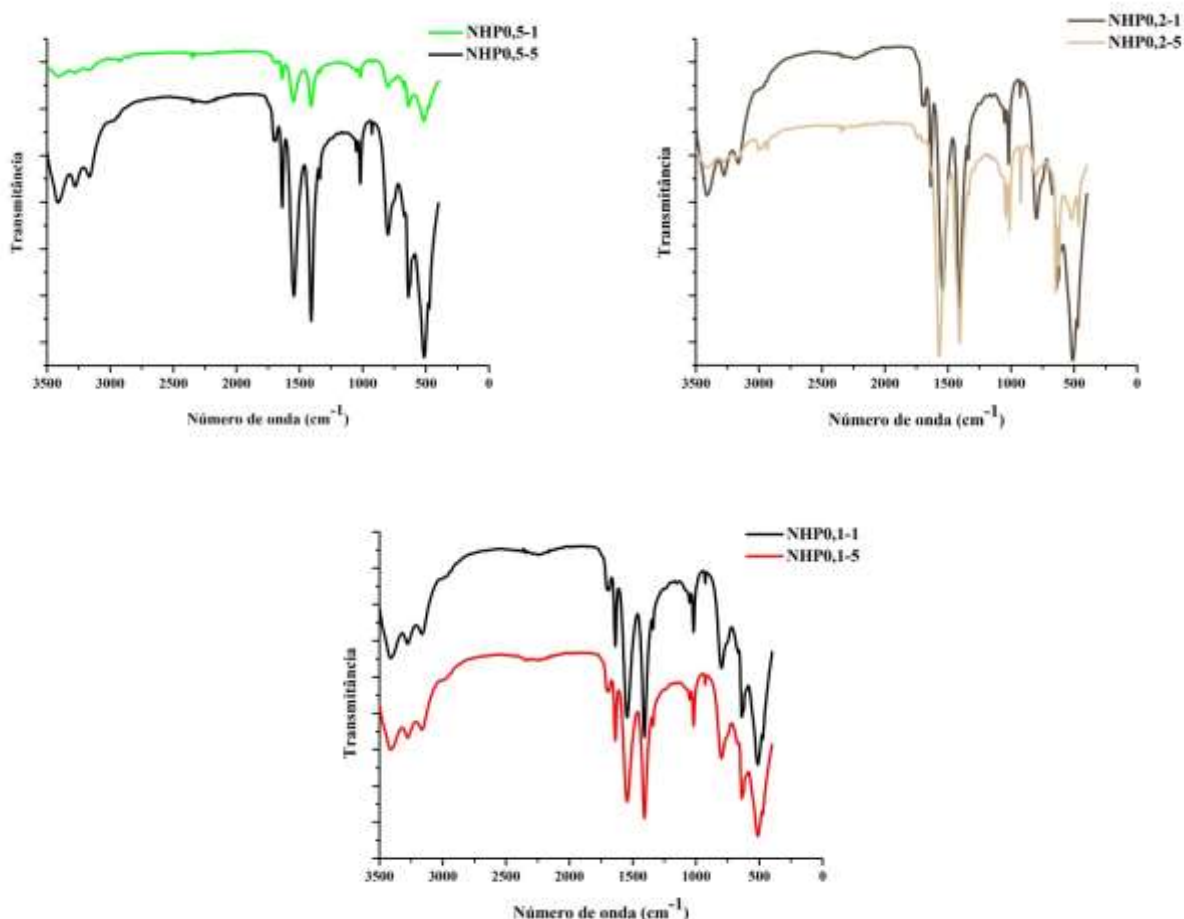
Na Figura 26, é possível observar um deslocamento dessas bandas características, para aproximadamente 1620 e 1530 cm⁻¹, respectivamente, indicando a interação da QS com os poliânions. Como resultado dessa interação há a formação de +NH₃, confirmada pela banda de absorção em aproximadamente 3350 cm⁻¹.

Em relação aos polímeros aniônicos, a formação de ligações intermoleculares pode ser indicada por duas bandas observadas na faixa de 1725 cm⁻¹, atribuídas a ligação C=O, presentes no HP e, 1490 cm⁻¹ característica do AH. A redução significativa da intensidade dessas bandas, comparadas aos espectros dos polímeros livres, é um forte indício do processo de complexação e formação de ligações de hidrogênio indicadas pelo surgimento da banda em aproximadamente 1050 cm⁻¹ (SARMENTO; RIBEIRO; VEIGA, et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Com o objetivo de avaliar a incorporação do fármaco MTX ao sistema, os espectros de absorção na região do IV das NPs com fármaco foram obtidos e estão representados na Figura 27.

Considerando que o MTX, quando adicionado à solução de QS (valor de pH 5,5), apresenta seus grupamentos carboxila ionizados, favorecendo a complexação via interações eletrolíticas com os grupamentos amina e amida protonados da QS, devem ser estabelecidas em seguida interações com os polímeros aniônicos por meio de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas. Dessa forma, buscou-se evidências dessas interações nos espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas com MTX.

Figura 27. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das nanopartículas com adição de fármaco.



Para todas as amostras observou-se um aumento da intensidade da banda em 3350 cm⁻¹, que pode indicar a formação de +NH₃, resultante da interação entre o fármaco e a QS,

sobreposta a banda referente a amina primária alifática do MTX. Observou-se também, maior intensidade da banda entre $1490\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$, possivelmente como resultado da sobreposição da absorção dos anéis aromáticos do MTX e ligação $\text{C}=\text{O}$ do AH e da banda em 1050 cm^{-1} como resultado da formação de maior número de ligações de hidrogênio entre fármaco e polímeros.

Nas amostras NHP0,5-1 e NHP0,2-5 que apresentam maior proporção dos polímeros AH e HP, observou-se, ainda, uma redução significativa da banda em 1530 cm^{-1} , o que pode estar relacionado a maior incorporação do fármaco nestas NPs.

Como os grupamentos característicos do MTX apresentam absorção em regiões semelhantes à dos polímeros, não foi observado o surgimento de novas bandas nos espectros das nanopartículas, porém a influência na intensidade de absorção em algumas regiões sugere a incorporação do MTX ao sistema.

6.3.4. Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é uma técnica não destrutiva, muito utilizada para a caracterização e análise da estrutura cristalina dos materiais. Diversas propriedades físicas são dependentes da organização molecular das substâncias, como exemplo a solubilidade, a qual pode ser alterada durante o processamento dos materiais, por alterações na sua organização.

Portanto, no desenvolvimento de novos sistemas o estudo da estrutura cristalina dos componentes da matriz e do material final é necessário (KARJALAINEN et al., 2005; PREZOTTI et al., 2012).

A técnica baseia-se na projeção de um feixe de raios X monocromático sobre os átomos que compõe o material, em um ângulo teta. A difração do feixe incidido é resultante da combinação de dois fenômenos, o espalhamento de cada átomo individualmente e da interferência entre as ondas espalhadas por esses átomos. Pela variação do ângulo teta as posições angulares e intensidades dos picos difratados resultantes da radiação produzem um padrão, o qual é característico de cada material (SAMPATH et al., 2012).

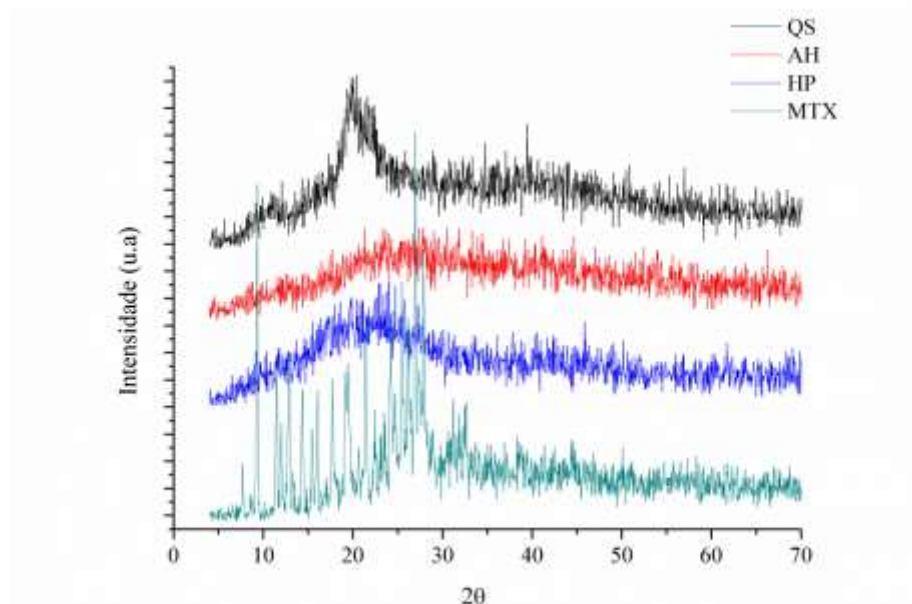
As análises de DRX foram realizadas com o objetivo de caracterizar a estrutura cristalina dos polímeros e nanopartículas poliméricas

A Figura 28 apresenta os difratogramas de raios X para a QS, AH, HP e MTX.

A QS é um polímero semi-cristalino, sendo possível observar dois picos em torno de 10° e 20° (2θ), relacionados aos cristais anidros (SONG et al., 2010). O AH e o HP não

exibiram picos de cristalinidade em seu difratograma, já que são polímeros predominantemente amorfos (Figura 28) (WANG et al., 2005).

Figura 28. Difratogramas de raios X dos polímeros QS, AH, HP e MTX .



O difratograma de raios X do MTX apresentou picos de cristalinidade de maior intensidade na região de 9° a 35° (Figura 28). Essa região de maior intensidade está relacionada ao tipo de estrutura do cristal de fármaco. Considerando que o MTX apresenta polimorfismo, pode-se observar outros difratogramas típicos de acordo com os níveis de organização de suas moléculas e estrutura formada.

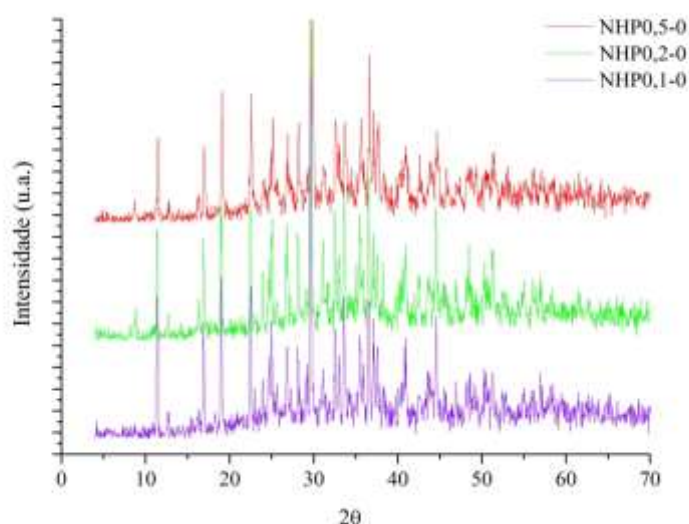
De Oliveira (2013) e Garcia (2014), apresentaram difratogramas do MTX semelhantes ao obtido, classificando o fármaco como MTX trihidratado (DE OLIVEIRA et al., 2013; GARCIA, 2014).

Os difratogramas de raios X das nanopartículas sem MTX estão demonstradas na Figura 29.

Os difratogramas das nanopartículas indicam a formação de estruturas com maior cristalinidade, sugerindo que o processo de complexação possivelmente causou um rearranjo estrutural dos polímeros, que apresentavam a característica semi-cristalina (QS) e amorfa (AH e HP).

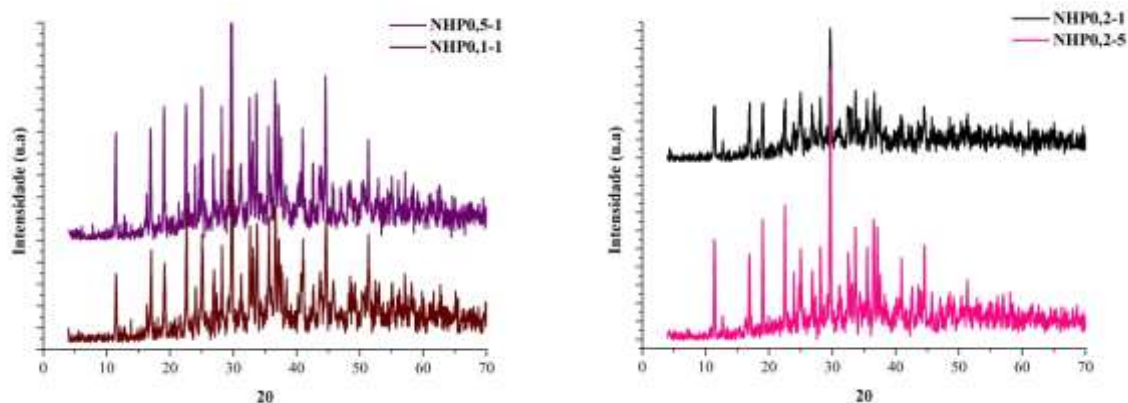
Essa estrutura cristalina indica maior grau de empacotamento e organização molecular, que pode favorecer o aprisionamento do fármaco, alterando a solubilidade e/ou reduzindo as taxas de liberação (JEONG et al., 2003).

Figura 29. Difratomogramas de raios X da nanopartículas NHP0,5-0, NHP0,2-0 e NHP0,1-0.



As nanopartículas contendo MTX também foram analisadas e os resultados estão demonstrados na Figura 30.

Figura 30. Difratomogramas de raios X das nanopartículas contendo fármaco.



Os difratogramas de raios X observados foram semelhantes para as diferentes NPs, não sendo possível observar o aparecimento de novos picos de cristalinidade com a adição do fármaco, provavelmente devido a maior concentração de polímeros em relação ao fármaco.

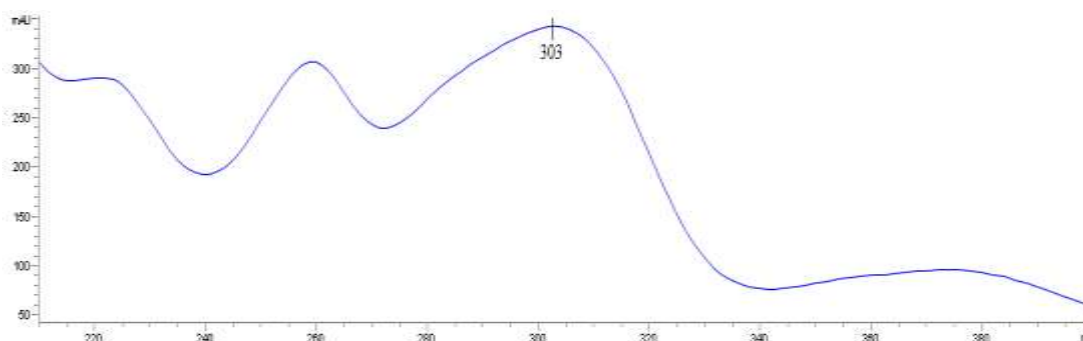
Contudo, é possível verificar a manutenção dos picos característicos de fase cristalina, que indicam a formação e manutenção da estrutura cristalina com maior grau de empacotamento e organização molecular, mesmo após a incorporação do MTX.

6.4. Validação de metodologia analítica para quantificação de MTX por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

6.4.1. Conformidade do sistema cromatográfico

A Figura 31 apresenta o espectro de absorção do MTX na região do UV, em fase móvel (tampão acetato de amônio:metanol 70:30) com máxima absorção no comprimento de onda de 303 nm.

Figura 31. Espectros de absorção na região do ultravioleta do MTX em fase móvel.



Após a avaliação do espectro do fármaco e comprimento de onda de máxima absorção, em 303 nm, a conformidade do método cromatográfico foi avaliada e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.

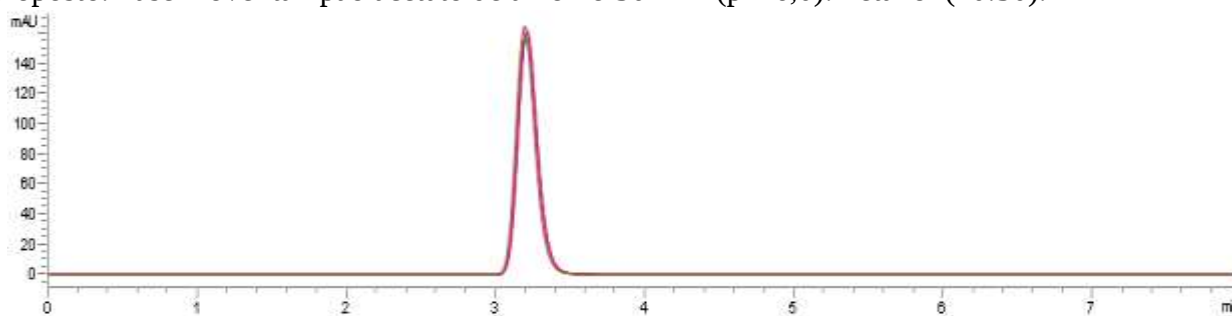
O número de pratos teóricos obtidos foi superior a 2000, como recomendado e, as médias dos valores dos fatores de assimetria e de cauda estão abaixo do limite preconizado de 2,0, demonstrando que o método desenvolvido é adequado para a quantificação do MTX.

Tabela 5. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de MTX.

Injeções	tR	Área	Simetria do pico 10%	Fator de cauda	n° de pratos teóricos
1	3,206	1510,300	1,162	1,200	2838
2	3,206	1510,400	1,165	1,200	2835
3	3,199	1472,800	1,180	1,226	2852
4	3,196	1514,100	1,192	1,231	2902
5	3,194	1515,200	1,182	1,221	2901
Média	3,200	1504,560	1,176	1,216	2865,6
DP	0,006	17,888	0,012	0,015	33,40
D.P.R %	0,175	1,189	1,063	1,207	1,165

Da mesma forma, como demonstrado na Tabela 5, verificou-se precisão entre os valores de tR e área dos picos cromatográficos, cujos D.P.R% se encontram abaixo de 2% (BRASIL, 2003; USP, 2011).

Para demonstrar a resolução e a simetria do pico correspondente ao MTX, os cromatogramas das cinco injeções, obtido pelo método proposto, foram sobrepostos e estão representados na Figura 32.

Figura 32. Cromatograma do MTX (25 µg.mL⁻¹) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel tampão acetato de amônio 50 mM (pH 6,0):metanol (70:30).

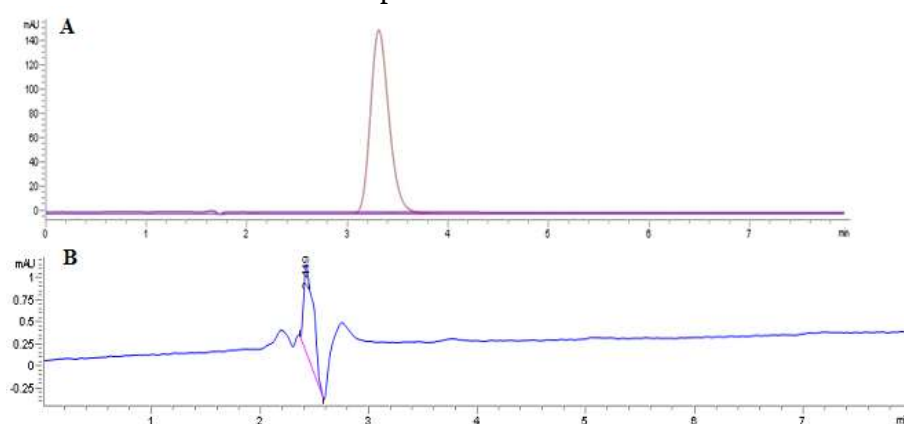
6.4.2. Especificidade/Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sem que estes interfiram no resultado da análise. Em métodos quantitativos, a especificidade/seletividade, pode ser avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos de amostras e dos possíveis interferentes, como os excipientes das nanopartículas e os meios

receptores. Em métodos cromatográficos, esse parâmetro é importante, uma vez que a pureza do pico do fármaco deve ser mantida (BRASIL, 2003).

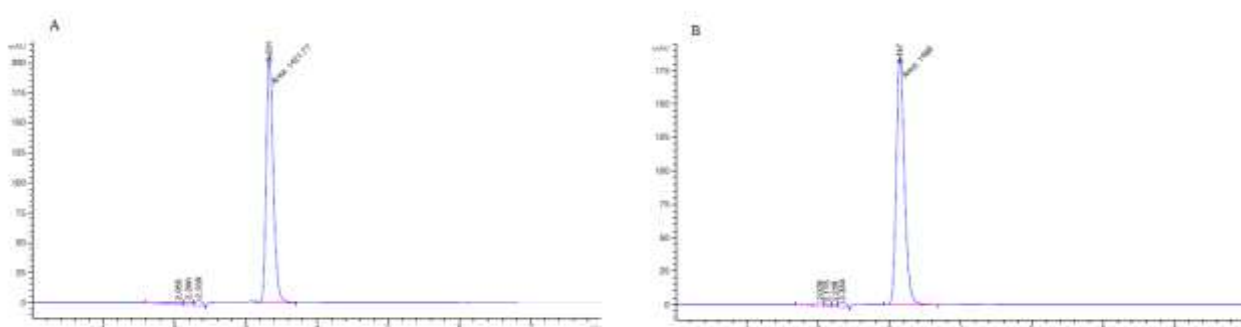
Inicialmente, as soluções dos polímeros QS, HP e AH foram injetadas e os cromatogramas sobrepostos para comparação (Figura 33 A). Conforme pode-se observar na Figura 33 (A), os polímeros não apresentaram picos de absorção na região do UV que possam interferir na quantificação do fármaco. Para garantir a especificidade do método, uma amostra de nanopartículas foi preparada, centrifugada e o sobrenadante filtrado e analisado utilizando-se o método. Não observou-se interferência no tR do MTX (Figura 33 (B)).

Figura 33. (A) Sobreposição dos cromatogramas dos polímeros e do fármaco MTX e (B) cromatograma do sobrenadante das nanopartículas.



As soluções de MTX ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em HCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8 também foram avaliadas. A Figura 34 representa os cromatogramas obtidos, demonstrando que não há interferência significativa no tR e área do fármaco.

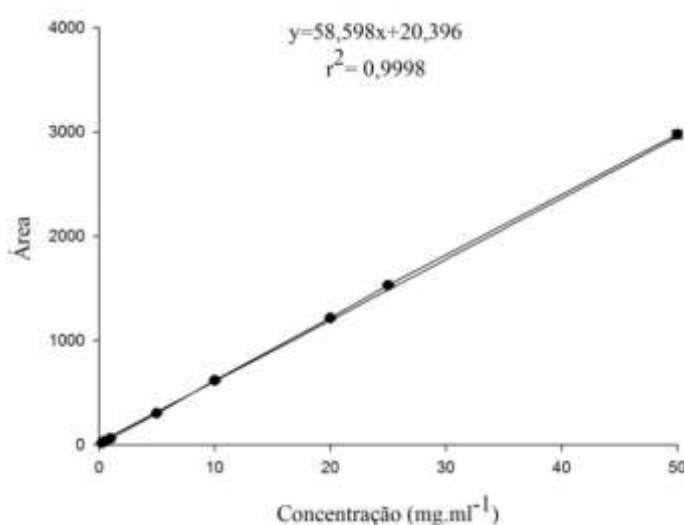
Figura 34. Cromatogramas das soluções de MTX, A: em HCl pH 1,2 e B: em tampão fosfato pH 6,8.



6.4.3. Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco, dentro de um intervalo de concentrações definido (Brasil, 2003; Usp, 2011). A curva analítica das áreas em função da concentração de MTX foi construída (Figura 35) a partir da média dos valores das áreas obtidas, no comprimento de onda de 303 nm.

Figura 35. Curva analítica do MTX obtida por CLAE.



Realizou-se a análise de variância ANOVA para os dados obtidos a partir da curva analítica do MTX, confirmando que a regressão linear é altamente significativa, a partir dos dados obtidos. Não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos no nível de 95% de confiança (Tabela 6). Portanto, o erro experimental confunde-se com o erro puro, ou seja, o erro inerente a análise que não pode ser controlado (DE SIQUEIRA-MOURA et al., 2008).

Tabela 6. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de	F calculado	F Tabelado
Regressão	$8,93.10^7$	1	$2,53.10^4$ *	4,24
Resíduo	$8,82.10^4$	25		
Falta de ajuste	$7,27.10^4$	18	0,55	2,57
Erro puro	$8,93.10^7$	26		

* Significativo para $p < 0,05$

6.4.4. 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 (BRASIL, 2003). Existem três formas comuns de demonstrar a precisão, por meio da precisão intracorrida, intercorrida e precisão interlaboratorial, sendo usualmente expresso através do desvio padrão relativo percentual (BRASIL, 2003; USP, 2011).

Precisão intracorrida

É a repetibilidade do método, ou seja, precisão entre os resultados obtidos pelo mesmo manipulador, utilizando os mesmos equipamentos, dentro de um curto período de tempo (BRASIL, 2003). A análise foi realizada em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.

Concentração teórica ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Áreas	Concentração real ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Médias	DP	D.P.R %
5	298,9	4,75	4,79	0,33	0,698
	301,2	4,79			
	302,8	4,81			
20	1242,1	20,85	20,21	0,915	4,529
	1143	19,16			
	1228	20,61			
50	2934,3	49,72	50,36	0,81	1,616
	3025,2	51,27			
	2954,7	50,36			

O D.P.R% observado para todas as amostras nos ensaios de precisão intracorrida e precisão intercorridas foi inferior à 5%, como preconizado pela legislação vigente (Brasil, 2003), portanto, o método desenvolvido é preciso.

Precisão intermediária

É a precisão intercorridas, avalia a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com manipuladores diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados do ensaio de precisão intercorrida.

Concentração teórica	Analista e dia	Concentração real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Médias	DP	D.P.R%
5	1	4,78	4,748	0,046	0,982
	2	4,71			
20	1	20,34	20,304	0,062	0,303
	2	20,26			
50	1	50,43	50,645	0,295	0,583
	2	50,85			

6.4.5. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico utilizado em relação ao valor teórico real. Valores próximos a 100% são desejáveis, entretanto, admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL, 2003). A exatidão foi calculada e os valores estão apresentados na Tabela 9, demonstrando que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação do fármaco.

Tabela 9. Exatidão entre concentração teórica e experimental das soluções de MTX.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão %
5	4,807	96,14
20	20,647	103,23
50	49,902	99,81

6.4.6. Limite de detecção e de quantificação

O LD e LQ são utilizados para medir a sensibilidade do método. O LD representa a menor quantidade do fármaco presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado e o LQ representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser medida com precisão e exatidão pelo método desenvolvido escolhido (BRASIL, 2003). Os valores de LD e de LQ calculados foram de $0,0271 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,0904 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando a capacidade da metodologia desenvolvida de detectar e quantificar reduzidas concentrações de MTX.

6.5. Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)

A eficiência de incorporação representa a porcentagem de fármaco incorporado às NPs, em relação à quantidade total adicionada durante o processo de obtenção (AHUJA et al., 2010).

Para os sistemas desenvolvidos a partir de QS:AH:HP, os valores de EI% variaram de 20,06 a 36,18% e para as amostras NAH0,2-5 e NAH0,1-5, os valores foram de 30% e 37,9%, respectivamente (Tabela 10).

Conforme os valores da Tabela 10, as amostras NHP0,5-1 e NHP0,2-5 foram as que apresentaram maior EI% com 32,22% e 36,18%, respectivamente ($p < 0,05$), corroborando os resultados dos espectros de absorção na região do infravermelho (item 6.3.3), que também indicaram a maior incorporação de MTX nessas NPs, pela redução significativa da banda que representa o grupamento ionizável da QS em 1530 cm^{-1} .

Os valores de EI% são superiores aos encontrados por Cascone e colaboradores (2002) em estudo com nanopartículas de gelatina, em que alcançaram de 5% a 15,6 % de incorporação do MTX (CASCONI et al., 2002). Valores semelhantes de eficiência de incorporação do MTX, foram relatados por Trapani e coautores (2011) para nanopartículas de QS e glicocitosana, em que houve variação de 19-48% na incorporação do fármaco. No mesmo trabalho, a IC_{50} , em células de linhagem tumoral, para as nanopartículas, variou de 0,09 a 0,11 $\mu\text{g/mL}$, destacando que o efeito citotóxico é mantido em baixas concentrações, como esperado (TRAPANI et al., 2011).

Tabela 10. Eficiência de incorporação (EI%) das NPs.

Amostra	EI% (DP)
NHP0,5-1	32,22 (5,07)
NHP0,5-5	20,06 (1,55)
NHP0,2-1	29,21 (1,68)
NHP0,2-5	36,18 (2,35)
NHP0,1-1	26,76 (1,88)
NHP-0,1-5	22,38 (1,41)
NAH0,2-5	30,00 (1,20)
NAH0,1-5	37,90 (3,60)

6.6. Estudo das propriedades mucoadesivas

O muco é uma secreção viscoelástica, composta por 95% de água, 0,5- 5% de mucina, 1% de sais inorgânicos, 0,5- 1% de proteínas e lipídios. Apesar da elevada porcentagem de água, o principal constituinte do muco é a mucina, uma glicoproteína de elevada massa molecular. Sua conformação e carga, *in vivo*, podem variar de acordo com o volume, a composição e o pH do fluído biológico, porém devido aos resíduos de ácido siálico ($pK_a = 2,6$) e grupos sulfato em sua estrutura, apresenta predominantemente carga negativa.

O processo de mucoadesão comumente se estabelece por meio de duas etapas, a primeira é a etapa de contato, na qual o sistema de liberação interage com a membrana biológica e, a segunda é a etapa de consolidação do processo de adesão na qual estão envolvidas as diversas teorias descritas no item 2.5.1.1. A primeira etapa, de interação, pode ser limitante para o processo de mucoadesão das nanopartículas com mucosas do TGI, devido ao elevado volume de fluídos fisiológicos e peristaltismo constante (Smart, 2005).

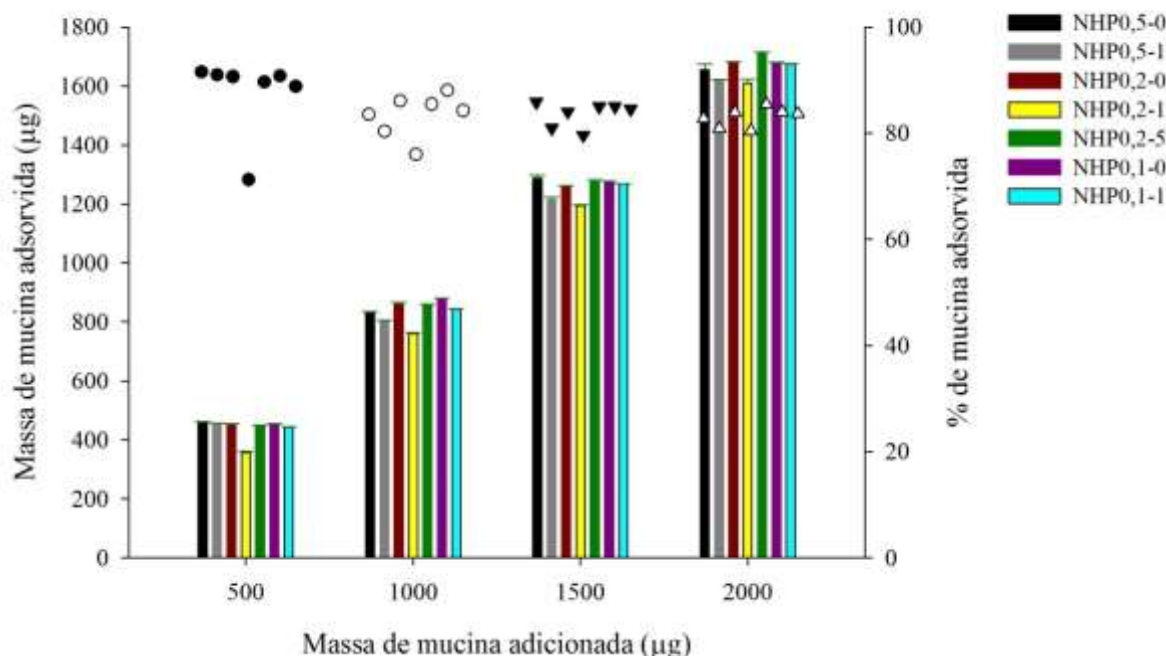
Com o objetivo de avaliar a mucoadesividade do sistema desenvolvido, realizou-se os ensaios *in vitro* de mucoadesão. Para os estudos da propriedade e capacidade mucoadesiva foram selecionadas as amostras NHP0,5-0, NHP0,2-0, NHP0,1-0, NHP0,5-1, NHP0,2-1, NHP0,2-5 e NHP0,1-1, as quais apresentaram maiores valores de EI%.

6.6.1. Ensaio *in vitro* de interação com a mucina utilizando reagente de Lowry

A Figura 36 apresenta o gráfico da quantidade e porcentagem de mucina adsorvida nas NPs sem e com incorporação de fármaco, em função da quantidade de mucina nas soluções aquosas.

A variação da proporção de AH e HP no sistema, bem como a concentração de MTX, não influenciaram de forma significativa a quantidade de mucina adsorvida ($p > 0,05$). No entanto, comparando-se os resultados das amostras NHP0,5-0 e NHP0,2-0 com os das NHP0,5-1 e NHP0,2-1 e NHP0,2-5, no equilíbrio, foi possível concluir que a adição de fármaco reduziu a massa de mucina adsorvida ($p < 0,05$) e, conseqüentemente, a porcentagem de mucoadesão (Figura 36).

Figura 36. Quantidade de mucina adsorvida nas nanopartículas em função da quantidade de mucina adicionada nas soluções, representadas pelas barras e porcentagem de mucina adsorvida representada pelos pontos.



Para todas as amostras, a quantidade de mucina adsorvida aumentou com o aumento da quantidade de mucina adicionada ao meio. As partículas sem e com incorporação de MTX adsorveram de 453,04 a 1679,17 µg e de 356,13 a 1709,55 µg, respectivamente, como pode ser observado na Figura 36.

Os resultados obtidos são de 2 a 7 vezes superiores aos observados por Pedreiro (2016) com nanopartículas de QS e HP, indicando que a adição de AH ao sistema influenciou positivamente esta propriedade (PEDREIRO et al., 2016).

Todas as amostras apresentaram elevada porcentagem de mucoadesão (entre 71,2% e 91,53%), mesmo em contato com as menores concentrações de mucina.

Para o ensaio, o valor de pH 5,5 das soluções de mucina foi mantido, considerando que em condições inflamatórias e do microambiente tumoral, o valor de pH de 6,8 da região colônica encontra-se alterado. Neste ambiente, as nanopartículas devem apresentar elevado potencial zeta positivo, enquanto a mucina provavelmente apresenta-se carregada negativamente. Dessa forma, o processo de adsorção deve ocorrer predominantemente por interações eletrostáticas, conforme a teoria eletrônica de atração de cargas opostas, entre a matriz polimérica e os componentes do muco (ANDREWS et al., 2009; HUA et al., 2015).

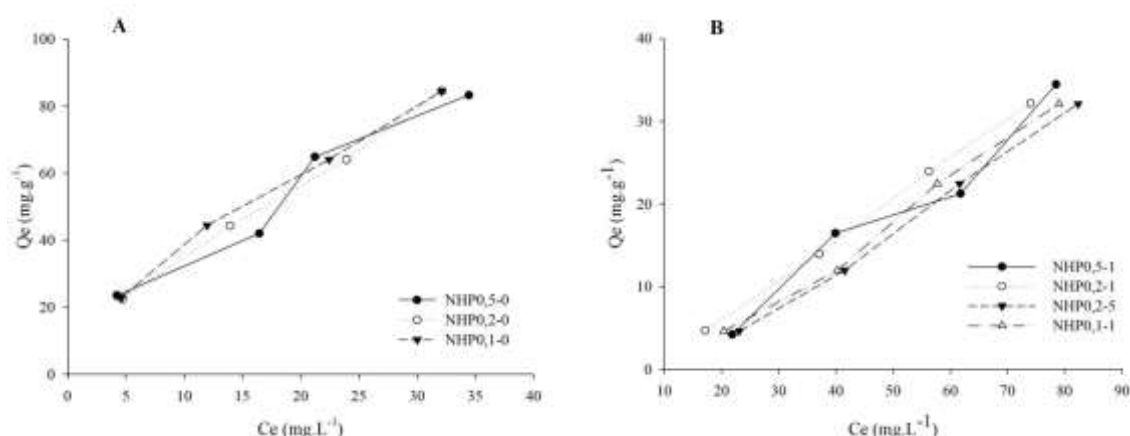
Contudo, a mucoadesão é um fenômeno complexo e, devido as características dos polímeros que compõem o sistema, provavelmente no processo de consolidação da adesão estão envolvidas outras interações supramoleculares, como as ligações de hidrogênio e / ou Van der Waals, resultando em forças atrativas consideravelmente fortes com as moléculas de mucina, quando somadas com as interações eletrostáticas (CARVALHO et al., 2010).

6.6.1.1. Isotermas de adsorção de mucina

A partir dos dados do ensaio de adsorção de mucina (item 6.6.1.), foram plotadas isotermas de adsorção, que são representações gráficas da interação entre a mucina e a superfície das partículas. Nas isotermas, relaciona-se a massa de mucina adsorvida por massa de nanopartícula (Q_e em mg.g^{-1}) com a concentração de mucina livre no sobrenadante (C_e em mg.L^{-1}).

Na Figura 37 estão representadas as curvas para as amostras sem e com a incorporação de fármaco. O perfil apresentado indica interação favorável para todas as partículas, em que a quantidade de mucina adsorvida aumenta proporcionalmente com a concentração de mucina no meio (LI et al., 2005). Contudo, as partículas sem adição de fármaco apresentaram maior quantidade de mucina adsorvida em relação a mucina livre no sobrenadante, indicando a menor capacidade de adsorção das amostras contendo MTX.

Figura 37. Isotermas de adsorção de mucina A- às nanopartículas sem adição de MTX e B- às nanopartículas com adição de MTX.



A partir das isotermas de adsorção relativas às formulações NHP0,2-0 e NHP0,1-0 em comparação à NHP0,5-0 (Figura 37 A), é possível observar uma diferença no perfil de

adsorção das amostras. Para a NHP0,5-0, a curva assume um formato em “S”, o que indica uma adsorção cooperativa, na qual estão envolvidos ao menos dois mecanismos diferentes.

Neste tipo de adsorção, o ponto de inflexão caracteriza a saturação dos sítios de ligação ionizados na superfície da partícula. Em seguida, as moléculas de mucina devem continuar o processo de adsorção, ligando-se a sítios energeticamente diferentes dos saturados inicialmente (GILES et al., 1974).

Para as amostras NHP0,2-0 e NHP0,1-0, em que ocorre menor grau de complexação pela menor proporção dos poliânions, esse evento provavelmente não ocorreu devido ao maior número de sítios catiônicos energeticamente semelhantes da QS, disponíveis para interação eletrostática com a mucina.

Para as amostras NHP0,2-0 e NHP0,1-0, o perfil da curva em forma de “L” sem a formação de um platô indica que o sólido, no caso as nanopartículas, nas concentrações avaliadas, não apresentaram de forma clara um limite na capacidade de adsorção (LIMOUSIN et al., 2007). O mesmo comportamento pôde ser observado para as NPs contendo MTX (Figura 37 B).

Às isotermas da Figura 37, aplicou-se os modelos de Langmuir e Freundlich, a fim de buscar um melhor entendimento sobre as propriedades mucoadesivas das amostras, principalmente em relação à capacidade de adsorção e a intensidade da interação.

Na Figura 38 estão representadas as isotermas no modelo linearizado de Freundlich (A) e Langmuir (B) para as amostras sem fármaco e na Figura 39 para as amostras com incorporação de fármaco.

Figura 38. Isotermas de adsorção de Freundlich (A) e Langmuir (B) das amostras sem adição de fármaco.

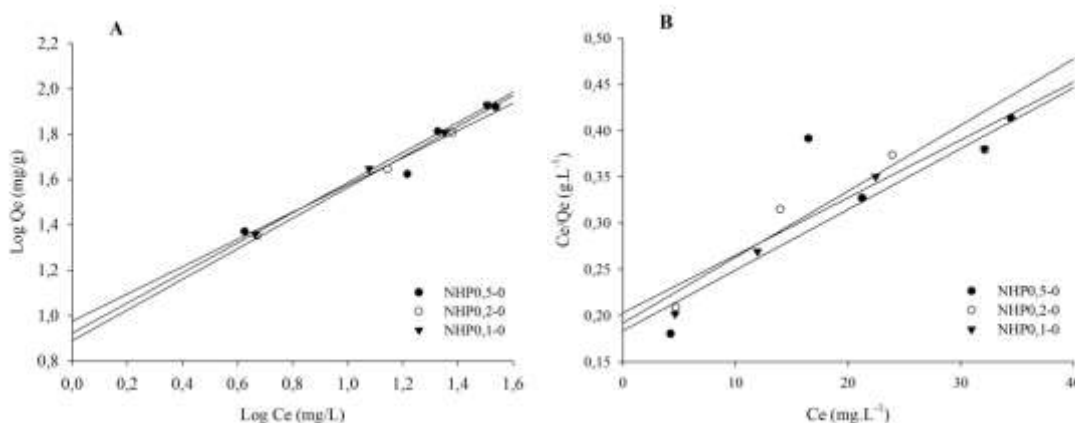
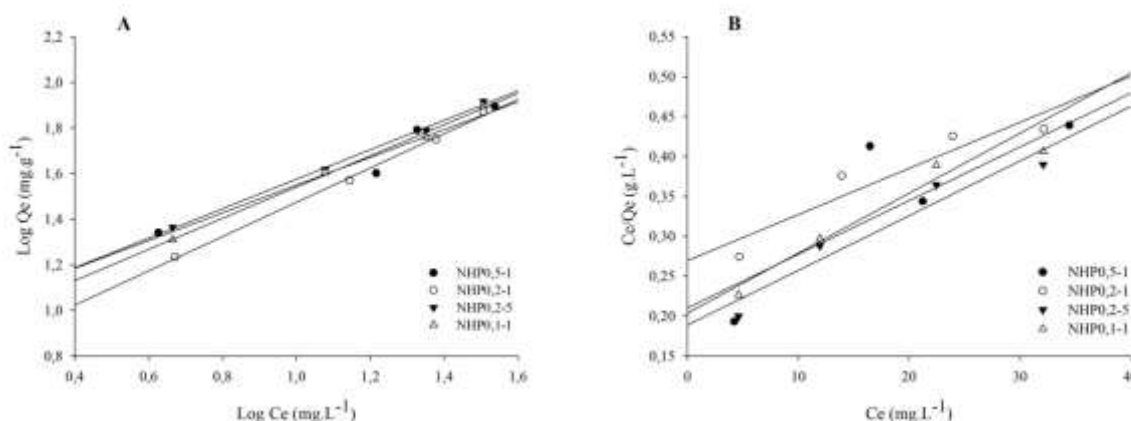


Figura 39. Isotermas de adsorção de Freundlich (A) e Langmuir (B) das amostras com incorporação de fármaco.



O modelo de Freundlich descreve a adsorção de um único soluto, sobre o adsorbente, em múltiplas camadas e de forma reversível, assumindo que a superfície sólida é irregular e heterogênea. Neste modelo, a quantidade de soluto adsorvido resulta da somatória de adsorção em todos os sítios disponíveis, cada um com energia diferente de ligação, sendo os sítios de ligação mais fortes ocupados em primeiro lugar, seguindo da adsorção nos sítios de menor energia até atingir o equilíbrio do processo (LI et al., 2005).

Já o modelo de Langmuir considera a adsorção sobre uma superfície homogênea, em monocamada, por toda a superfície do adsorbente, na qual as moléculas adjacentes do soluto não interagem entre si permanecendo em solução (LAN et al., 2001).

A partir dos valores de r^2 (Tabela 11) obtidos através da regressão linear, pode-se observar que os dados apresentam melhor correlação com o modelo de Freundlich.

Tabela 11. Parâmetros dos modelos aplicados às isotermas de adsorção.

Amostra	Modelo de Freundlich			Modelo de Langmuir
	r^2	n	k	r^2
NHP0,5-0	0,9731	1,665	9,440	0,8475
NHP0,5-1	0,9746	1,645	8,735	0,8519
NHP0,2-0	0,9974	1,481	7,753	0,9395
NHP0,2-1	0,9989	1,330	5,272	0,9388
NHP0,2-5	0,9988	1,5472	8,482	0,964
NHP0,1-0	0,9992	1,5071	8,359	0,9799
NHP0,1-1	0,9984	1,4622	7,182	0,9658

Este resultado é coerente, pois provavelmente a superfície das nanopartículas é irregular e, apesar da adsorção ser governada por interações eletrostáticas, de acordo com o potencial zeta positivo das partículas (item 6.3.1, Figura 19), os grupamentos carboxila presentes nos polímeros aniônicos podem formar ligações de hidrogênio com as moléculas de mucina favorecendo ainda mais a adesão. A mucina livre no sobrenadante deve ainda adsorver, via interações fracas, nas moléculas já adsorvidas na superfície das nanopartículas, formando multicamadas, de acordo com a definição do modelo de Freundlich.

Com a linearização das isotermas de Freundlich é possível encontrar os parâmetros de interação n e k , para cada uma das amostras, sendo $\log k$ o coeficiente linear e $1/n$ o coeficiente angular das retas. O coeficiente n indica a intensidade de adsorção da mucina com a superfície das nanopartículas, valores de n maiores que 1,0 representam condições favoráveis de adsorção (HAMEED; RAHMAN, 2008; FEBRIANTO et al., 2009).

Dessa forma, todas as partículas, mesmo após a incorporação de fármaco, apresentaram forte interação de adsorção e não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras. Já o coeficiente k , está relacionado à capacidade de adsorção, os valores encontrados são considerados elevados e não houve alteração significativa desse parâmetro com a adição do MTX, indicando a grande capacidade de adsorção de mucina por unidade de massa de partículas (SNOEYINK et al., 1981).

Dessa forma, os sistemas desenvolvidos devem ser capazes de estabelecer forte interação com a mucina, permanecendo aderidas à camada de muco.

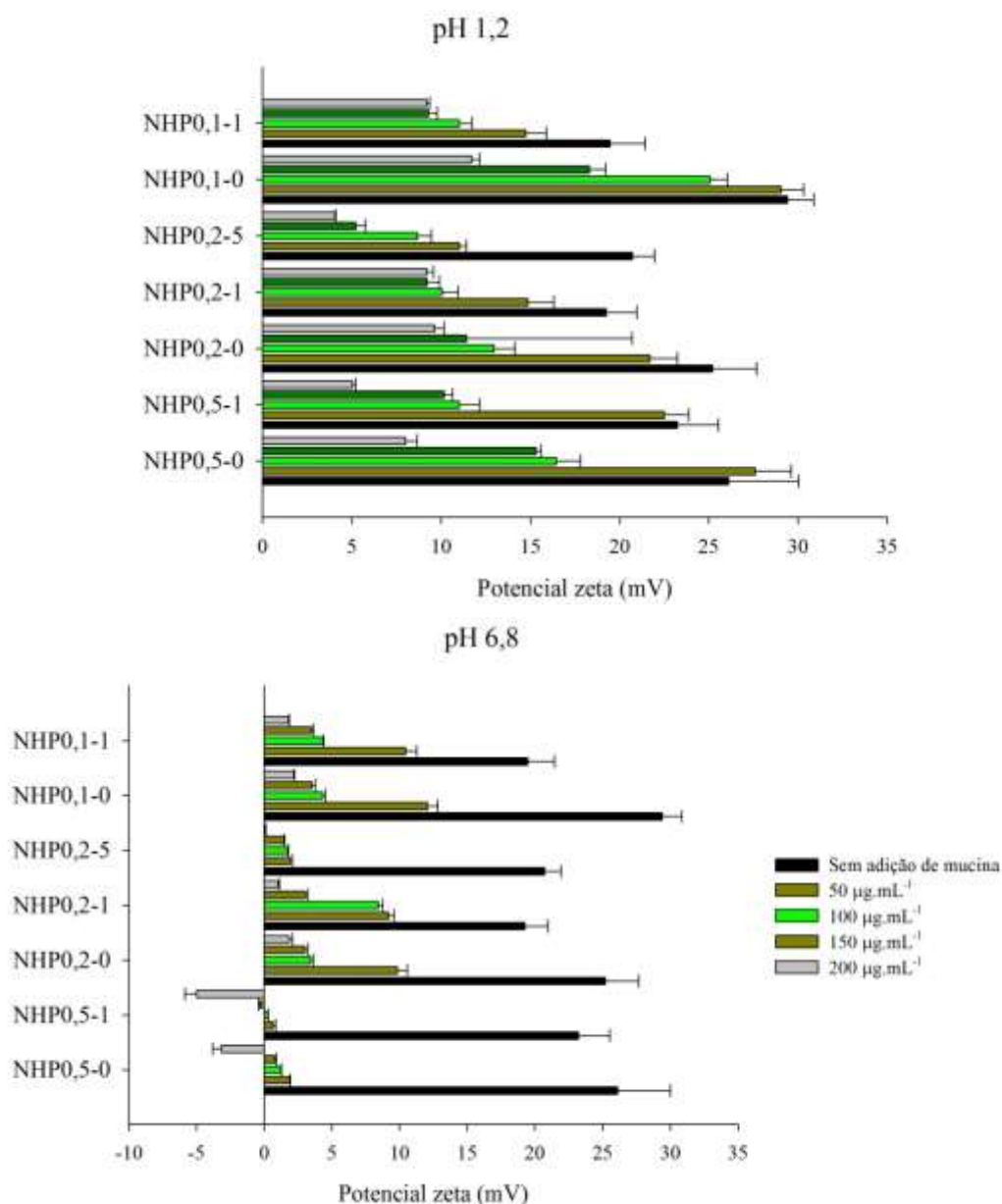
A reduzida da capacidade mucoadesiva das NPs NHP0,5-1, NHP0,2-1, NHP0,2-5 e NHP0,1-1 em conjunto com seus menores diâmetros (item 6.3.1, Figura 18) são atributos favoráveis a permeação dos sistemas através da camada de muco que reveste o epitélio intestinal inflamado ou a massa tumoral, favorecendo a interação com as células de superfície aniônica, para a internalização e /ou liberação do fármaco localmente.

6.6.2. Estudo da interação entre a mucina e as nanopartículas a partir da análise do potencial zeta

De forma complementar, realizou-se um estudo para avaliar a influência da variação de pH, no processo de adsorção das moléculas de mucina na superfície das NPs, por meio da variação do potencial zeta das amostras. A Figura 40 apresenta as variações no potencial zeta

das nanopartículas NHP0,5-0, NHP0,2-0, NHP0,1-0, NHP0,5-1, NHP0,2-1, NHP0,2-5 e NHP0,1-1, com a adição das soluções de mucina.

Figura 40. Influência da adição de soluções de mucina no potencial zeta das nanopartículas, nos valores de pH 1,2 e 6,8..



As soluções de mucina nos valores de pH 6,8 e 1,2, que simulam o pH colônico e gástrico, apresentaram potencial zeta de $-4,06 \pm 0,85$ mV e $+2,38 \pm 0,76$ mV, respectivamente. Em valores de pH maiores que 2,6, os grupamentos siálicos das moléculas de mucina

apresentam-se carregados negativamente devido à ionização, já em pH ácido, inferior ao valor de $pK_a = 2,6$, os grupamentos encontram-se protonados.

Para as amostras sem adição de fármaco, em ambos os valores de pH estudados, observou-se a alteração significativa no potencial zeta, a partir da adição da dispersão de mucina na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) (Figura 40).

Para as amostras com MTX, a significativa alteração do potencial zeta foi observada a partir de uma concentração duas vezes menor de mucina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), provavelmente devido a elevada capacidade de adsorção e menor carga residual positiva, destas amostras.

Comparando-se a variação do potencial zeta das nanopartículas em função do pH das soluções de mucina, observou-se maior redução da carga residual positiva no valor de pH 6,8 ($p < 0,05$), que pode indicar que houve maior adsorção de mucina à superfície das nanopartículas (Figura 40).

Neste valor de pH, como descrito anteriormente, a mucina apresenta praticamente todos os grupamentos ionizados e as partículas devem estar protonadas, favorecendo e evidenciando a importância da interação eletrostática no processo de consolidação da mucoadesão. Além disso, o relaxamento da malha polimérica é facilitado neste meio, tornando-se mais disponíveis para interagir por adsorção e interações hidrofóbicas com a mucina (JOERGENSEN et al., 2011). O comportamento observado é desejável, pois pode indicar que a interação com o muco será favorecida no valor de pH colônico.

6.6.3. Avaliação da força e trabalho de mucoadesão

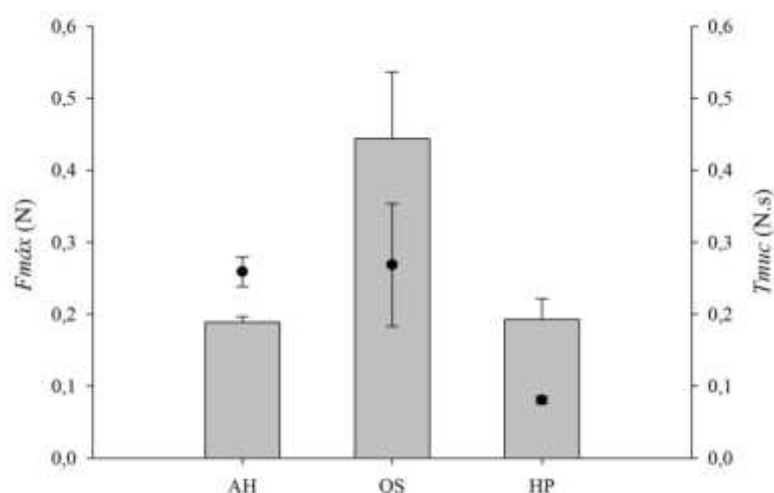
A camada de muco que reveste o epitélio intestinal apresenta uma estrutura complexa, a qual também se difere entre as regiões do TGI em concentração de mucina, espessura e pH. Todos estes fatores devem ser considerados, pois influenciam diretamente o processo de mucoadesão (MADSEN et al., 1998; SOSNIK et al., 2014). Portanto, o teste utilizando como substrato biológico o tecido intestinal suíno, teve como objetivo mimetizar as condições fisiológicas em que o sistema será exposto, avaliando a capacidade mucoadesiva através da medida da força necessária para destacar as amostras mantidas em contato com o substrato e, a energia envolvida nesse processo.

O teste foi realizado com os polímeros QS, AH e HP individualmente e, com as amostras NHP0,5-0, NHP0,2-0 e NHP0,1-0 (sem adição de fármaco) e NHP0,5-1, NHP0,2-1, NHP0,2-5 e NHP0,1-1 (com incorporação de fármaco).

O estágio de contato envolvido no processo de mucoadesão foi imposto utilizando energia mecânica do equipamento e a força e trabalho necessários para a separação dos substratos após a etapa de consolidação foi avaliada.

Entre os polímeros, a $F_{máx}$ variou de 0,189 N a 0,444 N, como é possível observar na Figura 41.

Figura 41. Gráfico comparativo da força máxima de mucoadesão - $F_{máx}$ (N); representada pelas barras e trabalho de mucoadesão- T_{muc} (N.s); representado pelos pontos, dos polímeros.



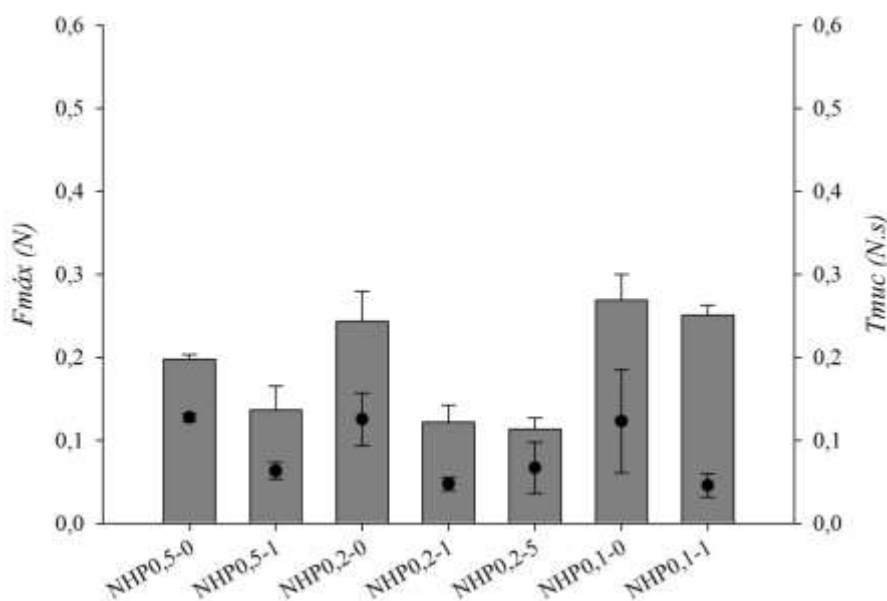
Comparando-se com o AH e HP, a QS apresentou o maior valor de $F_{máx}$ ($p < 0,05$). A QS é um polícatión e apresenta a capacidade de estabelecer ligações eletrostáticas com a mucina, por meio da interação de seus grupamentos amino protonados com os grupamentos de ácido siálico, além de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, sendo considerado um material com importantes propriedades mucoadesivas (SOSNIK et al., 2014).

O AH e o HP, ambos aniônicos, apesar de apresentarem menor $F_{máx}$ (Figura 41), também são capazes de promover a mucoadesão por serem hidrofílicos, com a presença de grupamentos que podem estabelecer ligações supramoleculares não covalentes, como as de hidrogênio e cadeias flexíveis que favorecerem a interpenetração na camada do muco de acordo com a teoria da difusão (ANDREWS et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

Observando os resultados, entre as NPs sem fármaco a proporção de AH e HP não influenciou significativamente a $F_{máx}$ e o T_{muc} ($p > 0,05$) (Figura 41). Entre as NPs com MTX, a NHP0,1-1 apresentou maior $F_{máx}$ ($p < 0,05$), enquanto as NHP0,5-1; NHP0,2-1 e

NHP0,2-5 não apresentaram diferença significativa na força e trabalho de mucoadesão ($p>0,05$) (Figura 42).

Figura 42. Gráfico comparativo da força máxima de mucoadesão - $F_{máx}$ (N); representada pelas barras e trabalho de mucoadesão- T_{muc} (N.s); representado pelos pontos, das nanopartículas com e sem MTX.



A incorporação de fármaco às NPs influenciou de forma significativa a força máxima de mucoadesão ($p<0,05$), como é possível observar na Figura 42, em que as amostras NHP0,5-1, NHP0,2-1 e NHP0,2-5 apresentaram menor $F_{máx}$, comparadas as NHP0,5-0 e NHP0,2-0, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram os dados do ensaio *in vitro* de interação com a mucina, em que a incorporação de fármaco também reduziu a capacidade de adsorção de mucina das amostras nestas proporções.

Devido ao potencial zeta positivo das NPs e a característica aniônica da mucina presente no muco, possivelmente a interação eletrostática é a principal força responsável pela consolidação do processo de mucoadesão. A adição de MTX promoveu a redução significativa da carga residual positiva das NPs (item 6.3.1, Figura 19), reduzindo, provavelmente, a força de atração e interação entre a superfície do sistema e do substrato biológico.

Além disso, de acordo com a análise de tamanho das partículas (item 6.3.1, Figura 18), a adição do MTX pode ter levado a formação de pontos adicionais de interação eletrostática

entre os grupamentos ionizáveis dos polímeros, rearranjando as cadeias poliméricas e, formando uma malha mais compacta, responsável pela redução do diâmetro médio das partículas. No processo de mucoadesão, durante a etapa de contato, deve ocorrer a transferência de água do muco para as nanopartículas que intumescem devido ao caráter hidrofílico dos polímeros.

Considerando que nas partículas sem fármaco a malha é mais dilatada, o intumescimento deve ser favorecido a maior flexibilidade das cadeias e, conseqüentemente, a interação com as cadeias de glicoproteína presentes no muco. No caso das nanopartículas com fármaco, em que uma estrutura mais compacta deve ser formada, o intumescimento deve ser desfavorecido, e a menor flexibilidade e disponibilidade das cadeias deve desfavorecer a interação entre os substratos, bem como a consolidação do processo de adesão (SMART, 2005; ANDREWS et al., 2009), justificando o comportamento observado.

O conhecimento da variação na produção de mucina em doenças intestinais inflamatórias e no câncer colônico e a compreensão da influência da composição das NPs (como proporção e concentração de polímeros e de fármacos) na mucoadesividade pode permitir a modulação do sistema de liberação de acordo com necessidades específicas, visando a maior eficácia terapêutica.

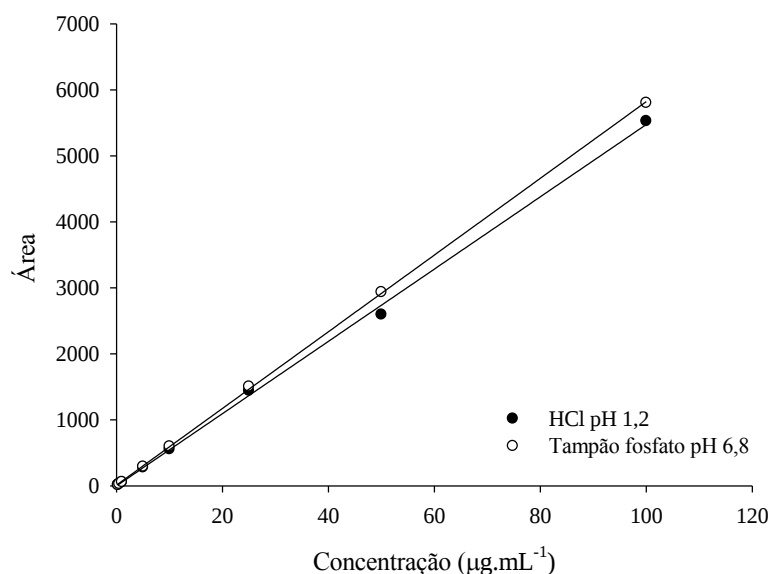
6.7. Estudos de dissolução do MTX

6.7.1. Estudo de solubilidade do MTX

Para o ensaio de dissolução *in vitro* do MTX, deve-se trabalhar dentro das condições *sink*, portanto a avaliação da solubilidade do fármaco é um parâmetro determinante para este teste.

A solubilidade do MTX foi determinada nos meios de dissolução que serão utilizados (pH 1,2 e 6,8), através do método do equilíbrio, no qual o fármaco é adicionado em excesso garantindo a saturação do meio (PEZZINI et al., 2007).

As curvas de calibração do fármaco foram obtidas nos meios propostos (Figura 43), e as equações das retas utilizadas para o cálculo da concentração de saturação em HCl e tampão fosfato foram $y = 54,758x - 0,491$ ($r^2 = 0,9989$) e $y = 58,101x + 11,719$ ($r^2 = 0,9999$), respectivamente.

Figura 43. Curvas de calibração do MTX em HCl pH 1,2 e Tampão fosfato pH 6,8.

O comportamento pH dependente do MTX foi evidenciado, bem como a solubilidade do MTX na saturação determinada. Em HCl o valor obtido foi de $0,521 \text{ mg.mL}^{-1}$ e em tampão fosfato de $2,31 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os valores encontrados permitem trabalhar dentro das condições *sink*, considerando o volume do meio que será utilizado e a concentração de fármaco nas partículas.

6.7.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do MTX

A eficácia terapêutica dos fármacos administrados pela via oral depende de diversos fatores, dentre eles sua capacidade de alcançar o sítio de ação/absorção na concentração terapêutica adequada. Essa via de administração impõe diversas barreiras que podem influenciar a absorção dos fármacos, como a variação de pH ao longo do TGI, a qual pode atuar decisivamente no processo de dissolução do fármaco (DATE et al., 2016).

Neste contexto, a compartimentalização do fármaco em nanoestruturas pode permitir a proteção contra degradação, bem como a modificação do perfil de dissolução (MUÈLLER et al., 2000).

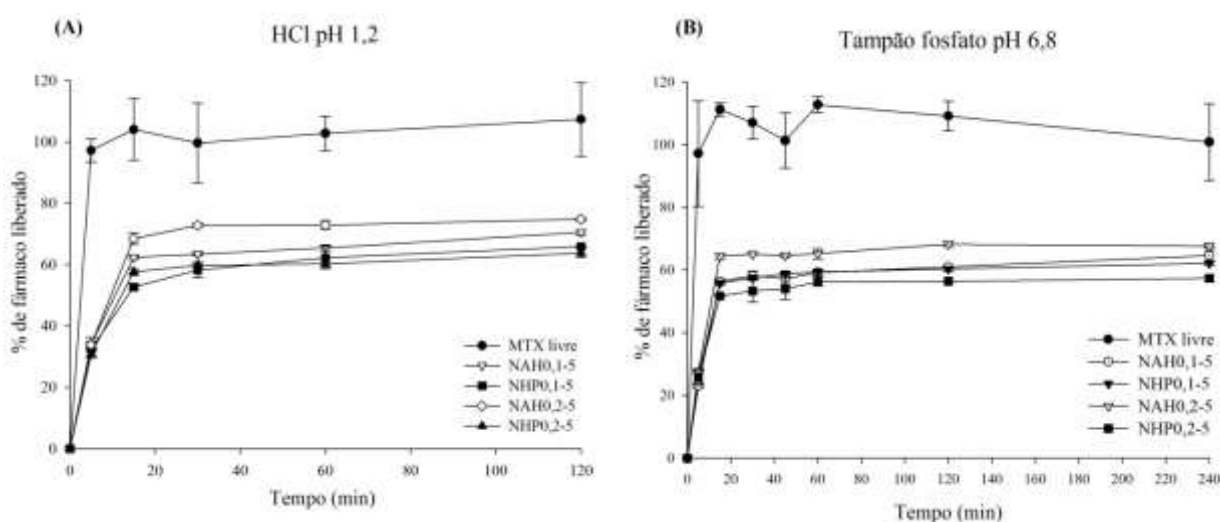
Considerando que a dissolução é uma etapa fundamental na disponibilidade do fármaco, é importante avaliar a velocidade com que esse processo ocorre, e isso pode ser feito através da avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é indispensável no

desenvolvimento de novos sistemas de liberação e pode, em alguns casos, permitir a previsão do comportamento *in vivo* do sistema (PREZOTTI et al., 2014).

Para esse estudo foram selecionadas as amostras NHP0,2-5, NHP0,1-5, NAH0,2-5 e NAH0,1-5, a fim de se avaliar a influência da proporção polimérica e do HP no perfil de dissolução do MTX.

Os perfis de liberação do MTX a partir dessas nanopartículas, em pH 1,2 e 6,8 estão apresentados na Figura 44.

Figura 44. Perfis de liberação *in vitro* do MTX livre e associado às nanopartículas, em (A) pH 1,2 e (B) pH 6,8.



Na Figura 44 (A), é possível observar uma redução significativa das taxas de dissolução do MTX nanoencapsulado, em relação ao fármaco livre, em que 97,2% do fármaco encontrava-se em solução nos 5 min iniciais do teste (Tabela 12).

Considerando que a QS é altamente solúvel em pH ácido e, em ambos os sistemas é o polímero predominante na formulação, essa significativa redução da taxa de dissolução, mesmo quando o polímero gastrorresistente (HP) não estava presente, pode indicar a menor solubilidade das nanoestruturas em meio ácido, em comparação aos polímeros livres. Este comportamento pode estar relacionado a formação de estruturas cristalinas, de acordo com os dados de DRX (item 6.3.4), as quais além de resultarem na formação de nanoestruturas com reduzida solubilidade, também permitiram o efetivo aprisionamento do fármaco, dificultando

os processos de dissolução e posterior difusão através da matriz polimérica (MAKHLOF et al., 2011; PEDREIRO et al., 2016).

Tabela 12. Porcentagens de MTX liberado em relação ao tempo.

Amostras	% de fármaco liberado					
	5 min		15min		120 min	240 min
	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8
MTX livre	97,2±3,8	97,2±16,7	104,1±10	111,2±2,0	107,3±12,7	100,1±12,3
NAH0,1-5	34,1±2,2	23,1±0,9	62,4±0,5	56,4±0,5	70,5±0,9	64,7±1,6
NHP0,1-5	32,6±2,2	25,9±2,4	52,7±0,8	55,8±0,6	65,9±0,2	62,1±0,5
NAH0,2-5	33,8±0,9	27,7±0,2	68,5±1,8	64,4±0,7	74,7±0,5	67,7±0,5
NHP0,2-5	30,9±1,5	25,7±2,4	57,6±1,0	51,7±0,2	63,7±1,5	57,4±1,2

Em 15 min de ensaio em pH 1,2, pode-se observar que mais de 60 % de MTX foi liberado das NPs NAH0,1-5 e NAH0,2-5, atingindo 70,5% e 74,7%, respectivamente, em 120 min. Em contrapartida, para as NPs NHP0,1-5 e NHP0,2-5, no mesmo intervalo de tempo, a liberação foi menor que 60%, alcançando 65,9% e 63,7% de liberação em 120 min, respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 12).

Avaliando-se o perfil de liberação em pH 6,8 (Figura 44 (B)), todas as amostras apresentaram menor porcentagem de liberação (57,4% a 67,7%), em 240 min, em relação ao meio ácido, provavelmente devido a baixa solubilidade da QS neste valor de pH; componente majoritário da matriz do sistema.

Apesar do HP ser solúvel neste valor de pH, as nanopartículas NHP0,1-5 e NHP0,2-5 liberaram menor porcentagem de fármaco (62,1% e 57,4%, respectivamente), comparando-se com as amostras NAH0,1-5 e NAH0,2-5 (64,8% e 67,7%, respectivamente), ao final do ensaio.

Provavelmente, a complexação com esse polímero aniônico, permitiu a formação de uma rede polimérica mais rígida, de menor mobilidade, capaz de impor maior resistência à difusão do meio de dissolução para seu interior e consequentemente, à dissolução do fármaco associado (Kulkarni et al., 2011). Esse comportamento pode indicar que o sistema tem a capacidade de controlar a liberação do MTX no meio que simula a região colônica, podendo

permitir a liberação controlada do fármaco, que em sua forma livre apresentou 100% de dissolução em 5 min (Tabela 12).

Apesar da redução das taxas de liberação para as NPs contendo HP em meio ácido (5% para a NHP0,1-5 e 10% para a NHP0,2-5) em 120 min, a discreta redução dos percentuais de MTX liberado em pH 6,8, em relação ao pH 1,2, nos primeiros 15 min de teste e o platô observado a partir dos 30 min, indicam que os sistemas desenvolvidos não apresentaram comportamento pH responsivo (Figura 44, Tabela 12).

Considerando a elevada capacidade mucoadesiva do sistema desenvolvido (item 6.6.) e a potencial eficiência em modular a interação celular (item 6.8.2) tecnologias como a de revestimento entérico das NPs ou sua incorporação em cápsulas gastrorresistentes, podem representar estratégias tecnológicas alternativas para e alcançar a redução das taxas de liberação de fármaco em meio ácido.

6.7.2.1. Análise da cinética de liberação do fármaco

A liberação de fármacos a partir de nanocarreadores baseados em polímeros naturais hidrofílicos pode ser governada por diversos mecanismos tais como a dessorção do fármaco associado à superfície da partícula, o relaxamento das cadeias poliméricas seguido da difusão do fármaco através da matriz intumescida, a difusão através de uma membrana controladora das taxas de liberação, a erosão da matriz ou, como em muitos casos, pela combinação de vários desses mecanismos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A interpretação quantitativa dos valores obtidos no ensaio de liberação *in vitro* foi realizada, utilizando equações que traduzem matematicamente a curva obtida em função de parâmetros relacionados à forma farmacêutica (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

De acordo com o valor do coeficiente de correlação (r^2), para as NPs NAH0,1-5 e NAH0,2-5, o modelo que apresentou melhor correlação com os dados de liberação do MTX em pH 1,2 foi o de Korsmeyer – Peppas, enquanto para as NPs NAP0,1-5 e NAP0,2-5 foi o modelo de Weibull que melhor se correlacionou com os dados de liberação (Tabela 13).

Em tampão fosfato (pH 6,8), o modelo de Weibull foi o que melhor se correlacionou com os dados de liberação das nanopartículas, exceto para a NAH0,2-5, para a qual o modelo de Korsmeyer – Peppas foi o mais adequado (Tabela 13).

Tabela 13. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco.

Amostras	pH 1,2				pH 6,8			
	Korsmeyer – Peppas		Weibull		Korsmeyer – Peppas		Weibull	
	r ²	n	r ²	b	r ²	n	r ²	b
NAH0,1-5	1,000	0,6431	-	-	-	-	0,9989	0,0801
NHP0,1-5	-	-	1,000	0,234	-	-	0,9995	0,0656
NAH0,2-5	1,000	0,5505	-	-	1,000	0,7681	-	-
NHP0,2-5	-	-	0,9997	0,0518	-	-	0,9997	0,1476

O modelo de Korsmeyer-Peppas baseia-se na Lei das Potências, o qual deve ser aplicado aos dados dos primeiros 60% de liberação, estabelece uma relação exponencial entre a liberação do fármaco com o tempo (Equação 15) (RITGER; PEPPAS, 1987; PAPADOPOULOU et al., 2006).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = K \times t^n \quad (\text{Eq. 15})$$

Em que Mt = a quantidade de fármaco liberado no tempo t , M_{∞} = a quantidade de fármaco liberado no tempo infinito, ou seja, está diretamente relacionado a massa inicial de fármaco, n = expoente de liberação e k = a constante cinética.

O valor numérico do expoente n dessa equação determina o mecanismo de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica. Para sistemas esféricos, valores de $n = 0,43$ indicam que a liberação é governada pelo mecanismo de difusão Fickiana. Valores de $0,43 < n < 0,85$ correspondem ao transporte anômalo ou não-Fickiano; os processos de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas contribuem de forma semelhante para o controle da liberação do fármaco. Para $n = 0,85$, o mecanismo determinado como controlador das taxas de liberação é relacionado ao transporte caso II, no qual o intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas são os fatores limitante para que ocorra a liberação do fármaco. Valores de $n > 0,85$ representam o mecanismo de transporte super caso II, no qual devido ao elevado estado de mobilidade das cadeias poliméricas ou erosão da matriz ocorre uma aceleração das taxas de liberação do fármaco (RITGER; PEPPAS, 1987; PREZOTTI et al., 2014).

De acordo com os valores de n , em pH 1,2, para as amostras NAH0,1-5 e NAH0,2-5 (Tabela 13), a liberação do MTX foi controlada pelas taxas de relaxamento das cadeias

poliméricas e de difusão do fármaco na estrutura intumescida, caracterizando o transporte anômalo. Este comportamento mostra-se coerente, uma vez que nesse valor de pH, os grupamentos amina da QS devem estar protonados promovendo a expansão da rede polimérica, principalmente por repulsão eletrostática, permitindo a difusão do meio para o interior da matriz, a dissolução do fármaco e sua posterior difusão para o meio de dissolução.

Em contrapartida, as amostras NHP0,1-5 e NHP0,2-5 apresentaram melhor correlação com o modelo de Weibull, o qual expressa a quantidade de fármaco acumulado no meio de dissolução (M) em um determinado tempo (t), de acordo com a Equação 16 e se ajusta a diferentes perfis de dissolução (ADAMS et al., 2001).

$$M = 1 - \exp \left[-\frac{(t-t_i)^b}{a} \right] \quad (\text{Eq. 16})$$

Em que t_i = intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução/liberação (na maioria dos casos é zero) e b = parâmetro de forma que caracteriza a curva e a liberação.

O valor numérico do expoente b indica o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica. Valores de $b < 0,75$ indicam difusão Fickiana, para $0,75 < b < 1$ indicam difusão não Fickiana e $b > 1$ indica um mecanismo complexo de liberação do fármaco que pode envolver difusão, intumescimento e/ou erosão da matriz (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Como observado na Tabela 13, os valores de coeficiente b foram menores que 0,75, em pH 1,2, indicando que a liberação do fármaco é governada pela difusão Fickiana. Provavelmente, a adição do HP à matriz permitiu maior grau de complexação polieletrólítica e organização estrutural, de forma que as taxas de difusão do fármaco através dessa estrutura mais estável e organizada foram responsáveis pelo controle da liberação.

Portanto, pode-se observar que a presença de HP promoveu a modificação do perfil e do mecanismo de liberação do MTX em meio ácido.

Em tampão fosfato pH 6,8, observou-se melhor correlação também com o modelo de Weibull para as amostras NAH0,1-5, NHP0,1-5 e NHP0,2-5, com valor de b menor que 0,75. Para essas amostras a difusão foi o processo limitante para a liberação do MTX. Nesse valor de pH, apesar da ionização do AH e HP, a QS encontra-se desprotonada, o que pode desfavorecer o intumescimento e relaxamento das cadeias, de forma que a difusão do fármaco através dessa estrutura mais rígida condicione a liberação do fármaco.

No entanto, a liberação do MTX associado à amostra NAH0,2-5 se correlacionou melhor com o modelo de Korsmeyer-Peppas, indicando o mecanismo anômalo, o qual envolve os processos de difusão e intumescimento como controladores da liberação. Desta forma, para esta proporção polimérica (1:0,2 e 1:0,2:0,2), a adição de HP influenciou o mecanismo de liberação e consequentemente, o perfil de liberação, com a redução das taxas de fármaco liberado em pH 6,8, como observado na Figura 44.

6.8. Estudos celulares

Para esta etapa do projeto, selecionou-se as amostras NAH0,2-0, NAH0,2-5, NHP0,2-0 e NHP0,2-5. No entanto considerando os métodos disponíveis para a quantificação do fármaco foi necessário realizar o aumento de 4 vezes na concentração inicial de polímeros e de fármaco, adaptando-se o método de desenvolvimento e mantendo-se a razão entre os componentes. Dessa forma a nomenclatura citada no item 6.2 foi acrescida do sufixo -P, para estas amostras. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas de acordo com o diâmetro, potencial zeta, EI% e morfologia, descritos na Tabela 14 e, por apresentarem características similares os sistemas com menor concentração os estudos celulares foram conduzidos.

Tabela 14. Características das nanopartículas desenvolvidas para os ensaios celulares.

Amostra	Diâmetro médio $\pm$ DP	Potencial zeta $\pm$ DP	EI%
NAH0,2-0P	409,5 $\pm$ 3,61	+22,3 $\pm$ 0,31	-
NAH0,2-5P	378,7 $\pm$ 6,53	+25,2 $\pm$ 0,57	36,2 $\pm$ 0,90
NHP0,2-0P	448,6 $\pm$ 15,80	+20,3 $\pm$ 0,85	-
NHP0,2-5P	357,4 $\pm$ 0,61	+19,6 $\pm$ 0,94	29,8 $\pm$ 4,51

6.8.1. Ensaio de viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a segurança e biocompatibilidade dos materiais e das NPs desenvolvidas, para a administração oral do MTX, tendo como sítio alvo de ação e/ou absorção a região colônica, realizou-se o ensaio de viabilidade celular *in vitro* com as linhagens Caco-2 e HT29-MTX.

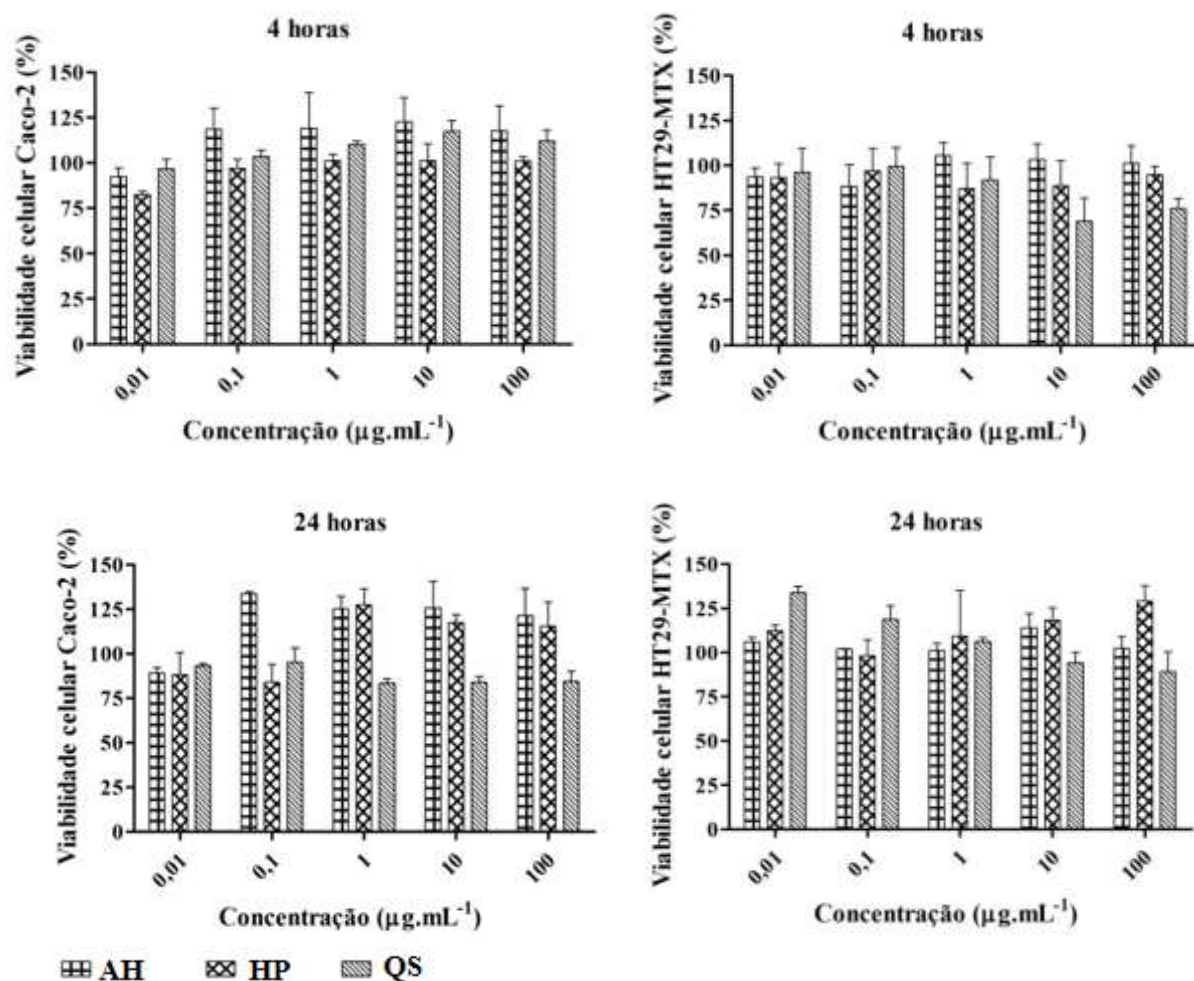
As células Caco-2 têm origem de adenocarcinoma de cólon humano, em cultivo *in vitro* essa linhagem é capaz de se diferenciar expressando características morfológicas como microvilosidades na borda apical e junções paracelulares e, funções bioquímicas com

atividade enzimática de hidrolases e transporte ativo e passivo de açúcares, aminoácidos e fármacos, semelhantes às das células absorptivas intestinais *in vivo* (LIND et al., 2007; ARAÚJO; SARMENTO, 2013). As HT29-MTX também são uma linhagem derivada do epitélio intestinal humano, entretanto, apresentam morfologia caliciforme e em cultivo sob a exposição ao MTX diferenciam-se em células muco-secretoras (MAHLER et al., 2009).

Dessa forma ambas as linhagens foram selecionadas para este ensaio, por serem células constituintes do epitélio intestinal e dos modelos utilizados no ensaio de permeabilidade *in vitro*.

Inicialmente avaliou-se a citotoxicidade dos polímeros utilizados na composição das nanopartículas (Figura 45).

Figura 45. Viabilidade celular (%) das linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX, após 4h e 24h de incubação com os polímeros.



Após 4 e 24 h de incubação com os polímeros, a porcentagem de viabilidade celular das linhagens Caco-2 e HT29-MTX foi maior que 70% para todas as concentrações testadas, evidenciando que o AH, o HP e a QS são excipientes seguros para a formulação dos sistemas de liberação (Figura 45).

Adicionalmente, observou-se que para o AH e HP, em 24 h, um aumento da viabilidade com o aumento da concentração, o que não ocorreu para a QS provavelmente devido a capacidade deste polímero de perturbar ligeiramente a membrana plasmática celular, de forma reversível ou irreversível (THANOU et al., 2001).

A citotoxicidade das NPs sem e com incorporação de MTX, como sistemas de liberação de fármacos cólon-específicos, também foi avaliada (Figura 46).

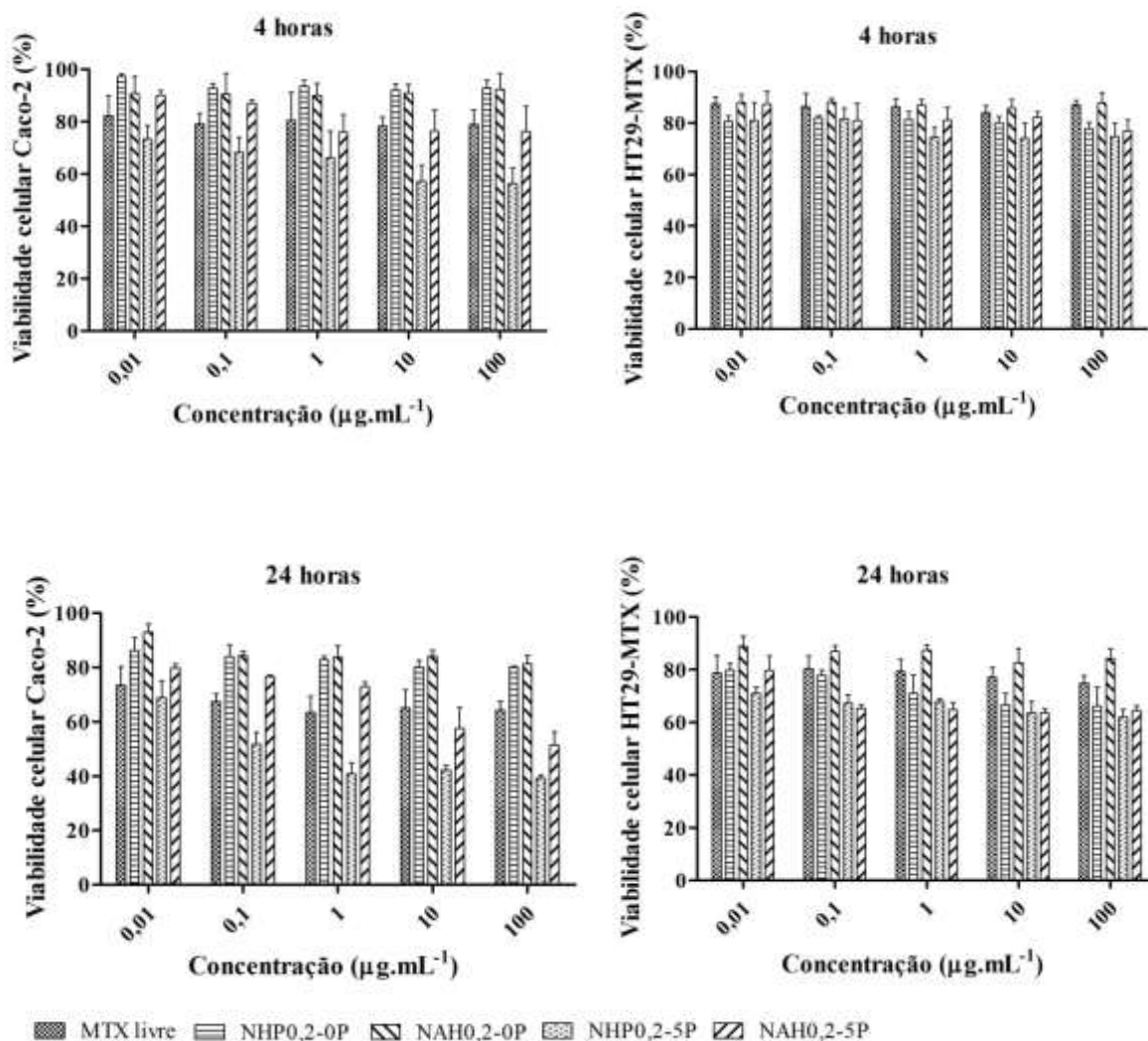
Para a linhagem Caco-2, após 4 h de incubação, não observou-se diferença relevante entre a viabilidade para as amostras e o fármaco livre. No entanto, após a incubação de 24 h, uma ligeira redução da viabilidade das células Caco-2 foi observada, sendo mais pronunciada para as amostras NAH0,2-5P e NHP0,2-5P nas concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (57% e 45%, respectivamente) e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (51% e 40%, respectivamente), indicando que em contato com as maiores concentrações por um período prolongado, pode ocorrer uma maximização do efeito de citotoxicidade característico da QS e do MTX.

A linhagem HT29-MTX apresentou maior viabilidade em contato com todas as amostras testadas (>80% em 4 h e >60% em 24 h), comparando-se com a linhagem Caco-2 (Figura 46).

Estes valores mais elevados de viabilidade podem ser explicados pela produção e secreção da camada de muco, característica desse tipo celular, a qual representa uma barreira física protegendo as células (ANTUNES et al., 2013; SHRESTHA et al., 2016).

Em resumo, além de avaliar a segurança do sistema, esse estudo foi utilizado para escolher a concentração não tóxica e mensurável para a realização estudos de permeabilidade *in vitro*.

Figura 46. Viabilidade celular (%) das linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX, após 4h e 24h de incubação com as NPs.



6.8.2. Permeabilidade intestinal *in vitro*

Além da caracterização físico-química, é de fundamental importância o conhecimento e avaliação do desempenho biológico das NPs desenvolvidas. Considerando a administração oral do sistema e a ação do MTX na região do cólon, nesse estudo foram utilizados os modelos celulares capazes de mimetizar as condições fisiológicas desta região do TGI como a presença das células formando o epitélio intestinal, produção de muco e presença de células M fagocitárias.

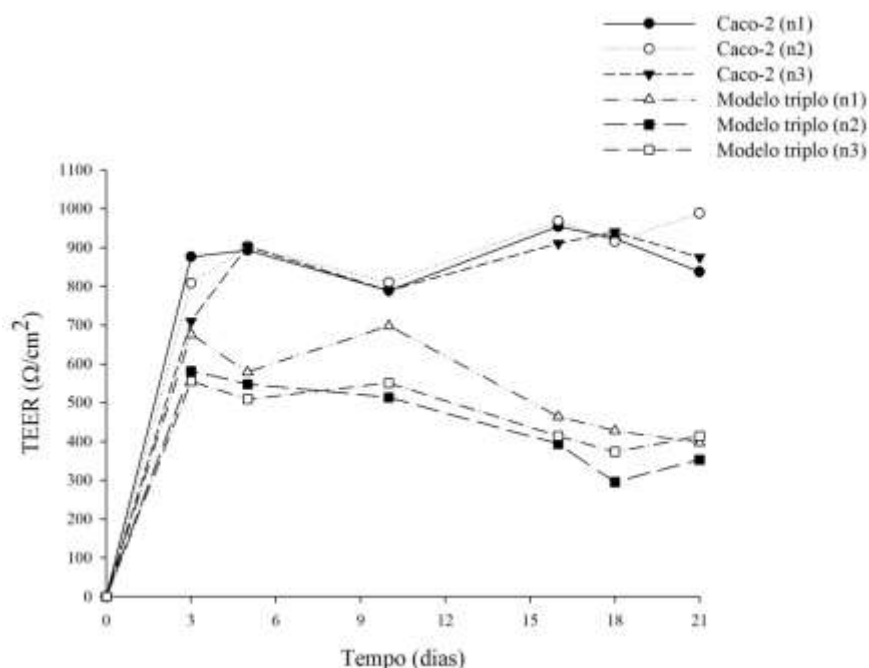
Os métodos de avaliação de permeabilidade intestinal *in vitro* que utilizam cultura de células apresentam diversas vantagens em relação aos *in vivo*, tais como redução do número de variáveis experimentais, dados mais reprodutíveis, menor tempo de execução além de custo reduzido (ANTUNES et al., 2013).

Monocultura de células Caco-2 é um dos modelos mais utilizados neste tipo de estudo, devido tanto ao comportamento estrutural com aos enterócitos que constituem o epitélio do intestino grosso, quanto funcional, com a expressão de importantes transportadores de superfície, como a P-gp, que age na redução da internalização e permeabilidade intestinal de medicamentos como o MTX (ARAÚJO; SARMENTO, 2013; LEONARD et al., 2010; SHAH et al., 2006). Contudo, apesar de ser um modelo bem estabelecido, as monoculturas de Caco-2 não mimetizam a complexa composição do tecido intestinal e as interações entre os elementos celulares, bem como não são capazes de produzir o muco que forma a barreira protetora da mucosa (BOEGH et al., 2014).

Assim, a co-cultura tripla de células é um modelo mais complexo, constituído pelas células Caco-2, HT29-MTX, as quais são produtoras de muco e representam o segundo tipo celular mais abundante na composição do epitélio intestinal, além da linhagem de células linfoblásticas Raji B; capaz de induzir a diferenciação das Caco-2 em células M (Araújo e Sarmento, 2013). As células M estão presentes no tecido intestinal em menor quantidade, recobrando os folículos linfoides e são responsáveis pelo transporte transepitelial de nutrientes e outras substâncias exógenas, sendo muito estudadas como alvo para promover aumento da biodisponibilidade de anticorpos administrados pela via oral (GARINOT et al., 2007; SCHIMPEL et al., 2014).

Portanto, nesse estudo, a monocultura de Caco-2 foi explorada como modelo padrão para o estudo da permeabilidade intestinal, enquanto o modelo de co-cultura tripla de células foi empregado em busca de informações complementares, principalmente sobre a influência da camada de muco e de transportadores específicos na permeabilidade das NPs.

Para o ensaio os modelos celulares foram cultivados conforme o item 5.8.2, com medição dos valores de TEER durante os 21 dias de cultura. Os modelos foram considerados viáveis para o ensaio, de acordo com a faixa de TEER observado após o 16º dia de cultura (Figura 47).

Figura 47. Valores de TEER dos modelos de monocultura e co-cultura tripla, durante 21 dias.

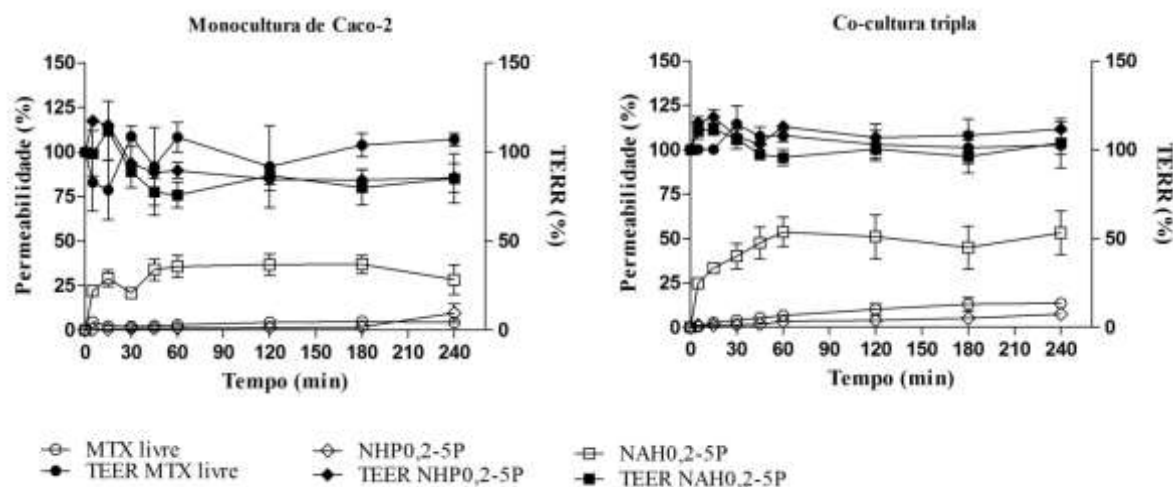
Como era esperado, os valores de TEER na monocultura de Caco-2 foram superiores, aos da co-cultura tripla. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que as junções paracelulares dos enterócitos são mais apertadas, com um raio de poro de cerca de 5 Å. A co-cultura, por apresentar as células HT29-MTX, secretoras de muco, ligadas às Caco-2 por junções paracelulares de poro maior (cerca de 6-13 Å), modulam a geometria da monocamada, tornando-a mais permeável e portanto com menor valor de TEER. A queda do valor de TEER observado no modelo tripla após a inclusão das células Raji B, ocorre pela indução da diferenciação das Caco-2 em células M, as quais também formam junções paracelulares com maior diâmetro de poro (HILGENDORF et al., 2000).

Após estabelecer os modelos, baseado no resultado do estudo do item 6.8.1, a concentração de 100 µg.mL⁻¹ do fármaco livre, NAH0,2-5P, NHP0,2-5P (em relação à concentração final de MTX) foi selecionada.

O perfil de permeabilidade do MTX livre e incorporado às nanopartículas está apresentado na Figura 48.

Os valores de TEER mantiveram-se em torno de 100%, em relação ao valor inicial, provando a integridade das monocamadas durante e ao final do ensaio de permeabilidade (Figura 48).

Figura 48. Perfil de permeabilidade do MTX livre e associado às NPs e variação de TEER durante o experimento em cultura celular.



Como é possível observar, o perfil de permeabilidade do MTX livre e associado à amostra NHP0,2-5P foi semelhante para ambos os modelos celulares; monocultura de Caco-2 e modelo triplo, durante 240 min (Figura 48).

Para a NAH0,2-5P observou-se um perfil diferente, com significativo aumento da permeabilidade do fármaco, em ambos os modelos celulares. Para a monocultura, após 240 min, 28,3% do MTX permeou a monocamada, valor aproximadamente 3 vezes maior que o fármaco livre e ao associado à NHP0,2-5P.

De acordo com os dados de liberação do fármaco (item 6.7.2), provavelmente a nanopartículas NAH0,2-5P liberou uma maior quantidade de MTX na periferia celular e, dessa forma uma maior quantidade de fármaco deveria estar disponível pra permear a monocamada, comparando-se com a amostra NHP0,2-5P.

Podemos ainda sugerir que na NAH0,2-5P, os sítios catiônicos da QS estariam mais disponíveis, observados pelos valores mais positivos de potencial zeta (Tabela 14, item 6.3.1), em comparação com a NHP0,2-5P, facilitando dessa forma o transporte paracelular do MTX associado à essa nanopartícula ou já liberado na periferia.

Conforme é descrito, a QS vem sendo utilizada como promotora de permeação, devido a sua capacidade de atuar reversivelmente na abertura das junções paracelulares, de característica negativa, via interações eletrostáticas. As junções paracelulares são complexos proteicos responsáveis por manter as células epiteliais firmemente unidas. São compostas por uma combinação de proteínas integrantes transmembranares, incluindo claudinas, ocludinas e

molécula de adesão juncional, juntamente com várias outras proteínas reguladoras. No epitélio intestinal, essas junções funcionam como barreiras, permitindo a absorção da água e eletrólitos do conteúdo luminal, mas evitando a passagem de patógenos e macromoléculas para a circulação sistêmica (YEH et al., 2011).

No modelo triplo, a permeabilidade do MTX associado à NAH0,2-5P aumentou de forma constante nos primeiros 60 min, atingindo uma porcentagem 5 vezes maior de fármaco permeado em comparação com o MTX livre e ao associado à NHP0,2-5P (Figura 48).

Esse comportamento pode ser atribuído à maior mucoadesividade da nanopartícula NAH0,2-5P, que pode permitir uma interação mais efetiva desse sistema com a camada de muco produzida pelas células HT29-MTX, induzindo consequentemente o aumento no gradiente de fármaco local e na permeabilidade do MTX.

Os resultados de permeabilidade aparente (Papp) do fármaco, a porcentagem de MTX no compartimento apical (%CA) e acumulada nas células (%ACM) estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15. Permeabilidade aparente (Papp) das amostras, % de MTX no compartimento apical (%CA) e % de MTX associado às células e/ou à camada de muco (%ACM). Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP.

Amostra	Monocultura Caco-2			Co-cultura tripla		
	Papp x 10 ⁶ (cm/s)	% CA	%ACM	Papp x 10 ⁶ (cm/s)	% CA	%ACM
MTX livre	1,0 $\pm$ 0,2	75,4 $\pm$ 7,9	4,7 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,05	83,0 $\pm$ 9,7	4,1 $\pm$ 1
NHP0,2-5P	2,1 $\pm$ 1,1	61,3 $\pm$ 1,7	10,0 $\pm$ 1,9	1,6 $\pm$ 0,4	60,4 $\pm$ 2,5	10,9 $\pm$ 0,4
NAH0,2-5P	6,3 $\pm$ 1,8	31,4 $\pm$ 13,4	10,8 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 2,7	27,8 $\pm$ 9,1	18,1 $\pm$ 6

Os valores de Papp apresentados para a nanopartícula NAH0,2-5P, foram aproximadamente 3 e 7,5 vezes maiores que os apresentados para a NHP0,2-5P, nos modelos de monocultura e co-cultura tripla, respectivamente, resultados que corroboram com o perfil observado na Figura 48.

Para a monocultura de Caco-2, embora os valores de Papp das NPs sejam diferentes, os valores de %ACM foram semelhantes para ambos os sistemas (aproximadamente 10%), indicando que o padrão de interação biológica das NPs NAH0,2-5P e NHP0,2-5P com as células Caco-2 foi semelhante.

Na co-cultura tripla, o maior valor de %ACM para a NAH0,2-5P em relação à NHP0,2-5P (18,1% e 10,9%, respectivamente), pode estar relacionado à maior capacidade mucoadesiva deste sistema, uma vez que a adição de HP reduziu o potencial zeta (item 6.8, Tabela 14), reduzindo provavelmente o grau de interação com a mucina, presente no muco, governado principalmente pela atração e interações eletrostáticas.

Esse aumento da permeabilidade do MTX incorporado à NAH0,2-5P, pode ser um atributo favorável quando o efeito sistêmico do fármaco é desejado.

Por outro lado, a nanopartícula NHP0,2-5P, apesar de apresentar perfil de permeabilidade semelhante ao fármaco livre (Figura 48), promoveu o aumento da concentração de fármaco acumulado nas células, comportamento evidenciado pelos maiores valores de %ACM, os quais foram aproximadamente 2 e 2,65 vezes maiores para a monocultura e co-cultura tripla, respectivamente (Tabela 15).

Esse resultado evidenciou que ambas as NPs foram capazes de promover o aumento da interação com as células intestinais, atributo favorável ao tratamento local de patologias intestinais.

A reduzida Papp do MTX incorporado na nanopartículas NHP0,2-5P, em relação a NAH0,2-5P, agrega particular vantagem à sua aplicação no tratamento local das doenças intestinais, uma vez que pode ser capaz de reduzir os efeitos adversos sistêmicos, atuando mais especificamente na região intracelular. Característica que torna esse sistema de liberação promissor para o objetivo do trabalho.

Para o MTX livre, os reduzidos valores de %ACM, associados à sua reduzida Papp e elevados valores de %CA (75,4% e 83% na monocultura e co-cultura tripla, respectivamente), estão em concordância com os relatos de que o MTX é um substrato da P-gp, com reduzidas taxas de permeabilidade e capacidade de acúmulo intracelular (BARRUECO et al., 1992).

6.8.2.1. *Microscopia confocal de varredura a laser*

Após os estudos de permeabilidade com as NPs, a integridade das monocamadas nas monoculturas e modelos triplos foi analisada, por meio da microscopia confocal.

De acordo com os ensaios de viabilidade, as nanopartículas NHP0,2-5P e NAH0,2-5P não induziram nenhum sinal de toxicidade, sendo possível observar uma monocamada confluenta, para todos os modelos utilizados no ensaio de permeabilidade (Figura 49 e Figura 50).

Portanto, a falta de integridade da monocamada não foi o motivo da diferença observada em termos de permeabilidade.

Figura 49. Imagem da microscopia confocal (A) monocultura de Caco-2 e (B) co-cultura tripla, após o ensaio de permeabilidade com a amostra NAH0,2-5P.

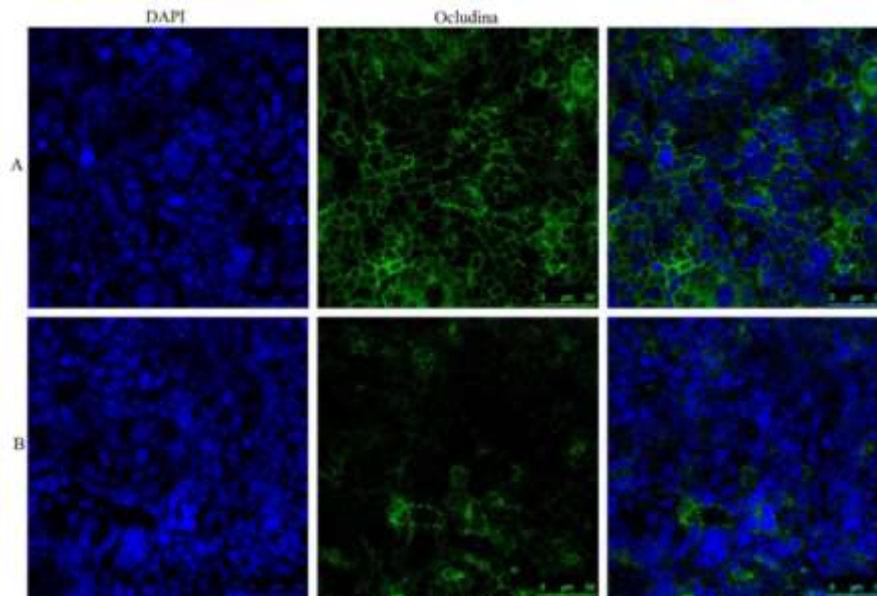
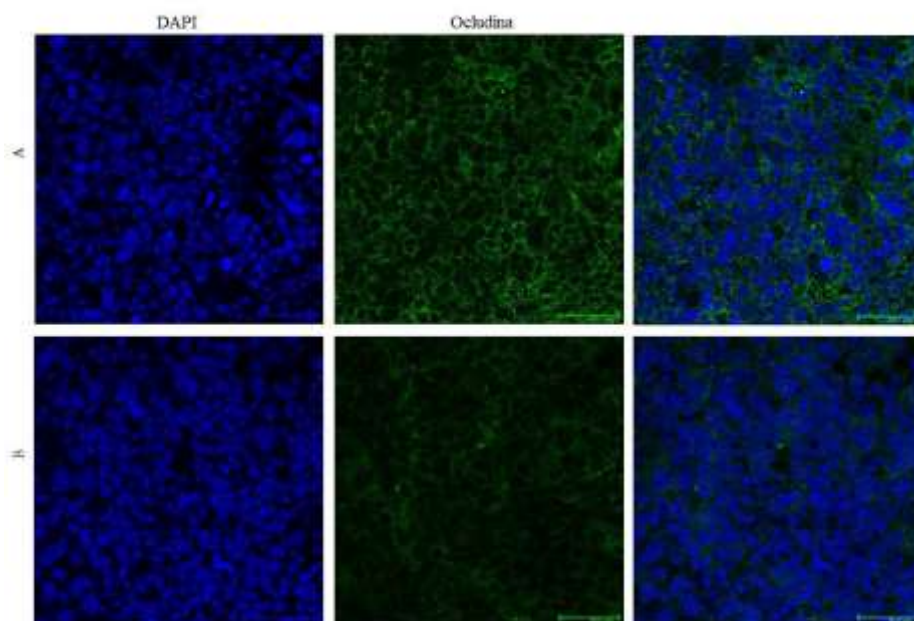


Figura 50. Imagem da microscopia confocal (A) monocultura de Caco-2 e (B) co-cultura tripla, após o ensaio de permeabilidade com a amostra NHP0,2-5P.



É possível observar na Figura 49 B e Figura 50 B, uma menor expressão de junções paracelulares (corados em azul), no modelo de co-cultura tripla de células, o que é consistente devido a presença de células HT29-MTX e células M.

7. CONCLUSÕES

Nanopartículas de QS/AH contendo ou não HP foram obtidas com sucesso através da técnica de complexação polieletrólítica, em condições reacionais amenas, dispensando o uso de solventes orgânicos e elevada energia. A eficiência de associação do MTX foi de aproximadamente 36,18%.

O conjunto de dados revelou a obtenção de estruturas com forma esférica, diâmetro na escala nanométrica e adequada homogeneidade de tamanho, além de potencial zeta positivo (superior a +18 mV) demonstrando que as NPs apresentam características e propriedades favoráveis a estabilidade do sistema, bem como a interação com a superfície celular. A incorporação do MTX permitiu a significativa redução de tamanho das NPs. A elevada capacidade mucoadesiva das NPs é um atributo favorável, pois deve permitir o contato mais efetivo e prolongado com a biointerface. A indicação da influência do pH na adsorção de mucina, favorecendo a mucoadesão nas porções inferiores do TGI, agrega particular vantagem ao sistema. Apesar da redução das taxas de liberação do MTX incorporado as NPs, em pH 1,2, a adição de HP ao sistema não evitou a liberação prematura do fármaco no meio ácido. Dessa forma, o uso de estratégias tecnológicas adicionais como a veiculação em cápsulas gastrorresistentes ou processo de revestimento com polímero entérico podem ser necessário para o aprimoramento do sistema. Os ensaios de viabilidade celular demonstraram a segurança dos polímeros e das NPs. Os ensaios de permeabilidade intestinal *in vitro*, utilizando monocultura de células Caco-2 e co-cultura tripla de células, que mimetizam o epitélio intestinal, evidenciaram a capacidade de modulação da permeabilidade do MTX, através da manipulação da composição das NPs, bem como o significativo aumento da associação do fármaco incorporado às NPs com as células intestinais, em relação ao fármaco livre, evidenciando a potencial aplicabilidade dessa plataforma tecnológica para a liberação e/ou absorção de fármacos no cólon, para o tratamento patologias locais ou sistêmicas.

REFERÊNCIAS

- ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1115-30, 2013.
- ADAMS, E. et al. Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 41-53, 2001.
- AHUJA, M.; KUMAR, S.; YADAV, M. Evaluation of mimosa seed mucilage as bucoadhesive polymer. **Yakugaku Zasshi**, v. 130, n. 7, p. 937-44, 2010.
- AL-QADIA, S. et al. Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: The role of hyaluronic acid on the nanoparticle's formation and activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 615-623, 2013.
- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 1-16, 2012.
- ALMALIK, A. et al. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1142-50, 2013.
- ANDREANI, T. et al. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1, p. 627-635, 2014.
- ANDREANI, T. et al. Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 118-26, 2015.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-18, 2009.
- ANTONI, L. et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 5, p. 1165, 2014.
- ANTUNES, F. et al. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 427-35, 2013.
- ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 128-34, 2013.
- ATUMA, C. et al. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G922-G929, 2001.

- AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.
- BAFNA, S.; KAUR, S.; BATRA, S. K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 20, p. 2893-904, 2010.
- BANSIL, R.; TURNER, B. S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 164-170, 2006.
- BARBI, M. D. S. et al. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865-874, 2015.
- BARRUECO, J. R.; O'LEARY, D. F.; SIROTNAK, F. M. Metabolic turnover of methotrexate polyglutamates in lysosomes derived from S180 cells. Definition of a two-step process limited by mediated lysosomal permeation of polyglutamates and activating reduced sulfhydryl compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15356-61, 1992.
- BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**, v. 369, n. 9573, p. 1641-1657, 2007.
- BECKER, L. C. et al. Final report of the safety assessment of hyaluronic acid, potassium hyaluronate, and sodium hyaluronate. **International Journal of Toxicology**, v. 28, n. 4 Suppl, p. 5-67, 2009.
- BENKE, M.; SHAFFER, B. Viscosupplementation treatment of arthritis pain. **Current Pain Headache Reports**, v. 13, n. 6, p. 440-446, 2009.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2004.
- BIRCH, N. P.; SCHIFFMAN, J. D. Characterization of self-assembled polyelectrolyte complex nanoparticles formed from chitosan and pectin. **Langmuir**, v. 30, n. 12, p. 3441-3447, 2014.
- BOEGH, M. et al. Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing in vitro model for assessment of intestinal drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 2, p. 227-235, 2014.
- BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 8, p. 1283-90, 2016.

- BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. D. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 502-508, 2006.
- BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. (ANVISA)., A. N. D. V. S. Diário Oficial da União 2003.
- BRESALIER, R. S. et al. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 3, p. 1037-45, 1991.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.
- BUCHHAMMER, H. M.; MENDE, M.; OELMANN, M. Formation of mono-sized polyelectrolyte complex dispersions: effects of polymer structure, concentration and mixing conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, n. 1, p. 151-159, 2003.
- CARBINATTO, F. M. et al. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 281-288, 2012.
- CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1-17, 2010.
- CASCONE, M. G. et al. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 5, p. 523-6, 2002.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Review Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.
- CHADHA, R. et al. Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical and other techniques. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 3, p. 245-57, 2009.
- CHAE, S. Y.; JANG, M. K.; NAH, J. W. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 383-94, 2005.
- CHEN, M. C. et al. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9826-38, 2011.
- CHO, K. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v.14, p. 1310-1316, 2008.
- CORDEIRO, M. L. S. et al. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, p. 252-262, 2014.
- CORFIELD, A. et al. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 589-594, 2000.

- COSNES, J. et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1785-1794, 2011
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
- COTTI, G. C. C. et al. Genetics of colorectal câncer. **Revista Médica**, n. 79, p. 45-64, 2000.
- CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 409-19, 2001.
- CURY, B. S. F. **Reticulação da alta amilose: Processo de obtenção, caracterização e avaliação do desempenho em sistema de liberação prolongada de fármacos**. 2005. 123 (Doutor). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista " Júlio de Mesquita Filho"
- DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.
- DASS, C. R.; CHOONG, P. F. M. The use of chitosan formulations in cancer therapy. **Informa Healthcare**, v.25, p.275-279, 2008.
- DATE, A. A.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 504-526, 2016.
- DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular nãoespecíficos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- DE OLIVEIRA, A. R. M., E.F.; MESQUITA, P.C.; FONSECA, J.L.C.; ROSSANEZI, G. F.-P., M.F.; DE OLIVEIRA, A.G.; SIVAJUNIOR,; A.A. Structural and termal properties of spray-dried methotrexate-loaded biodegradable microparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, n. 112, p. 555-565, 2013.
- DE OLIVEIRA, R. B. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.
- DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; BRITTO LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 621-628, 2008.
- DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 67-70, 2004.
- DU, L. et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6751-6760, 2008.
- DUBES, A. et al. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 279-82, 2003.

- EDWARDS, S. H. Intra-articular drug delivery: the challenge to extend drug residence time within the joint. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 15-21, 2011.
- ENSIGN, L. M. et al. Mucus penetrating nanoparticles: biophysical tool and method of drug and gene delivery. **Advance in Ecological Environment Functional Materials and Ion Industry**, v. 24, n. 28, p. 3887-94, 2012.
- ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631-48, 2015.
- EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-348, 2001.
- FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152-157, 1998.
- FEBRIANTO, J. et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2-3, p. 616-45, 2009.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.
- FERRARI, P. C. **Sistemas multiparticulados revestidos para liberação colônica de metronidazol**. 2011. 115 (Doutor). Drugs and medicines, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- FERREIRA, N. N. **HIDROGEIS pH RESPONSIVOS COMO POTENCIAIS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO DE BEVACIZUMABE**. 2015. 122 (mestrado). Drugs and medicines, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.
- FERREIRA, N. N. et al. A Novel pH-responsive Hydrogel Based on Calcium Alginate Engineered by the Previous Formation of Polyelectrolyte Complexes (PECs) Intended to Vaginal Administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1-33, 2017.
- FERRUA, M. J.; SINGH, R. P. Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. R151-162, 2010.
- FISCHER, M.; VÖGTLE, F. Dendrimers: from design to application—a progress report. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 7, p. 884-905, 1999.
- FISTER, K. R.; PANETTA, J. C. Optimal control applied to cell-cycle-specific cancer chemotherapy. **Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 60, p. 1059-1072, 2000.
- FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2, p. 247-65, 2005.

- FUKASAWA, M.; OBARA, S. Molecular weight determination of hypromellose phthalate (HPMCP) using size exclusion chromatography with a multi-angle laser light scattering detector. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 1304-6, 2003.
- GAIES, E. et al. Methotrexate Side Effects: Review Article. **Drug Metabolism & Toxicology**, v.3, n. 4, p. 1-5, 2012.
- GAO, H. et al. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanocapsules with controlled permeability. **Polymer**, v. 46, n. 4, p. 1087–1093, 2005.
- GARCIA, M. C. **MICROPARTÍCULAS DE METOTREXATO E ÁCIDO POLILÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR “SPRAY-DRYING”**. 2014. 1-64 dissertação (mestre). Fármacos e medicamentos Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- GARINOT, M. et al. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 195-204, 2007.
- GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.
- GEORGE, E. Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 57, n. 11, p. 637-640, 1998.
- GHOSH, I. et al. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1-2, p. 12-9, 2011.
- GILES, C. H.; D'SILVA, A. P.; EASTON, I. A. A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm Part II. Experimental Interpretation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 47, n. 3, p.776-778, 1974.
- GOES, A. M. et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2012.
- GOMES, C. H. R.; SILVA, P. V.; MOTA, F. F. Cancer Diagnosis communication: Analysis of the Physician Behavior. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 139-143, 2009.
- GORLICK, R. et al. Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. **Blood**, v. 89, n. 3, p. 1013-8, 1997.
- GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **Annual Reviews in Medicine**, v. 53, n. 1, p. 615-627, 2002.
- GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

- HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K.; STRØMME, M. Low-frequency dielectric spectroscopy as a tool for studying the compatibility between pharmaceutical gels and mucous tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 9, p. 1869-81, 2003.
- HAMEED, B. H.; RAHMAN, A. A. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon prepared from biomass material. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 2-3, p. 576-81, 2008.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638-49, 2008.
- HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 5, 2006.
- HARGITTAI, I.; HARGITTAI, M. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. **Structural Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 697-717, 2008.
- HAXAIRE, K. et al. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. **Biopolymers**, v. 72, n. 1, p. 10-20, 2003.
- HIGANO, C. S.; LIVINGSTON, R. B. Oral dipyridamole and methotrexate in human solid tumors: a toxicity trial. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 259-62, 1989.
- HILGENDORF, C. et al. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 1, p. 63-75, 2000.
- HOKPUTSAA, S. et al. Hydrodynamic characterisation of chemically degraded hyaluronic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 2, p.111-117, 2003.
- HOLLANDER, D. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. **Current Gastroenterology Reports**, v. 1, n. 5, p. 410-416, 1999.
- HSU, J. Y.; WAKELEE, H. A. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy. **BioDrugs**, v. 23, n. 5, p. 289-304, 2009.
- HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1117-1132, 2015.
- HYEDA, A.; DA COSTA, E. S. M. A preliminary analysis of the costs for outpatient chemotherapy in the supplementary health system. **Jornal Brasileiro de Economia e Saúde**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2015.
- IBEKWE, V. C. et al. Interplay Between Intestinal pH, Transit Time and Feed Status on the In Vivo Performance of pH Responsive Ileo-Colonic Release Systems. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1828-1835, 2008.
- ISHA, C. et al. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 57-62, 2012.

- JAIN, R. K.; MARTIN, J. D.; STYLIANOPOULOS, T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, p. 321-346, 2014.
- JAIN, R. K.; WEI, J.; GULLINO, P. M. Pharmacokinetics of methotrexate in solid tumors. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 7, n. 2, p. 181-194, 1979.
- JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 83-97, 2001.
- JANSSEN-HEIJNEN, M. L. G. et al. Prognostic impact of increasing age and co-morbidity in cancer patients: A population-based approach. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 55, n. 3, p. 231-240, 2005.
- JASS, J. R.; MORSON, B. A universal staging system for cancer of the colon and rectum revisited. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 110, n. 12, p. 1119-20, 1986.
- JEONG, J. C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(epsilon-caprolactone) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 3, p. 249-58, 2003.
- JIAO, Y.; PANG, X.; ZHAI, G. Advances in hyaluronic acid-based drug delivery systems. **Current Drug Targets**, 2015.
- JIN, H. Y.; XIA, F.; ZHAO, Y. P. Preparation of hydroxypropyl methyl cellulose phthalate nanoparticles with mixed solvent using supercritical antisolvent process and its application in co-precipitation of insulin. **Advanced Powder Technology**, v. 23, n. 2, p. 157-163, 2012.
- JOERGENSEN, L. et al. New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 162-168, 2011.
- JOHANSSON, M. E.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 352-361, 2013.
- KANE, S. V. Systematic review: adherence issues in the treatment of ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 577-585, 2006.
- KARJALAINEN, M. et al. Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1-2, p. 27-32, 2005.
- KAWAHARA, M. et al. Fourth 3D structure of the chitosan molecule: conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 7, p. 1545-1550, 2003.
- KEHLET, S. N. et al. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. **Science Reports**, v. 6, p. 305-399, 2016.

- KEIZER, H. J.; PINEDO, H. M. Cancer chemotherapy: alternative routes of drug administration. A review. **Cancer Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 147-169, 1985.
- KHAFAGY, E.-S. et al. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.
- KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M. D.; FLANAGAN, D. R. Drug transfer through mucus. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 173-193, 2001.
- KIILL, C. P. et al. Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1695-1702, 2017.
- KIM, D. Y. et al. Comparison of intrathecal chemotherapy for leptomeningeal carcinomatosis of a solid tumor: methotrexate alone versus methotrexate in combination with cytosine arabinoside and hydrocortisone. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 12, p. 608-612, 2003.
- KIM, I. H. et al. Swelling and drug release behavior of tablets coated with aqueous hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 225-233, 2003.
- KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current gastroenterology reports**, v. 12, n. 5, p. 319-330, 2010.
- KIMURA, Y. et al. CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells. **Oncotarget**, v. 4, n. 5, p. 785-791, 2013.
- KRATOCHVIL, P. **Classical Light Scattering from Polymer Solutions**. Amsterdã: Elsevier 1987.
- KULKARNI, R. V. et al. Interpenetrating rating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem-resin complex for controlled release application. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1001-1007, 2011.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.
- LAMPRECHT, A. IBD: selective nanoparticle adhesion can enhance colitis therapy. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 311-312, 2010.
- LAN, Q. et al. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, n. 1, p. 179-186, 2001.
- LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 481-7, 2009.
- LECHANTEUR, A.; ALMEIDA, A.; SARMENTO, B. Elucidation of the impact of cell culture conditions of Caco-2 cell monolayer on barrier integrity and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2017.

- LEE, J. Y.; SPICER, A. P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 581-586, 2000.
- LEHR, C. M. et al. Effects of the mucoadhesive polymer polycarbophil on the intestinal absorption of a peptide drug in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 402-407, 1992.
- LEVÊQUE, D. et al. Pharmacokinetic drug-drug interactions with methotrexate in oncology. **Expert Reviews in Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 743-750, 2011.
- LI, C.; HEIN, S.; WANG, K. Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complex for the Delivery of Protein Drugs. **ISRN Biomaterials**, p. 1-6, 2013.
- LI, S.-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.
- LI, Y. H. et al. Adsorption thermodynamic, kinetic and desorption studies of Pb²⁺ on carbon nanotubes. **Water Research**, v. 39, n. 4, p. 605-609, 2005.
- LIAO, Y. H. et al. Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. **Drug Delivery**, v. 12, n. 6, p. 327-342, 2005.
- LIMOUSIN, G. et al. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. **Applied Geochemistry**, v. 22, n. 2, p. 249-275, 2007.
- LIND, M. L. et al. Development of simulated intestinal fluids containing nutrients as transport media in the Caco-2 cell culture model: Assessment of cell viability, monolayer integrity and transport of a poorly aqueous soluble drug and a substrate of efflux mechanisms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4, p. 261-270, 2007.
- LIOU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 1-31, 2010.
- LITT, M. Comparative studies of mucus and mucin physicochemistry. **Ciba Foundation Symposium**, p.196-211, 1984.
- LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008.
- LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504-1517, 2004.
- LONGO-SORBELLO, G. S.; BERTINO, J. R. Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. **Haematologica**, v. 86, n. 2, p. 121-127, 2001.
- MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, 2009.
- MADSEN, F.; EBERTH, K.; SMART, J. D. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration. **Journal of Controlled Release**, v. 50, n. 1-3, p. 167-178, 1998.

- MAHLER, G. J.; SHULER, M. L.; GLAHN, R. P. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p. 494-502, 2009.
- MAIOR, J. F. et al. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 184-194, 2008.
- MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445-451, 2011.
- MALI, N.; WAVIKAR, P.; VAVIA, P. Serratiopeptidase loaded chitosan nanoparticles by polyelectrolyte complexation: in vitro and in vivo evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 1, p. 59-66, 2015.
- MAO, S. et al. Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 5, p. 1035-1048, 2006.
- MARTINS, S. J.; YAMAMOTO, C. A. Clinical and economic issues in adjuvant chemotherapy for HER-2 positive breast cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 6, p. 494-499, 2008.
- MEEHAN, E. Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent. **Analytica Chimica Acta**, v.557, n.1, p. 2-6, 2006.
- MEERA, G. T.; ABRAHAM, E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n.1, p. 1-14, 2006.
- MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 140-9, 2014.
- MISHRA, J. et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 86, n. 3, p. 232-250, 2013.
- MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19-20, p. 842-50, 2010.
- MIZRAHY, S. et al. Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 231-238, 2011.
- MOTA, E. S. et al. Manifestações extra-intestinais em doença de Crohn e retocolite ulcerativa: prevalência e correlação com o diagnóstico, extensão, atividade, tempo de evolução da doença. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, p. 349-363, 2007
- MUÈLLER, R. H.; MAÈDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

- MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 1997.
- NAZERI, N. et al. Effect of preparation parameters on ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 642-646, 2013.
- NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.
- O'NEILL, V. J.; TWELVES, C. J. Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 9, p. 933-937, 2002.
- OLIVEIRA, J. T. et al. Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 1, p. 343-353, 2010.
- PAN, N. C. et al. Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n. 4, p. 42- 58, 2013.
- PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p. 44-50, 2006.
- PARK, S.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. Nanoscale interfaces to biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 5, p. 616-622, 2010.
- PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. **Cancer Nanotechnology**, v. 1, n. 1-6, p. 47-62, 2010.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina**. 2012. (Mestre). Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2016. 149 (Doutorado). Drugs and Medicines, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- PEDREIRO, L. N. et al. Mucoadhesive Nanostructured Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier to Improve Zidovudine Permeability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1248-1256, 2016.
- PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751-760, 2007.
- PERCORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometers Particles in Liquids. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 2, n. 2, p. 123-131, 2000.

- PEREZ, R. O. et al. A genética do câncer colorretal - princípios para o cirurgião. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 18, n. 1, p. 5-10, 1998.
- PERTUIT, D. et al. 5-amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 3, p. 211-218, 2007.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas de liberação prolongada: Sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.
- PHILIP, A. K.; PHILIP, B. Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. **Oman Medical Journal**, v. 25, n. 2, p. 79-87, 2010.
- PICONE, C. S.; CUNHA, R. L. Chitosan-gellan electrostatic complexes: influence of preparation conditions and surfactant presence. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 695-703, 2013.
- PINHO, M. S. L. A Estória Biomolecular do Pólipo Adenomatoso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 2, p. 197-203, 2005.
- PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 44-52, 2010.
- PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.
- PLAPIED, L. et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.
- PRABAHARAN, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1313-1322, 2015.
- PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286-295, 2014.
- PREZOTTI, F. G. et al. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, 2012.
- RAHMAN, P. et al. Efficacy and tolerability of methotrexate in antimalarial resistant lupus arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 243-246, 1998.
- RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219-228, 2013.
- REDDY, K. J.; KARUNAKARAN, K. T. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain. **Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 3523-3526, 2013.
- RÊGO, A. G. S. R. et al. Câncer Colorretal em Pacientes Jovens. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 173-180, 2012.

- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2011.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987.
- RODEMBUSCH, F. S. **Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico em Polímeros do tipo Polimetacrilato, Fluorescentes por Transferência Protônica Intramolecular no Estado Eletrônico Excitado (TPIEE)**. 2001. 91 (Mestre). Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- SADEGHI, A. M. M. et al. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1, p. 299-306, 2008.
- SAGGAR, J. K. et al. Use of molecular biomarkers to quantify the spatial distribution of effects of anticancer drugs in solid tumors. **Molecular Cancer Therapy**, v. 12, n. 4, p. 542-552, 2013.
- SAMPATH, S. et al. X-ray diffraction study of nanocrystalline and amorphous structure within major and minor ampullate dragline spider silks. **Soft Matter**, v. 8, n. 25, p. 6713-6722, 2012.
- SANTOS, I. S. et al. Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 5, p. 514-523, 2013.
- SARMENTO, B. et al. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2198-2206, 2007.
- SARMENTO, B. et al. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 8, p. 2833-2841, 2007.
- SCHACHTER, H.; WILLIAMS, D. Biosynthesis of mucus glycoproteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 144, p. 3-28, 1982.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHATZ, C. et al. Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1882-1892, 2004.
- SCHATZ, C. et al. Static Light Scattering Studies on Chitosan Solutions: From Macromolecular Chains to Colloidal Dispersions. **Langmuir**, v. 19, n. 23, p. 9896-9903, 2003.
- SCHENK, M.; MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, n. 3, p. 391-409, 2008.

- SCHIMPEL, C. et al. Development of an advanced intestinal in vitro triple culture permeability model to study transport of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 808-818, 2014.
- SCUDIERO, D. A. et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 48, n. 17, p. 4827-4833, 1988.
- SHAFIQ, S. et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 227-243, 2007.
- SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2014.
- SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.
- SIMONOSKA CRCAREVSKA, M.; GLAVAS DODOV, M.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 565-578, 2008.
- SINGH, B. et al. Attuning hydroxypropyl methylcellulose phthalate to oral delivery vehicle for effective and selective delivery of protein vaccine in ileum. **Biomaterials**, v. 59, p. 144-159, 2015.
- SINHA, R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapy**, v. 5, n. 8, p. 1909-1917, 2006.
- SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advance in Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.
- SNOEYINK, V. L. et al. Organic compounds produced by the aqueous free-chlorine-activated carbon reaction. **Environmental Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 188-192, 1981.
- 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.
- SONG, D. et al. Evaluation of MRI in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 90, n. 43, p. 3049-3053, 2010.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001.
- SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030- 2075, 2014.
- SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

- STAUD, F. et al. Expression and Function of P-Glycoprotein in Normal Tissues: Effect on Pharmacokinetics. In: ZHOU, J. (Ed.). **Multi-Drug Resistance in Cancer**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p.199-222.
- STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 8, p. 699-715, 2006.
- STRUM, W. B. Colorectal Adenomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 4, p. 389-390, 2016.
- SUTHERLAND, L.; MACDONALD, J. K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. **Cochrane Database System Review**, v. 2, 2006.
- SWARTZ, M. A. et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2473-2480, 2012.
- SYNOLD, T. W. et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 5, p. 1996-2001, 1994.
- TILLY, H. et al. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4284-4289, 2003.
- TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B-chitosan-dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 142-149, 2007.
- TODARO, M. et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 342-356, 2014.
- TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 528-539, 2004.
- TORCHILIN, V. P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 1, p. 1, 2007.
- TRAPANI, A. et al. Methotrexate-loaded chitosan- and glycol chitosan-based nanoparticles: a promising strategy for the administration of the anticancer drug to brain tumors. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1302-1311, 2011.
- USP. **United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29)**. Chapter <711> 2011.
- V VARMA, M. et al. Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption. **Current Drug Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 730-742, 2010.
- VALENTE, J. J. et al. Colloidal behavior of proteins: effects of the second virial coefficient on solubility, crystallization and aggregation of proteins in aqueous solution. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 427-436, 2005.

- VAN DIEREN, J. M. et al. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate mofetil: their mechanisms of action and role in the treatment of IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 4, p. 311-327, 2006.
- VARUM, F. J. et al. An investigation into the role of mucus thickness on mucoadhesion in the gastrointestinal tract of pig. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 335-341, 2010.
- VARUM, F. O. et al. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 535-547, 2008.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.
- VILLANUEVA, A. et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. **Nanotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1151-1160, 2009.
- VLLASALIU, D. et al. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1-2, p. 183-193, 2010.
- VON ZUBEN, E. S. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para aplicação tópica de metotrexato: estudos de liberação, retenção e permeação in vitro**. 2012. 159 (mestre). Drugs and medicines, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- WAHED, M. et al. Efficacy of methotrexate in Crohn's disease and ulcerative colitis patients unresponsive or intolerant to azathioprine/mercaptopurine. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, n. 6, p. 614-620, 2009.
- WALTON, W. Feret's statistical diameter as a measure of particle size. **Nature**, v. 162, n. 4113, p. 329-330, 1948.
- WANG, A. Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual Reviews in Medicine**, v. 63, p. 185-198, 2012.
- WANG, C.; DONG, L. Exploring 'new' bioactivities of polymers at the nano-bio interface. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 10-14, 2015.
- WANG, L. et al. Preparation and Evaluation of Solid Dispersion for Nitrendipine-Carbopol and Nitrendipine-HPMCP Systems Using a Twin Screw Extruder. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1240-1245, 2005.
- WANG, X. Q. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 421-429, 2004.
- WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **Journal of Community Health**, v. 26, n. 2, p. 79-92, 2001.

- WEI, W. et al. Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression. **Biomaterials**, v. 34, n. 15, p. 3912-3923, 2013.
- WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317-327, 2010.
- WEINSTEIN, R. S. et al. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2720-2726, 1991.
- WIDEMANN, B. C.; ADAMSON, P. C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. **Oncologist**, v. 11, n. 6, p. 694-703, 2006.
- WIN, K. Y.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713-2722, 2005.
- WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, n. 1, p. 1-40, 1993.
- YANG, Y. et al. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1301-1316, 2014.
- YAO, R. et al. Phase transition behavior of HPMC-AA and preparation of HPMC-PAA nanogels. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1, 2011.
- YEH, T.-H. et al. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6164-6173, 2011.
- ZALTMAN, C. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 992-993, 2007.
- ZHANG, X. et al. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 632-638, 2012.
- ZHAO, L. H. et al. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression. **International Journal of Clinical Experimental Pathology**, v. 8, n. 1, p. 692-701, 2015.