

**Nanopartículas de mesalazina com
propriedades mucoadesivas incorporadas em
micropartículas para a liberação colônica**

Leda Maria Gorla Robusti

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA - SP

2021

**Nanopartículas de mesalazina com
propriedades mucoadesivas incorporadas em
micropartículas para a liberação colônica**

Leda Maria Gorla Robusti

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Orientadora: Profa Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA - SP

2021

R668n Robusti, Leda Maria Gorla.
Nanopartículas de mesalazina com propriedades mucoadesivas incorporadas em micropartículas para a liberação colônica / Leda Maria Gorla Robusti. – Araraquara: [S.n.], 2021.
144 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Nanossuspensões. 3. Quitosana. 4. Micropartículas poliméricas. 5. Gelificação ionotrópica. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Título.

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

CAPE: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Nanopartículas de mesalazina com propriedades mucoadesivas incorporadas em micropartículas para a liberação colônica

AUTORA: LEDA MARIA GORLA ROBUSTI

ORIENTADORA: MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA, área: Nanotecnologia Aplicada Às Ciências Farmacêuticas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. BEATRIZ STRINGHETTI FERREIRA CURY (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP

Prof. Dr. MARCO VINICIUS CHAUD (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. RUY CARLOS RUVER BECK (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Araraquara, 28 de janeiro de 2021

“DEDICATÓRIA”

Dedico este trabalho especialmente a minha mãe que sempre foi incentivadora das minhas conquistas, ao meu marido e meus filhos pelo amor, paciência e compreensão principalmente nos dias mais difíceis e por nunca me deixarem desistir. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus que estando presente em todos os momentos de minha vida, concedeu-me forças para superar barreiras consideradas por mim intransponíveis.

À minha orientadora Profa Dra Maria Palmira Daflon Gremiao, que com gentileza e presteza me recebeu no grupo e me confiou a oportunidade de realizar este trabalho. Que com sua sabedoria, me ensinou mais que conhecimentos profissionais, me dando a chance de um crescimento pessoal.

À minha amiga Fernanda Boni, por compartilhar comigo grande parte de seu conhecimento, me ensinando a evoluir na área da pesquisa, além de possuir um senso coletivo imprescindível a esse grupo.

Ao grupo “...casa da Lele” por toda conversa, carinho, amizade mútua e muito respeito pelo momento que cada uma vive. Isso me fortalece como pessoa.

Aos meus amigos Valéria, João, Mauricio, Bruno Fiodi, por toda dedicação e ajuda e cafés nesses anos de convivência.

Às técnicas Margareth e Natalia por estarem sempre dispostas a fazer o melhor por nós.

Ao professor Marlus Chorilli por todo incentivo e conhecimento passado.

A todos os colegas do laboratório pela troca de gentileza e cooperação.

Ao Jader de Oliveira, pós doc da Parasitologia pela ajuda no estudo das imagens pelo estereoscópio.

Às amigas que fiz nesta etapa de minha vida que foram muito construtivas tanto do lado profissional quanto do lado pessoal.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara

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

EPÍGRAFE

“Sucesso significa realizar seus próprios sonhos, cantar sua própria canção, dançar sua própria dança, criar do seu coração e apreciar a jornada, confiando que não importa o que aconteça, tudo ficará bem.”

Elana Lindquist

RESUMO

A mesalazina é um fármaco com solubilidade pH dependente que quando administrado por via oral, apresenta grandes desafios por ser instável frente às condições de variação de pH, conteúdo microbiológico e enzimático apresentadas pelo trato gastrointestinal. A MSL é um fármaco anti-inflamatório de primeira escolha no tratamento das doenças inflamatórias intestinais. A dose usual de mesalazina para o tratamento da recidiva e manutenção da remissão é muito elevada, uma vez que grande parte do fármaco é solubilizado e absorvido no estômago, prejudicando seu efeito local no lúmen intestinal. Neste trabalho, nanopartículas de MSL revestidas com quitosana e incorporadas em micropartículas poliméricas de goma gelana e amido resistente foram desenvolvidas para a liberação colônica e aplicação no tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Modelagem computacional foi utilizada para o delineamento do sistema nanoestruturado para prever o comportamento de precipitação da MSL em diferentes valores de pH. Foram selecionados três valores de pH para a obtenção das nanossuspensões de MSL, pH1,5; pH4,0 e pH6,0, nos quais ocorre a precipitação de partículas com cargas superficiais positivas, praticamente nula e negativas, respectivamente. As nanopartículas foram avaliadas quanto ao tamanho (145,9nm a 936,7nm), PDI (0,47 a 0,58) e potencial zeta (8,5mV a -31,6mV). As NPs obtidas foram revestidas com QTS para agregar a habilidade mucoadesiva ao sistema. Os revestimentos das NPs com diferentes proporções de QTS e metodologias foram avaliados resultando em tamanhos que variaram de 169,37nm a 442,4nm e PDI de 0,42 a 0,81. A partir desses resultados, as partículas F3, obtida em valor de pH6,0 sem revestimento e F3cQ, com revestimento de QTS, foram escolhidas e avaliadas quanto a interação com a mucina. O resultado mostrou que ambas as formulações interagem com a mucina, sendo que a F3 mostrou maior afinidade em pH ácido e a F3cQ em pH que simula do meio entérico. As F3 e F3cQ foram incorporadas em uma dispersão polimérica de GG:AR para a obtenção de micropartículas (MPs). A eficiência de encapsulação variou de 22,15 e 25,4% e as micropartículas demonstraram elevada capacidade mucoadesiva em ensaio ex vivo. O perfil de dissolução in vitro da MLS a partir das MPs, contendo NPs encapsuladas, demonstraram controle das taxas de liberação, com porcentagens muito inferiores às NPs isoladas e do fármaco livre. Esse comportamento mostra a capacidade das MPs em controlar as taxas de liberação do fármaco a partir das NPs em meio ácido e entérico.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais, nanossuspensões, quitosana, micropartículas poliméricas, gelificação ionotrópica.

ABSTRAT

Mesalazine is a drug with pH-dependent solubility that, when administered orally, presents great challenges because it is unstable in the face of pH variation, microbiological and enzymatic content presented by the gastrointestinal tract. MSL is an anti-inflammatory drug of first choice in the treatment of inflammatory bowel diseases. The usual dose of mesalazine for the treatment of relapse and maintenance of remission is very high, since a large part of the drug is solubilized and absorbed in the stomach, impairing its local effect in the intestinal lumen. In this work, chitosan coated MSL nanoparticles incorporated into polymeric gellan and resistant starch microparticles were developed for colonic release and application in the treatment of inflammatory bowel diseases. Computational modeling was used to design the nanostructured system, clarifying the precipitation behavior of MSL at different pH values. Based on these results, three pH values were selected to obtain MSL nanosuspensions (pH1.5, pH4.0 and pH6.0), in which particles with positive surface charges, practically zero and negative, respectively, precipitate. The nanoparticles were evaluated for size (145.9nm to 936.7nm), PDI (0.47 to 0.58) and zeta potential (8.5mV to -31.6mV). The NPs obtained were coated with QTS to improve the mucoadhesion of the system. The coatings of NPs with different proportions of QTS and methodologies were evaluated resulting in sizes ranging from 169.37nm to 442.4nm and PDI from 0.42 to 0.81. From these results, the F3 particles, obtained at a pH 6.0 value without coating and F3cQ, with QTS coating, were chosen and evaluated for their interaction with mucin. The result showed that both formulations interact with mucin, with F3 showing greater fineness in acidic pH and F3cQ in pH that simulates the enteric medium. F3 and F3cQ were incorporated into a polymer dispersion of GG:AR to obtain microparticles (MPs). The encapsulation efficiency ranged from 22.15 to 25.4% and the microparticles demonstrated high mucoadhesive capacity in an ex vivo assay. The in vitro dissolution profile of MLS from MPs, containing encapsulated NPs, demonstrated control of release rates, with much lower percentages than isolated NPs and the free drug. This behavior shows the ability of MPs to control drug release rates from NPs in acidic and enteric media.

Keywords: inflammatory bowel diseases, nanosuspensions, chitosan, polymeric microparticles, ionotropic gelation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspectos morfológicos do cólon sadio e nas doenças de Crohn e colite ulcerativa.
- Figura 2.** Cólon e camadas do lúmen intestinal
- Figura 3.** Sintomas extra intestinais da Doença de Crohn
- Figura 4.** Principais diferenças morfológicas do cólon sadio e na Colite Ulcerativa
- Figura 5.** Classificação da Retocolite Ulcerativa- (a) Proctite; (b) Colite ulcerativa do lado esquerdo e (c) Pancolite.
- Figura 6.** Terapia progressiva nas DIIs.
- Figura 7.** Estrutura molecular da mesalazina
- Figura 8.** Fases da bioadesão
- Figura 9** Representação estrutural (a) e 3D(b) da molécula da quitosana
- Figura 10.** Microesferas e microcápsulas
- Figura 11.** Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas de mesalazina,
- Figura 12.** Representação esquemática do método de revestimento das nanopartículas de mesalazina pela quitosana
- Figura 13.** Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas vazias
- Figura 14.** Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 1
- Figura 15.** Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 2
- Figura 16.** Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 3
- Figura 17.** Dispositivo de Enslin adaptado
- Figura 18.** Dispositivo acrílico para teste de erosão
- Figura 19.** Representação esquemática do teste de mucoadesão por escoamento de líquido
- Figura 20.** Espectro de absorção máxima a Mesalazina em água

- Figura 21.** Especificidade / seletividade do método analítico. Espectro de absorção da Mesalazina; HCl 0,5M; NaOH 1M e mistura de 1:1 (HCl;NaOH)
- Figura 22.** Curva analítica da absorbância em função da concentração da mesalazina em 300 nm
- Figura 23.** Representação da geometria da mesalazina com os respectivos grupos funcionais e valores de pKa
- Figura 24.** Porcentagem das diferentes espécies ionizadas da mesalazina em função do pH
- Figura 25.** Configuração geométrica das espécies ionizáveis predominantes da Mesalazina: (I)Espécie Catiônica; (II) Espécie zwitteriônica; (III) Espécie Aniônica
- Figura 26.** Energia de interação das moléculas de Mesalazina em diferentes estados iônicos: catiônico; zwitteriônico e aniônico
- Figura 27.** Efeito do pH no tamanho (a), PDI (b) e potencial zeta (c) das partículas de mesalazina
- Figura 28.** Aspecto das formulações de nanopartículas de mesalazina após estabilidade de 03 meses
- Figura 29.** Análise espectrofotométrica da formulação F₃ após 90 dias de estabilidade
- Figura 30.** Curva de DSC do fármaco MSL e das formulações F₁, F₂ e F₃
- Figura 31.** Curva de Termogravimetria (DTG) e perda de massa versus temperature da Mesalazina, F₁, F₂ e F₃
- Figura 32.** Esquema representativo do revestimento das nanopartículas F₁, F₂ e F₃ com quitosana
- Figura 33.** Avaliação das características de tamanho e PDI (A) e potencial zeta (B) da nanopartículas de mesalazina F₂ revestidas com diferentes proporções de quitosana.
- Figura 34.** Avaliação das características de tamanho e PDI (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas de mesalazina F₃ revestidas com diferentes proporções de quitosana.

- Figura 35.** Aparência da formulação F₂ no dia do preparo (A) e após 30 dias(B), com diferentes proporções de quitosana
- Figura 36.** Aparência da formulação F₃ no dia do preparo (A) e após 30 dias(B), com diferentes proporções de quitosana
- Figura 37.** Avaliação das características de tamanho e PDI e potencial zeta das nanopartículas de mesalazina F₂; F_{2cQ}; F₃ e F_{3cQ} revestidas com diferentes proporções de quitosana
- Figura 38.** Aparência da formulação F₂; F_{2cQ}; F₃ e F_{3cQ} no dia do preparo (A) e após 30 dias(B)
- Figura 39.** Estudo de correlação entre o tamanho (NTA) e o potencial zeta (DLS) das nanopartículas F_{3cQ} e F_{3_0,6_Q}, respectivamente
- Figura 40.** Fotomicrografias da MP_{vazia} e das MP_{F2}, MP_{F2cQ}, MP_{F3} e MP_{F3cQ} obtidas pelos métodos 1 e 2.
- Figura 41** Fotomicrografias da MP_{vazia}, MP_{F3} e MP_{F3cQ} inteiras e com cortes transversal (T) nos aumentos de 50, 100 e 500 vezes
- Figura 42** Perfil da absorção de líquido das MP_{F3} e MP_{F3cQ} nos valores de pH 1,2 e 6,8
- Figura 43** Porcentagem (%) de erosão das MP nos diferentes meios de dissolução
- Figura 44** Curvas de calibração da MSL nos comprimentos de onda 300nm (A) e 330 nm (B) e equação da reta para utilizada para o cálculo de concentração
- Figura 45** Perfil de liberação in vitro da MSL livre e associada à NPs com e sem quitosana e incorporadas em MP de GG:AR em HCL pH=1,2
- Figura 46** Perfil de liberação in vitro da MSL livre e associada à NPs com e sem quitosana e incorporadas em MP de GG:AR em TF pH=6,8

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Principais diferenças entre Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa
- Tabela 2 Principais classes medicamentosas utilizadas no tratamento das DIIs.
- Tabela 3 Produtos a base de MSL, comercialmente disponíveis.
- Tabela 4 Formulação da nanossuspensão de mesalazina obtidas em diferentes valores de pH. (F1=pH 1,5; F2=pH 4,0; F3 =pH 6,0).
- Tabela 5 Resultados obtidos pelo teste de precisão intra-corrida(repetibilidade)
- Tabela 6 Resultado obtido pelo teste de Precisão intermediária (inter-corrida)
- Tabela 7 Determinação dos valores de exatidão.
- Tabela 8 Determinação da robustez do método analítico desenvolvido
- Tabela 9 Energia de interação das moléculas de Mesalazina em diferentes estados iônicos: catiônico; zwitteriônico e aniônico
- Tabela 10 Volume e área superficial dos complexos de Mesalazina formados nos diferentes estados iônicos, em relação a quantidade de moléculas adicionadas
- Tabela 11 Tamanho médio, PDI e potencial zeta das nanopartículas de Mesalazina obtidas nos valores de pH de 1,5, 4,0 e 6,0.
- Tabela 12 Porcentagem de MSL precipitada em diferentes valores de pH.
- Tabela 13 Parâmetros do DSC da Mesalazina, F1, F2 e F3
- Tabela 14 Tamanho e PDI das nanopartículas F2, F2cQ, F3 e F3cQ
- Tabela 15 Estudo comparativo da avaliação em termos de tamanho e PDI (DLS) e tamanho, e concentração (NTA) das nanopartículas de mesalazina revestidas e não revestidas com quitosana
- Tabela 16 Valores de pontecial zeta (mV) das nanopartículas de mesalazina com e sem revestimento de quitosana, antes e após interação com mucina, nos meios HCl 0,1N (pH=1,2) e Tampão fosfato (pH=6,8)

- Tabela 17 Comparação de tamanho e eficiência de incorporação das MPs obtidas pelos métodos 1, 2 e 3.
- Tabela 18 Resultado da mucoadesão ex-vivo das micropartículas
- Tabela 19 Valores de solubilidade da MSL em diferentes meios
- Tabela 20 Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco em pH 1,2 e pH 6,8

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Determinação da porcentagem de MSL incorporada (EI %)
Equação 2	Capacidade de absorção de líquido por massa de MPs (AL%)
Equação 3	Porcentagem de erosão das micropartículas (Erosão%)
Equação 4	Equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2)
Equação 5	Cálculo da exatidão (%)

LISTA DE ABREVIATURAS

MSL – Mesalazina
TGI – Trato gastrointestinal
DII – doenças inflamatórias intestinais
NP – Nanopartícula
QTS – Quitosana
MP – Micropartícula
GG – Goma gelana
AR – Amido retrogradado
pH – Potencial hidrogeniônico
PDI – Índice de polidispersão
PZ – Potencial zeta
DC – Doença de Crohn
RU – Retocolite ulcerativa
TNF-alfa – Fator de necrose tumoral – alfa
INF- γ – Interferon-gama
IL – interleucina
TH-1- (T-helper) Células auxiliaadoras tipo 1
TH-2-(T-helper) Células auxiliaadoras tipo 2
AINES – Antiinflamatório não esteroide
5 -ASA – Acido 5 amino salicílico
CCR – Câncer colorretal
pKa – Constante de ionização
SCB – Sistema de classificação biofarmacêutica
PM – Peso molecular
BPM – Baixo peso molecular
MPM – Médio peso molecular
APM – Alto peso molecular
GI – Geleificação ionotrópica
PEC – Complexo polieletrólítico
DFT – Teoria do funcional da densidade
DSC – Calorimetria exploratória diferencial
TGA – Análise termogravimétrica

NTA – Análise de rastreamento de nanopartícula

TF – Tampão fosfato

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Doenças Inflamatória Intestinais	23
2.1.1. Considerações Gerais	23
2.1.2. Alterações Fisiológicas Intestinais nas DIIs.....	25
2.1.3. Doença de Crohn (DC).....	28
2.1.4. Retocolite ulcerativa (RU).....	31
2.1.5. Tratamento	34
2.2 Mesalazina.....	38
2.3 Sistemas de liberação de fármacos	41
2.3.1 Nanotecnologia.....	43
2.4 Mucoadesão	46
2.4.1 Quitosana	48
2.5 Micropartículas.....	50
2.5.1. Goma Gelana.....	52
2.5.2 Amido Retrogradado	53
2.5.3. Obtenção das micropartículas por geleificação ionotrópica	56
2.6 Desenvolvimento Racional de Sistemas de Liberação de Fármacos	57
2.6.1 Modelagem computacional	58
3.OBJETIVOS	59
4.MATERIAL E METODOS	60
4.1 Material	60
4.1.1. Equipamentos.....	60
4.2 Métodos.....	61
4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de mesalazina utilizando espectrofotometria UV-VIS.	61
4.2.1.1	61

4.2.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da Mesalazina na região do ultravioleta	61
4.2.1.3 Especificidade e seletividade	62
4.2.1.4 Linearidade	62
4.2.1.5 Precisão e repetibilidade	62
4.2.1.6 Exatidão	63
4.2.2 Estudo Computacional	65
4.2.3 Avaliação experimental do efeito do pH no comportamento de precipitação da mesalazina.....	66
4.2.5 Caracterização físico-química das nanopartículas F ₁ , F ₂ e F ₃	68
4.2.6 Revestimento das nanopartículas de mesalazina com quitosana	70
4.2.7 Micropartículas	72
4.2.8 Avaliação das micropartículas contendo nanopartículas de mesalazina	76
4.2.9 Estudo de Dissolução da MSL	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Mesalazina utilizando espectrofotometria UV-VIS.	83
5.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da Mesalazina na região do ultravioleta.....	83
5.1.2 Seletividade e especificidade	84
5.1.3 Linearidade e intervalo	85
5.1.4 Precisão	86
5.1.5 Exatidão	87
5.1.6 Limite de detecção e de quantificação	88
5.1.7 Robustez	89
5.2 Abordagem computacional no estudo de pré-formulação	90
5.3 Abordagem experimental do efeito do pH no comportamento de precipitação da mesalazina.....	95

5.4	Desenvolvimento de nanossuspensão de Mesalazina por button up em diferentes valores de pH	97
5.4.1	Caracterização físico-química das nanossuspensões.....	98
5.4.2	Revestimento das nanopartículas de mesalazina com quitosana	104
5.4.3	Estudo da interação das NP F ₃ sQ e F ₃ cQ com a mucina.....	113
5.5	Micropartículas	115
5.5.1	Obtenção das micropartículas	115
5.5.2	Caracterização das micropartículas	115
5.6	Estudo de dissolução da MSL	121
5.6.1	Estudo da solubilidade da MSL	121
5.6.2	Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da MSL	123
6	CONCLUSÃO.....	128
	REFERENCIAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é caracterizada biologicamente por uma resposta imunomediada com a participação de células de defesa que buscam eliminar o agente agressor. Nas inflamações crônicas os fatores que desencadeiam a reação de inflamação podem durar por tempo indeterminado, repercutindo na manutenção anatomofisiológica do local atingido (MISZPUTEN, 2009).

Doenças inflamatórias intestinais (DII) referem-se a condições crônicas de inflamação do trato gastrointestinal (TGI), sendo representadas principalmente pela Doença de Crohn (DC) e pela Retocolite Ulcerativa (RU). Com etiologia desconhecida e evolução rápida, esses processos são evidenciados por períodos de recidiva e remissão, caracterizadas por dor abdominal, febre, sangramento retal, diarreia, graves perdas de peso, além de serem fator de risco para o câncer colorretal. (MISZPUTEN, 2009; XIAO; MERLIN, 2012; ROBERT; CAMBUI, 2015; SHARMA; SINHA, 2018a). Estas doenças ocorrem por todo o mundo e representam um sério problema de saúde pública (APARECIDA et al., 2017).

A incidência e prevalência das DIIs são altas em regiões com um grau de desenvolvimento socioeconômico maior, como Europa e América do Norte, porém os índices vêm aumentando em todos os continentes. Não se sabe ao certo a causa deste aumento, mas os fatores socioeconômico, ambiental, genético e alimentar parecem influenciar significativamente (MULTIPROP, 2019).

No Brasil a incidência e prevalência das DII ainda é baixa, quando comparado com os países desenvolvidos, fato este que pode estar relacionado a dificuldade de acesso aos prontuários dentro e fora do sistema público de saúde, o que dificulta a notificação da doença. Nos últimos 20 anos houve uma incidência do registro de DC, superior à de RU (VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009; STABILE et al., 2012; APARECIDA et al., 2017; GASPARINI, 2018; NÓBREGA et al., 2018).

O desconhecimento da patogenia da DII contribui para opções terapêuticas não eficientes (MISZPUTEN, 2009). A terapia medicamentosa convencional envolve o uso do ácido 5 - aminossalicílico (mesalazina), corticosteroides, antibióticos e imunossupressores, porém essa terapia está sempre associada à efeitos adversos que vão desde distúrbios gastrintestinais, mal-estar, cefaleia, reações cutâneas, leucopenia, má absorção de ácido fólico até disfunção renal, neurotoxicidade e

infecções oportunistas (FRÓES, 2012; COCO et al., 2013; ROBERT; CAMBUI, 2015). O tratamento convencional é capaz de resolver episódios agudos, mas não evita recidivas (ROBERT; CAMBUI, 2015).

A mesalazina (MSL), um fármaco anti-inflamatório de ação local que reduz a inflamação da mucosa do cólon, é o fármaco de primeira linha recomendado para pacientes tanto com RU quanto com DC. Disponível em formulações para uso oral ou retal, a MSL é geralmente bem tolerada, melhora os sintomas, e promove a indução e manutenção da remissão da RU. Para que a MSL seja eficaz, ela deve ser capaz de atingir diretamente a mucosa do íleo terminal e do cólon, onde regula negativamente as vias da cicloxigenase e lipoxigenase para impedir a formação de prostaglandinas e leucotrienos e aumentar a expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (ABINUSAWA; TENJARLA, 2015).

A via oral é considerada a via de administração de fármacos mais conveniente por apresentar vantagens como autoadministração, variabilidade de formas farmacêuticas, ausência de desconforto, segurança, não invasiva e de fácil acesso, o que auxilia a adesão do paciente ao tratamento. Porém, nesta via de administração, são encontrados grandes desafios anatomofisiológicos para o desenvolvimento de sistemas de liberação, como a grande variação do pH ao longo do TGI (1,5-7), além da presença de enzimas, sais biliares e muco. O sistema de liberação encontra ainda a microbiota local que pode desestabilizar as formulações e reduzir a eficácia do fármaco (FREIRE et al., 2006; XIAO; MERLIN, 2012; COCO et al., 2013).

Há um crescente aumento no interesse pelo cólon como sítio de liberação e/ou absorção de fármacos por apresentar peculiaridades como tempo de trânsito mais prolongado, extensa área superficial, reduzida atividade proteolítica e pH próximo da neutralidade. A liberação de fármaco no cólon visa melhorar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais, fornecendo altas concentrações do fármaco no local de ação/absorção (FERRARI et al., 2013).

Os sistemas nanotecnológicos podem ser projetados para aumentar a concentração do fármaco no local de ação. Estes sistemas podem promover um direcionamento do fármaco para este local, melhorando a concentração nos tecidos doentes e reduzindo efeitos adversos sistêmicos.

Diversos sistemas nanoestruturados podem ser desenvolvidos utilizando metodologias variadas. Dentre eles, as nanossuspensões são sistemas interessantes por serem compostos de fármaco puro com potencial para a vectorização (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009; DU et al., 2015).

Nanossuspensões podem ser preparadas pelo processo *top down* ou *bottom up*, sendo que neste último caso, também conhecido por precipitação química, as partículas são formadas a partir do estado molecular, na qual o fármaco é dissolvido em um solvente e então precipitado na adição de um anti-solvente na presença de um estabilizador. No caso de fármacos que possuem solubilidade pH dependente, essa precipitação pode ocorrer por uma reação ácido-base. Neste caso, o fármaco é dissolvido em uma solução ácida (ou básica) e em seguida ocorre a precipitação pela adição de uma solução alcalina (ou ácida) (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009; SANTOS, 2015).

Embora o tamanho da partícula seja um fator importante no direcionamento do fármaco ao cólon, estratégias adicionais para melhorar a bio e mucoadesão destes sistemas na área inflamada e alcançar o tempo máximo de retenção nos tecidos têm sido exploradas, evitando a liberação prematura do fármaco nas regiões superiores do trato gastrointestinal (HUA et al., 2015a).

A mucoadesão depende das propriedades dos polímeros como, presença de grupos funcionais e comprimento das cadeias poliméricas, que podem atuar na probabilidade e no grau de interação polímero/muco (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

A quitosana, possui vantagens para obtenção de sistemas de liberação de fármacos, por possuir uma cadeia poliamina linear contendo uma série de grupos amina livres disponíveis para reticulação e interação com a mucina presente no muco. Apesar das vantagens do uso da quitosana em sistemas de liberação de fármaco, uma das principais limitações é sua elevada solubilidade em meio ácido, que pode resultar na liberação prematura do fármaco, no meio gástrico (BONI, 2017)

Assim, o grande desafio de trabalhar com a MSL, um fármaco com solubilidade pH dependente, revestida com quitosana, também muito solúvel em pH ácido, foi a incorporação das nanopartículas revestidas em um sistema que pudesse proteger e direcionar o fármaco ao cólon.

Com isso os sistemas microparticulados ganham atenção pela capacidade de aprisionar o fármaco em uma matriz polimérica, conferindo essa proteção e vectorização do sistema (MENEGUIN, 2016).

O desenvolvimento de micropartículas de polissacarídeos por gelificação ionotrópica tem sido destaque de várias pesquisas, por apresentar diferentes perfis de liberação quando há variação na concentração do polímero e no grau de reticulação (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; CARDOSO, VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA; CURY et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2021)

Os hidrogéis de goma gelana (GG) possuem habilidade de formar micropartículas mucoadesivas por meio da reticulação iônica, com isso a gelana tem sido muito empregada na obtenção de sistemas de liberação controlada de muitos fármacos (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; PREZOTTI et al., 2020)

O amido também é um polissacarídeo e algumas pesquisas avaliam a relação existente entre a estrutura molecular do amido, comprimento da cadeia de amilopectina, grau de cristalinidade do grânulo, com eventos associados com a gelatinização e com a retrogradação. Essas modificações físicas e químicas podem melhorar a estabilidade, bioadesão e textura, tornando o material mais resistente à degradação enzimática (DENARDIN; SILVA, 2009; CARDOSO, 2019). O principal interesse em relação ao amido retrogradado é o seu papel fisiológico. Por não ser digerido no intestino delgado, este tipo de amido se torna disponível como substrato para fermentação pelas bactérias anaeróbicas do cólon (LOBO; DE LEMOS SILVA, 2003; DENARDIN; SILVA, 2009)

A associação da GG com amido resistente (AR) tem sido explorada pelo nosso grupo de pesquisa e os resultados apontam como uma efetiva estratégia para modulação das características físico-químicas das micropartículas e um promissor sistema de liberação cólon específico de fármacos (OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020a)

A tecnologia farmacêutica, teve muitos avanços nos últimos anos e estes foram seguidos pelos avanços nas técnicas de modelagem molecular. Métodos teóricos e analíticos, podem permitir triagem primária de variáveis, a fim de prever condições adequadas para novas experiências. Já as técnicas de modelagem computacional podem fornecer informações detalhadas sobre interações moleculares e outras propriedades físico-químicas de fármacos, o que vem

corroborar os resultados práticos obtidos (DE SOUZA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2017).

Neste trabalho utilizamos a modelagem computacional como um estudo teórico de pré-formulação para o entendimento das características e propriedades físico-químicas da MSL, a fim de garantir o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado revestido com quitosana, para a incorporação em micropartículas poliméricas objetivando a liberação cólon específica.

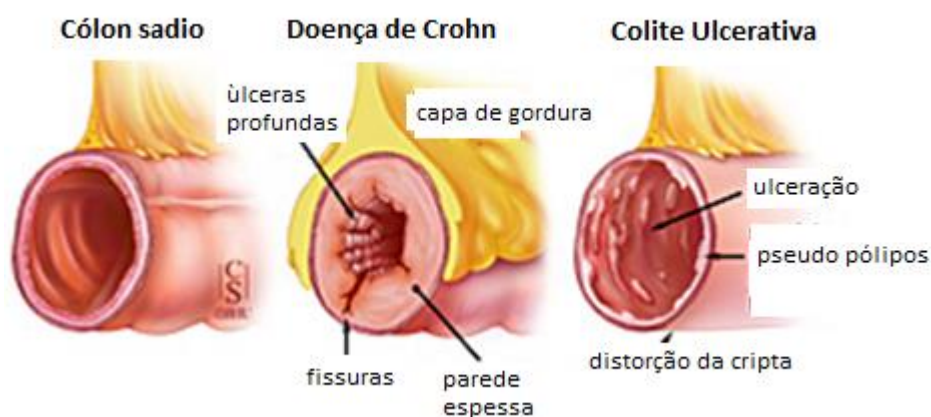
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças Inflamatória Intestinais

2.1.1. Considerações Gerais

O trato gastrointestinal (TGI) é constituído anatomicamente por cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus. O TGI pode ser acometido por inflamações que alteram sua estrutura e seu funcionamento. As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) referem-se a condições crônicas que causam inflamação da mucosa do trato gastrointestinal (TGI), sendo representado principalmente pela Doença de Crohn (DC) e pela Retocolite Ulcerativa (RU) (Figura1). Estas são doenças crônicas recorrentes caracterizadas por dor abdominal, febre, sangramento retal, diarreia e graves perdas de peso, além de serem fator de risco para o câncer colorretal. São muito semelhantes entre si por gerarem uma região de inflamação muito extensa e por isso são, muitas vezes, de difícil diferenciação (BELÉM; ODA, 2015).

Figura 1: Aspectos morfológicos do colón sadio e nas doenças de Crohn e colite ulcerativa



Fonte: adaptado de https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/crohns-disease#vm_A_1291bc98. Acessado em 10/12/2020

Ambas fazem parte das doenças imunomediadas, ou seja, resultam de uma resposta imunológica inapropriada que podem ocorrer em indivíduos geneticamente suscetíveis. São doenças que constituem sério problema de saúde pública em muitos países do mundo, pois afetam pessoas jovens, levam a recorrências frequentes, com forma clínica de alta gravidade, além de serem altamente debilitante e sem cura (ROBERT; CAMBUI, 2015; APARECIDA et al., 2017; SHARMA; SINHA, 2018a; MULTIPROP, 2019).

A incidência e prevalência das DIs são altas em regiões com um grau de desenvolvimento socioeconômico maior, como Europa e América do Norte, porém os índices vêm aumentando em todos os continentes. Não se sabe ao certo a causa deste aumento, mas os fatores socio-econômicos, ambientais, genéticos e alimentares parecem influenciar bastante (MULTIPROP, 2019). As DIs atingem tanto homens como mulheres em proporções semelhantes, sendo a DC presente em maior prevalência nas mulheres. A faixa etária pode variar entre 15 e 30 anos na DC, com um segundo pico a partir dos 60 a 80 anos; já na RU, a maior taxa ocorre entre os 30 e 40 anos podendo permanecer elevada até os 70 (ROBERT; CAMBUI, 2015; GASPARINI, 2018).

Estudos epidemiológicos sobre as DIs podem ser dificultados pelo fato de o início da doença ser gradual e pela falta de critérios universais aceitos para o diagnóstico dessas doenças, tornando esse diagnóstico difícil (VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009).

No Brasil o índice de incidência e prevalência das DI ainda é baixo, quando comparado com os países desenvolvidos, fato este que pode estar relacionado a dificuldade de acesso aos dados dentro e fora do sistema público de saúde e/ou a subnotificações. Nos últimos 20 anos a incidência do registro de DC, superou a do

RU. Nos países desenvolvidos, onde a prevalência das DII é maior, a taxa de prevalência de RU é superior à de DC (VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009; STABILE et al., 2012; APARECIDA et al., 2017; GASPARINI, 2018; NÓBREGA et al., 2018).

As DIIs são doenças idiopáticas, crônicas, que podem ser mantidas sob controle, porém existem fatores genéticos, alterações da resposta do sistema imune e fatores ambientais envolvidos na manifestação dessas doenças. A apresentação clínica pode variar durante a fase ativa da doença, com sintomas que variam de diarreia crônica, fezes com sangue, perda de peso, espasmos abdominais, fadiga, perda de apetite e febre, até complicações sistêmicas como anemia e fibrose, afetando social e psicologicamente a vida dessas pessoas. De acordo com os sintomas apresentados, pode-se classificar os episódios, durante a fase ativa da doença, em **suaves**, **moderados** ou **severos** (MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015a; ROBERT; CAMBUI, 2015).

As DIIs podem estar associadas ao aumento do risco de câncer colorretal (CCR), devido a proliferação crônica necessária para reparar o dano à monocamada epitelial, causado pela inflamação constante (ROMANO et al., 2016).

2.1.2. Alterações Fisiológicas Intestinais nas DIIs

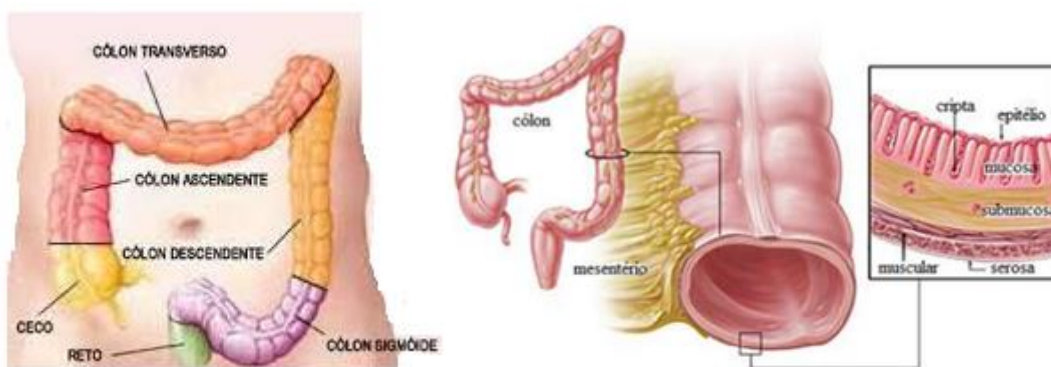
As evidências sugerem que a atividade inflamatória crônica intestinal parece, paradoxalmente, ser desencadeada a partir de bactérias pertencentes à flora comensal normal, as quais assumem, em condições ainda desconhecidas, um papel patológico capaz de ativar o sistema imunológico local (PINHO, 2008).

A ocorrência das doenças inflamatórias crônicas representa a perda do equilíbrio imunológico, constatando-se uma elevação local dos níveis de diversas

citocinas, promovendo uma inflamação exacerbada da mucosa, resultado de uma produção excessiva e descontrolada de mediadores pró-inflamatórios (citocinas), gerando radicais livres com produção aumentada de óxido (SILVA; MOURA; HARTMANN, 2015; COSTA, 2017).

As DII são caracterizadas por períodos de recidivas alternados com períodos de remissão e tanto a RU, quanto a DC podem ser diferenciadas pelo tipo de inflamação e área do intestino afetada. A parede do intestino delgado organiza-se em camadas, sendo que a partir do lúmen intestinal encontram-se as camadas: **mucosa, submucosa, muscular externa e serosa**, conforme mostrado na Figura 2 (ROBERT; CAMBUI, 2015).

Figura 2: Cólon e camadas do lúmen intestinal



Fonte: adaptado de Site Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology.

<https://www.hopkinsmedicine.org/> Acessado em 10/12/2020

A inflamação da mucosa pode originar, alterações na motilidade intestinal e, consequentemente, no tempo de trânsito intestinal, tornando-o mais lento na porção orocecal e mais rápido na porção colônica, conduzindo a diarreias severas e uma modificação significativa do volume intestinal. Esta inflamação crônica também pode conduzir a desequilíbrios da microbiota, onde há uma redução de populações de bactérias benéficas na manutenção da homeostase intestinal, como os *Lactobacillus*

e *Bifidobacterium* e um aumento de espécies patogênicas, tal qual, a *Escherichia coli*. Ocorrem também alterações do pH da região do cólon, uma vez que este é influenciado por vários fatores como: processos de fermentação bacteriana; metabolismo dos ácidos biliares e dos ácidos graxos; secreção de bicarbonato; volume intestinal e trânsito intestinal (SHARKEY et al., 2017).

A inflamação da mucosa nas DIIs causa alterações fisiopatológicas, como rompimento da barreira intestinal, devido a presença de alterações na superfície da mucosa; distorções de cripta e úlceras, aumento da produção de muco, infiltração de células imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas). Durante a recidiva severa da doença, a mucosa pode apresentar alteração da motilidade gastrointestinal e diarreia, que por sua vez afeta o volume intestinal e o pH local.

O pH do intestino é influenciado por vários fatores como: processos de fermentação bacteriana; metabolismo dos ácidos biliares e dos ácidos graxos; secreção de bicarbonato; volume intestinal e trânsito intestinal. Enquanto o pH do cólon num indivíduo saudável se encontra entre os 6,8 e os 7,2, em um indivíduo com episódio agudo de RU, o pH pode decrescer para valores entre 2,3 e 5,5. Já na DC, o pH do cólon dos doentes é aproximadamente 5,3. Além disso, fatores interpessoais também podem influenciar a liberação dos fármacos que dependem de um pH específico para liberarem no cólon (HUA et al., 2015a; COSTA, 2017).

Portanto, resposta inflamatória na mucosa altera significativamente a fisiologia do trato gastrointestinal (HUA et al., 2015b).

2.1.3. Doença de Crohn (DC)

A doença de Crohn é uma doença granulomatosa que pode envolver qualquer parte do trato gastrointestinal, ou seja, da orofaringe até a região perianal, porém o íleo terminal e o cólon são as áreas mais atingidas. A inflamação ocorre de forma difusa, na qual segmentos inflamados são intercalados por segmentos sadios. O processo inflamatório é, na maioria das vezes, trans mural, estendendo-se da camada mucosa, passando pela submucosa, muscular e frequentemente estendendo-se através da serosa, resultando em intervalos entre as inflamações e podendo ocorrer a formação de fístula. A localização mais frequente da inflamação é na região ileocecal e no cólon (MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015b; ROBERT; CAMBUI, 2015)

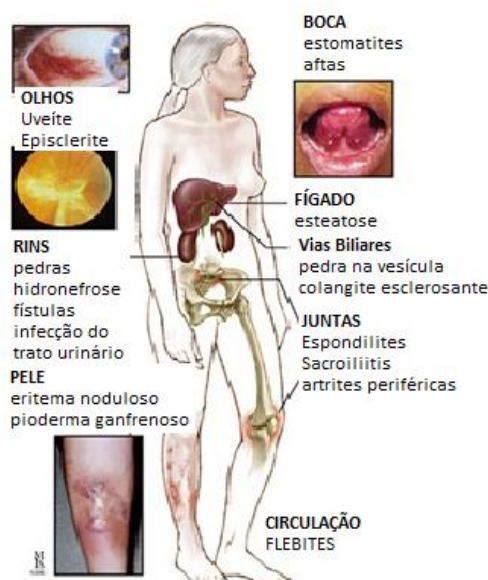
No início da DC, o intestino é fortemente marcado por uma hipertrofia da mucosa e submucosa com perda do padrão das pregas transversas normais e surgimento de pequenas áreas de ulceração hemorrágica que, com o tempo, transformam-se em fissuras. Na fase crônica da doença, a mucosa intestinal apresenta uma combinação de edema da submucosa e úlceras fissuradas interconectadas (ROBERT; CAMBUI, 2015; SUBRAMANIAN; EKBOM; RHODES, 2017)

Segundo BELÉM; ODA, 2015, existem três níveis de DC: 1- de leve a moderada, onde o paciente tolera a alimentação enteral sem problemas de desidratação, toxicidade, desconforto abdominal, massa dolorosa, obstrução ou perda de peso maior que 10% da massa corporal; 2- Moderada a grave: paciente não responde ao tratamento ou apresenta sintomas mais evidentes de febre, perda de peso, dor abdominal, náusea ou vômito intermitente ou anemia acentuada e 3-

Severa para fulminante: paciente com sintomas persistentes apesar do uso de corticosteroides e/ou terapia biológica, o paciente apresenta febre, vômitos persistentes, evidências de obstrução do intestino, sinais de irritação peritoneal, caquexia ou evidências de abscessos.

Com isso a apresentação clínica pode variar dependendo do estágio da doença e da localização afetada, mas independente de tais características, a qualidade de vida da pessoa é afetada drasticamente com sintomas extra intestinais (Figura 3) (BELÉM; ODA, 2015; ROBERT; CAMBUI, 2015; NÓBREGA et al., 2018).

Figura 3: Sintomas extra intestinais da Doença de Crohn



Fonte: Adaptado de https://www.hopkinsmedicine.org/-/media/images/health/1_conditions/stomach-and-gut/extraintestinal-manifestations-of-crohns-disease.ashx?h=360&la=en&mh=360&mw=520&w=246&hash=D10137AB4D477682CD43D035105C337A6F791DF8 Acessado em 10/12/2020

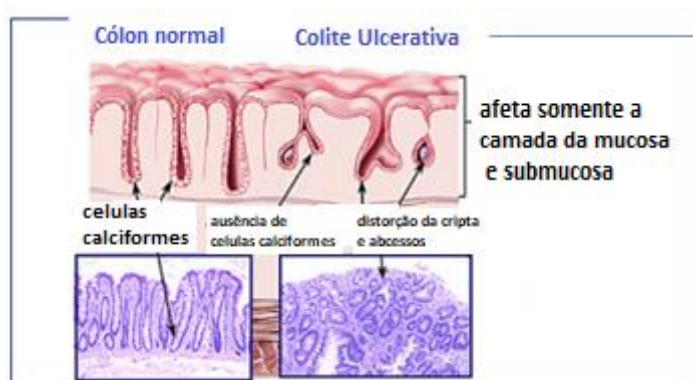
Na DC essas disfunções resultam na alteração da resposta do sistema imune intestinal, desencadeando liberação excessiva das citocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interferon-gama (IFN-γ), interleucinas (IL-12, IL-13 e IL-17),

mediada por células auxiliaadoras do tipo1 (TH1). As interleucinas (IL-4 e IL-5) envolvidas nas RU são mediadas pelas células auxiliaadoras do tipo 2 (TH2) (PINHO, 2008; ROBERT; CAMBUI, 2015).

2.1.4. Retocolite ulcerativa (RU)

Na RU, a inflamação é idiopática, difusa e inespecífica, confinada à mucosa e submucosa da parede do trato gastrointestinal (TGI), restrita ao cólon e reto (Figura 4), com prevalência de 40 a 50% limitada ao reto sigmoide sendo a transição entre tecido acometido e tecido normal nítida e bem demarcada (Figura 4) (MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015b; ROBERT; CAMBUI, 2015; NÓBREGA et al., 2018).

Figura 4: Principais diferenças morfológicas do cólon sadio e na Colite Ulcerativa



Fonte: adaptado de:

https://www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf. Acessado em 10/12/2020.

A classificação da RU se dá de acordo com a extensão anatômica da inflamação que é delimitada por avaliação colonoscópica. Existem três tipos de RU, como mostra a Figura 5 : 1- Colite Ulcerativa Distal: pode ser do tipo proctite, caracterizada pela inflamação da mucosa do reto na extensão de 15cm a partir do esfíncter anal; ou do tipo proctosigmoidite, caracterizada pela inflamação da mucosa com extensão de 25-30 cm do esfíncter anal; 2- Colite Ulcerativa do lado esquerdo: inflamação da mucosa até flexura esplênica; 3- Pancolite: Inflamação da mucosa até o cólon transverso proximal, pode afetar a totalidade do cólon (BELÉM; ODA, 2015).

Figura 5: Classificação da Retocolite Ulcerativa- (a) Proctite; (b) Colite ulcerativa do lado esquerdo e (c) Pancolite.



Fonte:

adaptado

de:

https://www.hopkinsmedicine.org/gastroenterology_hepatology/pdfs/small_large_intestine/ulcerative_colitis.pdf. Acessado em 10/12/2020.

O estágio agudo da doença provoca uma extensa ulceração confluyente da mucosa colônica. Ocasiona edema, hemorragia e é marcado por abscessos nas criptas com grau variável de ulceração e a inflamação pode atingir a camada muscular do colo que expande progressivamente até a dilatação mega cólon tóxico agudo (BELÉM; ODA, 2015).

Estudos sugerem que os anticorpos IgG1 contra uma proteína estrutural de colonócitos foram produzidos seletivamente em pacientes com RU, mas não nos com CD, e essas imunoglobulinas podem estar subjacentes a patogênese da doença. O perfil imunológico da RU, ao contrário do que é observado na DC, é um tipo atípico de resposta Th2, já que as células T CD1d restritas a NK produzem grandes quantidades de IL-13 e as células da mucosa intestinal produzem IL-5 (BELÉM; ODA, 2015).

Os sintomas dependem da extensão e gravidade da doença e incluem diarreia com sangue, sangramento retal, incontinência fecal, tenesmo e dor abdominal. Sintomas sistêmicos de mal-estar, anorexia, febre ou mesmo náuseas e

vômitos podem estar presentes principalmente durante a fase aguda (NÓBREGA et al., 2018).

As principais diferenças entre as doenças inflamatórias intestinais citadas estão relatadas na tabela 1.

Tabela 1: Principais diferenças entre Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.

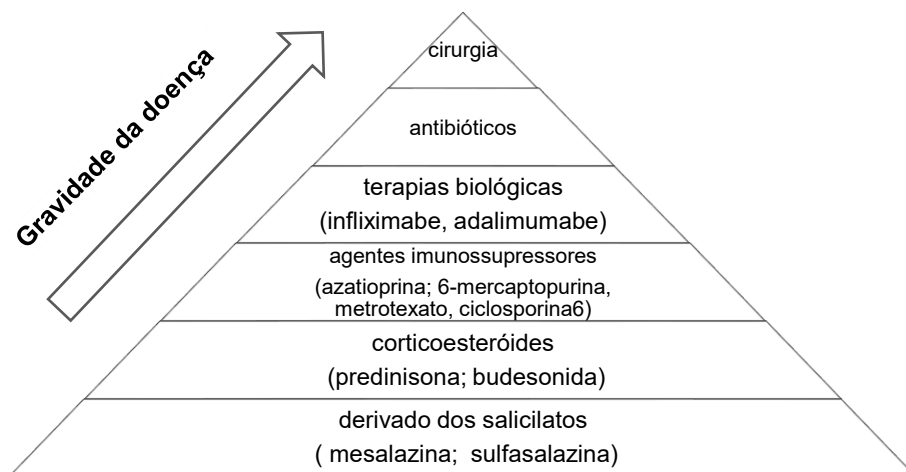
	Retocolite Ulcerativa	Doença de Crohn
diagnóstico clínico	Diarreia com urgência	Diarreia acompanhada de dor e desnutrição
endoscopia /radiologia	Inflamação colônica difusa e superficial	Lesões assimétricas
	Envolvimento do reto	Envolvimento principalmente do íleo e cólon direito
	Erosões rasas e úlceras	Úlceras longitudinais e fissuras profundas
	Sangramento espontâneo	Estenoses e fístulas
anatomopatológico	Inflamação difusa/contínua na mucosa e submucosa	Inflamação descontínua na transmural
	Distorção na arquitetura da cripta	Fissuras ou úlceras aftosas e granuloma

Fonte: Adaptada de GEDIIB, 2019

2.1.5. Tratamento

Ainda não se conhece um tratamento que leve a cura das DIIs, somente tratamento paliativo, para o alívio dos sintomas, prevenção de recidivas e indução da remissão em pacientes com a doença em atividade. O tratamento a ser adotado depende da severidade da inflamação. Os fármacos normalmente utilizados são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticoides, agentes imunossupressores, terapias biológicas e antibióticos, mantendo essa ordem de utilização em resposta às condições persistentes da doença (Figura 6). Nenhum desses tratamentos são completamente satisfatórios, devido à comprovação da eficácia e dos muitos efeitos colaterais (FRÓES, 2012; PICHA; FERGUSON, 2012; BELÉM; ODA, 2015; ROBERT; CAMBUI, 2015).

Figura 6: Terapia progressiva nas DIIs.



Fonte: adaptado de FRÓES, 2012.

As classes de medicamentos utilizadas para o tratamento das DIIs, o modo de ação e os efeitos colaterais de cada classe foi discutido no artigo de BELÉM; ODA, 2015 e está demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Principais classes medicamentosas utilizadas no tratamento das DIIs.

CLASSE TERAPÊUTICA	EFEITO DESEJADO	REAÇÕES ADVERSAS
Derivados salicílicos – Sulfassalazina; mesalazina	Diminuição das citocinas inflamatórias Inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos Diminuição do stress oxidativo Diminuição NF-kB Proliferação celular Inibição do apoptose	Dose-dependente e relacionada com níveis séricos de sulfapiridina Dor abdominal, náuseas, vômito, anorexia, cefaléia, hemólise, infertilidade masculina, hipersensibilidade, alergia, febre, exantema, linfadenopatia, hepatite e pancreatite
Corticosteróides – hidrocortisona, prednisona, prednisolona, budesonida	Usado para os casos moderados e graves de DII Mais eficazes que os AINEs no uso prolongado e em enemas	Estimulação do apetite, aumento de peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, osteonecrose, supressão da via hipotálamo-hipofise-adrenal, infecções, miopatias, cataratas, atrofia da pele, equimose, hepatite, hipertensão, glaucoma, pancreatite aguda
Imunossupressores- azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina	Eficazes na remissão das DII e para retirada dos corticoides em pacientes córtico-dependentes, Para pacientes com resistência, insensibilidade de corticoides Recidiva frequente das crises após a retirada dos corticoides	Aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas, supressão da medula óssea, leucopenia, mielotoxicidade, pancreatite aguda, náuseas, vômito, dores abdominais, febre, erupção cutânea, mialgia, dores articulares, parestesia, hipertensão arterial, cefaleia, tonturas
Terapia biológica-	Esse tratamento só é utilizado se o paciente for insensível as terapias anteriores.	reações à infusão, infecções do trato respiratório superior, bronquite, faringite, febre, cefaleia,

Utilização de anticorpos antiTNF: Infiximabe, Adalimumab	O antiTNF age ligando-se ao TNF solúvel circulante, impedindo-o de desempenhar o seu papel pró-inflamatório. Neutraliza os receptores de TNF, o que resulta no bloco de sinalização da citocina, reduzindo assim o processo inflamatório. Liga-se aos TNF ligado a produção de células de membrana (transmembrana do TNF) e produz sinalização reversa que inibe a produção de TNF e induz a apoptose de células produtoras de TNF.	náuseas, dor abdominal; com menos frequência: tonturas, dor torácica, artralgia, reações de hipersensibilidade retardada (abdominal ou perianal), pneumonia furunculose, obstrução intestinal, anemia hemolítica, disfunção cardíaca, lúpus induzidos por drogas (anti-DNA positivo), e aumento do risco de linfoma
--	---	---

Fonte: adaptado de: BELÉM; ODA, 2015

A mesalazina, que corresponde ao ácido 5-amino salicílico (5-ASA), é um fármaco anti-inflamatório não esteroide, recomendado como tratamento de primeira linha nas DIIs (LICHTENSTEIN; KAMM, 2008; TAGLIARI et al., 2009).

O mecanismo de ação sugerido para a mesalazina (MSL) está relacionado à sua capacidade de interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias pela inibição da atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), inibindo as células natural Killer (NK) de linfócitos e monócitos na mucosa e reduzindo a produção de radicais livres (MLADENOVSKA et al., 2007a; LEIGHTON et al., 2013).

Segundo artigo publicado por FRÓES (2012), cerca de 30% dos pacientes com RU podem ter remissão espontânea e a maioria responde bem ao tratamento por salicilatos. A indicação terapêutica apropriada, depende do estágio em que a doença se encontra:

RU - Leve a moderada: a dose utilizada na indução de remissão pode variar de 4 a 6g/dia de sulfasalazina (SSZ) e de 3 a 4g/dia de mesalazina (MSL). Para a manutenção da remissão a dose passa para 2 a 4g/dia.

RU - Moderada à acentuada: o tratamento mais adequado é a associação dos salicilatos com corticosteroides, sendo que para a indução, a indicação é de 1mg/kg/dia de prednisona, não ultrapassando a dose diária de 80mg. A budesonida tem tido bons resultados, com dose de 9mg/dia. O uso de corticosteroides não é indicado no tratamento de manutenção da remissão devido aos efeitos colaterais.

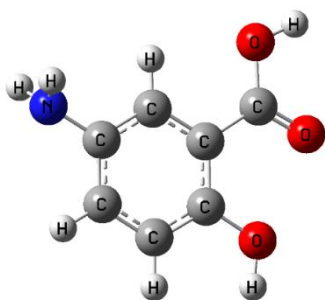
Na DC, a terapia depende de alguns fatores a serem analisados, como: localização da doença; intensidade da apresentação (leve, moderada e grave) e resposta à terapia progressiva. Em geral o tratamento se dá com mesalazina na dose de 3 a 4 g/dia ou sulfasalazina na dose de 1 a 4 g/dia e a sequência dos medicamentos segundo a gravidade se dá como na RC

Como tratamento de primeira escolha nas DIIs, a mesalazina é um fármaco que pode fornecer proteção contra o desenvolvimento do câncer colo retal (CCR) em pacientes com DIIs, uma vez que o risco do CCR fica aumentado com a extensão e duração da doença (BERNSTEIN et al., 2002; TAGLIARI et al., 2009).

2.2 Mesalazina

A mesalazina é um fármaco inodoro, cristais brancos a rosados, baixa solubilidade em água (0.84 g/L a 20°C) e álcool, possui solubilidade aumentada em água quente e ácido clorídrico. A mesalamina contém cromóforos que absorvem em comprimentos de onda > 290 nm e, portanto, pode ser considerada suscetível à fotólise direta pela luz solar. É uma molécula anfotérica, a solubilidade e as características de ionização são dependentes dos valores de pH do meio e pKa dos grupos carboxil e amino (Figura 7). Os valores de pK e pH influenciam a solubilidade e determina as espécies predominantes em solução. Possui valores de pKa estimados de 2,09, 5,26 e 13,64 (FRENCH; MAUGER, 1993; SOUZA, 2012)

Figura 7: Estrutura molecular da mesalazina



Fonte: Próprio autor. Obtido através do programa Gauss View e otimizada pelo programa Semi-empírico, PM6

Muitos fármacos desenvolvidos para serem utilizados por via oral, mostram-se insolúveis ou possuem baixa solubilidade em água, resultando em uma baixas taxas de dissolução (KAWABATA et al., 2011) A grande maioria destes compostos podem ser classificados como Classe II ou IV pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (TAUPITZ et al., 2013).

O SCB estabelece quatro classes de fármacos, classes I, II, III, IV. Os de classe I apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade, os de classe II baixa

solubilidade e alta permeabilidade, os de classe III alta solubilidade e baixa permeabilidade e os de classe IV baixa solubilidade e permeabilidade (KAWABATA et al., 2011).

A MSL faz parte do grupo IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (FERREIRA, 2002).

A biodisponibilidade do fármaco é influenciada por diversos fatores como a velocidade de dissolução, tamanho da partícula, área superficial, polimorfismo do fármaco, formação de sais, permeabilidade, lipofilia, pKa.(FANGUEIRO et al., 2012)

Atualmente, há um crescente interesse em dose mais elevadas com regimes simplificados para a manutenção da remissão, levando ao aumento das taxas de remissão. Esses regimes posológicos devem melhorar a adesão do paciente e seu conforto, uma vez que o número elevado de doses diárias se torna inconveniente e reduz a adesão do paciente ao tratamento e o controle da doença, (ELBARY; ABOELWAFA; AL SHARABI, 2011; KARKOSSA; KLEIN, 2018).

A mesalazina possui efeito local na mucosa do cólon, mas quando é administrada por via oral, é rápida e extensamente absorvida no intestino delgado, levando a uma baixa eficiência, devido à pouca quantidade que chega ao cólon, com efeitos colaterais sistêmicos significativos.(ELBARY; ABOELWAFA; AL SHARABI, 2011)

Devido ao seu modo de ação, a mesalazina deve atingir a mucosa inflamada do lado luminal do intestino. Isto pode ser conseguido através da administração oral de formulações de liberação modificada, que liberam a mesalazina no local apropriado no intestino, e/ou por aplicação retal de mesalazina na forma de enemas. A forma de tratamento conjugado de administrações oral e retal tem sido recomendado pelo Conselho Europeu de Crohn e Organização de Colite (ECCO),

entretanto, a terapia retal a longo prazo é considerada difícil, levando a não adesão ao tratamento (LEIFELD et al., 2011)

A administração pela via oral é considerada a mais confortável, segura e conveniente para a administração de fármacos, pois apresenta a vantagem de evitar dor e desconforto que a administração retal pode ocasionar, bem como contaminação e também é fácil para a autoadministração e completo controle da administração pelos pacientes. Contudo, na administração oral os sistemas de liberação irão encontrar barreiras anátomo-fisiológicas ao longo de todo TGI, as quais podemos citar, a extensa variação de pH entre os diferentes segmentos do TGI (estômago= 1,2-3,0; intestino delgado= 6,5 – 7,0 e cólon= 7 - 8), a presença de muco, a diferença de viscosidade dos fluidos biológicos e presença de microbiota e conteúdo enzimático complexos (FRENCH; MAUGER, 1993; BONI, 2017).

A dose diária recomendada de mesalazina varia conforme a doença e o estágio em que ela se encontra e pode atingir 4,8 g na crise aguda e 2,4 g na manutenção da remissão em doses divididas. Portanto, necessitam de múltiplas administrações de doses devido ao baixo teor de mesalazina nas formulações disponível no mercado (ELBARY; ABOELWAFI; AL SHARABI, 2011)

Os principais produtos disponíveis no mercado e as doses recomendadas estão descritos na Tabela 3:

Tabela 3: Produtos a base de MSL, comercialmente disponíveis no mercado para a administração oral

Produtos comercialmente disponível	Fase da doença	Dosagem recomenda
Pentasa® - comprimido de liberação prolongada de 500 mg e 1g	RU-fase aguda	4g ao longo do dia
	RU- manutenção	2g 1x/dia
	DC-fase aguda / manutenção	Até 4g ao longo do dia
**Salofalk® -comprimido gastro resistentes- 500mg -Grânulos gastro resistentes – 1,0g	RU- fase aguda	1,5 – 3g 2a3x/dia
	RU -manutenção	1,5g 1x/dia
	DC – fase aguda	3a 4g /dia
	DC - manutenção	1,5 a 3g/dia
Mesacol®-comprimidos revestidos De 400mg e 800mg	RU – fase aguda	2,4 a 4,8g/dia
	RU - manutenção	1,5 a 2,4g/dia
	DC - manutenção	2,4g/dia
Medicamentos genéricos 400mg e 800 mg – referência - Mesacol	RU – fase aguda	2,4 a 4,8g/dia
	RU - manutenção	1,5 a 2,4g/dia
	DC - manutenção	2,4g/dia

** produto não disponível no Brasil Fonte: próprio autor

2.3 Sistemas de liberação de fármacos

O principal desafio no tratamento das DII é desenvolver um sistema de liberação vetorizada que libere o fármaco no cólon com precisão. A especificidade do local permite minimizar os efeitos colaterais sistêmicos e permite maximizar a concentração do fármaco no local de ação (SHARMA; SINHA, 2018b) .

Os sistemas de liberação modificada são especificamente projetados para otimizar a ação do fármaco, seja esta ação sistêmica ou local. No caso da mesalazina, estes sistemas são projetados para garantir que o fármaco chegue no

lúmen intestinal em quantidade adequada para a ação local, sem promover ação sistêmica e subsequente toxicidade (MLADENOVSKA et al., 2007a).

Com o foco neste tipo de liberação, a nanotecnologia vem possibilitando o desenvolvimento de nanoestruturas com uma ampla variedade de propriedades físico-químicas, que podem ser moduladas conforme o uso pretendido (BONI, 2017).

2.3.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência que estuda materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem melhoras significativas nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos fármacos, principalmente devido ao seu tamanho em escala nanométrica (BUNKER; MAGARKAR; VIITALA, 2016).

Estratégias farmacêuticas que utilizam sistemas nanoestruturados para liberação modificada de fármaco, têm mostrado resultados promissores ao abordar as mudanças fisiológicas na DII. Por outro lado, o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações pode melhorar ainda mais a eficácia terapêutica, permitindo a vetorização do fármaco para o local da inflamação e a ação específica no cólon (PICHAI; FERGUSON, 2012; HUA et al., 2015b; DATE; HANES; ENSIGN, 2016)

Embora o tamanho da partícula seja um fator importante na liberação colônica, estratégias adicionais para melhorar o tempo máximo de retenção nos tecidos estão sendo explorados. Por outro lado, o tamanho reduzido das partículas podem evitar a eliminação rápida do sistema por diarreias, que é um sintoma normal nas DIIs (NAEEM et al., 2020)

Nanopartículas (NP) também mostraram potencial para acúmulo em áreas com tecido inflamado aumentando a seletividade do sistema ao local (LAMPRECHT et al., 2004). Esta seletividade baseia-se no fato das nanopartículas serem direcionadas ao sistema imunitário presente no tecido inflamado e a um aumento da adesão do sistema com muco, uma vez que as condições fisiopatológicas usuais relacionados a tecidos intestinais inflamados na DII envolvem predominantemente permeabilidade intestinal anormal, aumento da presença de células imunes e níveis mais elevados de produção de muco, que é altamente excretado em áreas de tecido

inflamado (MEISSNER; PELLEQUER; LAMPRECHT, 2006; PICHAJ; FERGUSON, 2012). Desta forma, estas nanopartículas podem ficar aderidas às áreas inflamadas do cólon, podendo aumentar o tempo de permanência do fármaco neste local (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; SANTOS, 2015).

Diversos nanossistemas, com estrutura e composição específicas, podem ser desenvolvidos utilizando metodologias variadas. Dentre eles as nanossuspensões são sistemas vantajosos para liberação de fármacos que possuem solubilidade pH dependente, como a mesalazina, uma vez que possuem uma alta quantidade de fármaco, quantidade reduzida de excipientes e fácil obtenção. (SANTOS, 2015)

Nanossuspensões são compostas por partículas submícron de fármaco puro e possuem um potencial de vetorização, que pode resultar em redução do custo do tratamento, aumento da concentração do fármaco no local de ação e consequentemente redução da dose (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009; DU et al., 2015; SANTOS et al., 2020).

A Nanossuspensão também pode ser considerada relevante para a indústria porque supera as limitações de outros sistemas de liberação de fármaco, tais como toxicidade de polímero, baixa eficiência de incorporação, e questões de estabilidade e biocompatibilidade entre os componentes da formulação. A preparação de nanossuspensões pode ocorrer por processos *top-down* e processos *bottom-up* (DU et al., 2015).

Os processos *top-down* consistem na redução do tamanho das partículas do fármaco em partículas menores, usando várias técnicas de redução, tais como moagem, microfluidização e homogeneização a alta pressão. Esse processo não utiliza solventes orgânicos, no entanto, envolvem elevada energia e nem sempre são

eficientes. Considerando a quantidade de calor gerada e o tempo de exposição, essas operações não são indicadas para materiais termolábeis (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009)

No processo *button up*, as partículas são formadas a partir do estado molecular, onde o fármaco é dissolvido em um solvente e então precipitado na adição de um anti-solvente na presença de um estabilizador. Podemos ter várias adaptações deste método, como: método solvente-anti-solvente; processos de fluidos supercríticos; secagem por atomização; e evaporação de emulsão-solvente (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009)

O processo *button up* também é conhecido como precipitação química, e com os fármacos que possuem solubilidade pH dependente, a precipitação pode ser feita por reação ácido-base. Neste caso, o fármaco é dissolvido em uma solução ácida (ou básica) e em seguida ocorre a precipitação pela adição de uma solução alcalina (ou ácida) (SANTOS, 2015).

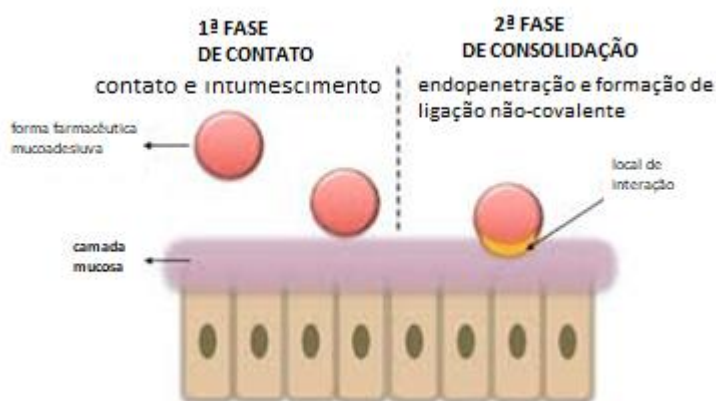
As nanossuspensões podem ser estabilizadas usando surfactantes, polímeros ou uma mistura de ambos. Além de atuar na estabilização física, esses materiais podem também conferir propriedades interessantes ao sistema como a bioadesão (VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009; DU et al., 2015).

2.4 Mucoadesão

Muitos fármacos podem não conseguir o efeito desejado, por ter um tempo de permanência no local de ação muito baixo. Isso pode ser melhorado, conferindo propriedades de bioadesão aos sistemas de liberação de fármacos (DUAN et al., 2016)

Quando a bioadesão acontece no muco, o processo é chamado de mucoadesão e este processo inicia com o contato, seguido da interpenetração e formação das ligações de interação (Figura 8), que podem ser do tipo iônica, ligação covalente, pontes de hidrogênio, forças de Van-der Waals e forças hidrofóbicas (DE LYRA et al., 2007; SANTOS, 2015).

Figura 8: Fases da bioadesão



Fonte: Adaptado de (DE LYRA et al., 2007)

O muco é uma secreção aderente viscosa complexa que é sintetizada por células caliciformes especializadas, que possui a finalidade de lubrificação, manutenção da camada do epitélio hidratada, barreira contra patógenos, dentre

outras. O muco é composto principalmente de água (> 95%) e mucinas, que são glicoproteínas de alto peso molecular. Essas glicoproteínas formam uma rede altamente emaranhada de macromoléculas que se associam entre si através de ligações não covalentes, fornecendo à mucina características de um polieletrólito aniônico em pH neutro.(VARUM et al., 2008a; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009)

A mucoadesão depende das propriedades dos polímeros como, presença de grupos funcionais, peso molecular e comprimento das cadeias poliméricas, que podem influenciar a probabilidade e no grau de interação polímero/muco.(ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Esta interação muitas vezes acontece com polímeros como a quitosana, as gomas e derivados de celulose, que possuem grupamentos funcionais hidrofílicos, tais como carboxila (COOH), hidroxila (OH), amida (NH₂) e sulfato (SO₄H).

A vantagem de desenvolver sistemas mucoadesivos se encontra na capacidade do sistema em residir por tempo prolongado no local de atuação do fármaco, além de permitir um contato mais íntimo entre o sistema de liberação e a membrana absorvente, reduzindo problemas como difusão e degradação do fármaco no lúmen intestinal (VARUM et al., 2008b; MOHAMMED et al., 2017)

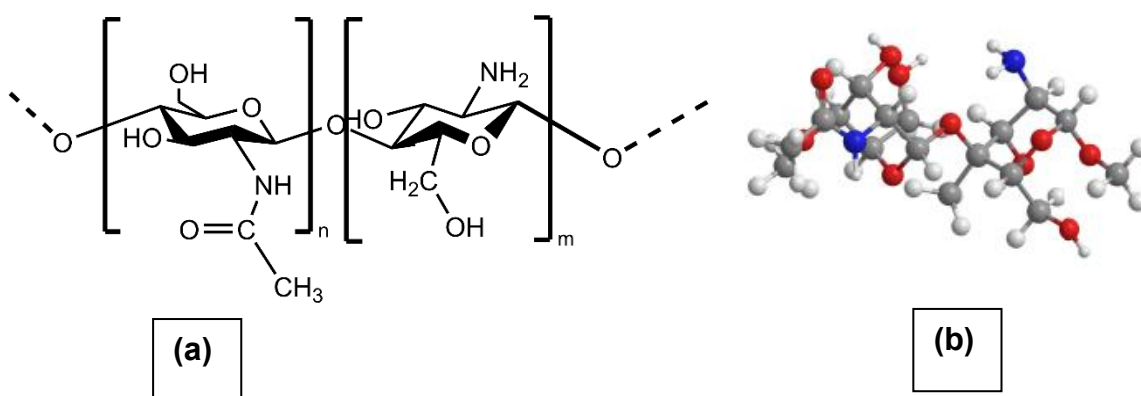
Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diferentes sistemas muco adesivos de liberação oral de fármacos (DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020).

2.4.1 Quitosana

Quitosana é um polímero amplamente utilizado no campo farmacêutico devido as suas propriedades mucoadesivas, hidrofília, biodegradabilidade e biocompatibilidade (SHI et al., 2012; DESAI, 2016; MOHAMMED et al., 2017)

A quitosana (Figura 9), é um dos biopolímeros mais facilmente encontrados na natureza. Obtido pela desacetilação alcalina da quitina, componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, onde os grupamentos acetamida(-HNOCH₃) são transformados em amina. Dependendo da origem da quitina e do processo realizado, como proporção quitina e álcali e a temperatura utilizada, o grau de desacetilação pode variar de 56% a 96%, assim como o peso molecular e o pKa ((BONI; CURY; GREMIÃO, 2016; MOHAMMED et al., 2017; FERREIRA et al., 2020).

Figura 9: Representação estrutural (a) e 3D(b) da molécula da quitosana



Fonte: próprio autor. Obtida através do programa Chemdraw

O peso molecular (PM) da quitosana pode variar de 20 a 1200 KDa. De acordo com o PM ela pode ser classificada em quitosana de baixo peso molecular

(BPM) quando este for menor que 50 KDa, pode ser classificada em médio peso molecular (MPM), quando este estiver compreendido entre 50 e 250 KDa ou como alto peso molecular (APM) quando este valor for superior a 250KDa. O PM pode influenciar tanto o comportamento da quitosana em solução, quanto na sua atividade biológica (FERREIRA et al., 2020).

A quitosana é uma base fraca contendo unidades D-glucosamina com um valor de pKa entre 6,2 e 7,0, o que torna este polímero insolúvel em soluções de pH neutro à alcalino. Em meio ácido, os grupamentos amina do polímero são protonados, resultando em um polissacarídeo solúvel carregado positivamente que tem uma alta densidade de carga atribuída a cada unidade de D-glucosamina (DESAI, 2016; BARCLAY et al., 2019; YU et al., 2019).

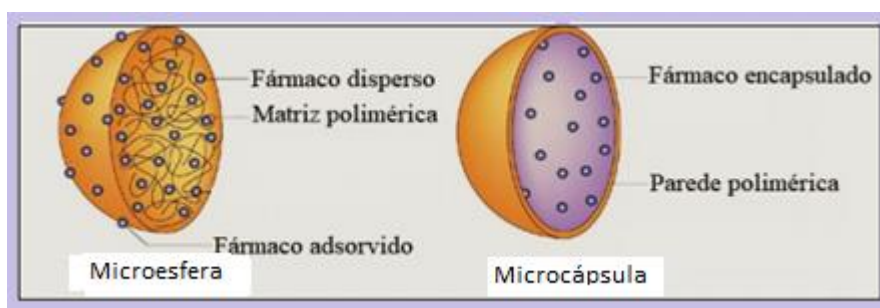
Sistemas de liberação de fármacos revestidos com quitosana têm sido amplamente estudados devido as propriedades da quitosana em interagir com o muco, em não utilização de reagente orgânico tóxico durante a obtenção das nanopartículas, devido a solubilidade em solução aquosa ácida; uma cadeia poliamina linear contendo uma série de grupos amina livres disponíveis para reticulação e a interação com a mucina presente no muco. A característica catiónica do polímero pode ser utilizada para a complexação polieletrólítica com material aniônico, destacando a versatilidade desse polímero (LIANG et al., 2017; MOHAMMED et al., 2017; YU et al., 2019).

Embora as vantagens relacionadas à utilização da QTS em sistemas de liberação de fármacos sejam muitas, para a utilização deste material em sistemas de liberação via oral, uma das principais limitações é sua elevada solubilidade em meio ácido, que pode resultar na liberação prematura do fármaco, no meio gástrico (DESAI, 2016; BONI, 2017; KHAN et al., 2019).

2.5 Micropartículas

As micropartículas poliméricas são sistemas de liberação de fármacos de particular interesse na obtenção de sistemas para administração oral, pois o alto custo do desenvolvimento de novas moléculas ativas, torna os sistemas de liberação de fármacos uma das áreas da indústria farmacêutica mais promissoras. As micropartículas possuem um diâmetro compreendido entre 1 e 1000 μ m e podem ser classificadas de acordo com sua constituição em: **microesferas**, que são sistemas matriciais; e **microcápsulas**, que são sistemas reservatórios, contendo uma substância ativa (Figura 10) (SCHAFFAZICK et al., 2003; PEREIRA et al., 2006; ROSSI-BERGMAN, 2008).

Figura 10: Microesferas e microcápsulas



Fonte: Adaptado de (CARDOSO, 2019)

Quanto as vantagens associadas à esta forma de liberação podemos citar a melhorar as propriedades de transporte, proteção do fármaco ao longo das variações do TGI, protegendo-o da destruição e garantindo sua liberação nos sítios de ação/absorção. A liberação do fármaco no sítio alvo pode ser controlada por diversos mecanismos de liberação, como por difusão, degradação/erosão dos sistemas,

sendo inerentes aos materiais que constituem as micropartículas, permitindo delinear diferentes perfis de liberação (PREZOTTI, 2013).

As micropartículas podem ser obtidas por diversos métodos como: emulsificação-remoção de solvente, coacervação, gelificação ionotrópica, secagem por spray e atomização com fluido supercrítico. A escolha do método apropriado vai depender do tipo de fármaco que será incorporado, dos polímeros empregados, do mecanismo de liberação e da aplicação desejada (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016).

Polímeros são macromoléculas compostas por repetidas unidades estruturais. Essas unidades se fixam por ligações químicas covalentes. Tanto os polímeros naturais como os sintéticos e semi sintéticos, estão disponíveis para uso, mas os polímeros naturais possuem maior relevância na aplicação farmacêutica, por serem biocompatíveis, não tóxicos e de baixo custo (CARDOSO et al., 2017).

Ultimamente, o desenvolvimento de micropartículas de polissacarídeos por gelificação ionotrópica tem sido destaque de várias pesquisas, por apresentar diferentes perfis de liberação quando há variação na concentração do polímero e no grau de reticulação (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2021)

Os polissacarídeos podem ser facilmente modificados química e bioquimicamente e são altamente estáveis, seguros e não tóxicos, com propriedades formadoras de gel, sugerindo adequada utilização em sistemas de liberação de fármaco por via oral (SONIA; SHARMA, 2012; GODGE; HIREMATH, 2014; DAR et al., 2017)

2.5.1. Goma Gelana

A goma gelana (GG) é um exo polissacarídeo hidrofílico e aniônico, obtido da fermentação aeróbica da bactéria *Sphingomonas elodea*. Composta por unidades repetidas de tetra sacarídeos (β 1,3-D-glicose, β 1,4-D- ácido glurucônico, 1,4- β -D-glicose, 1,4- α -L-ramnose) e dois substituintes acetil, sendo o acetato e o glicerato, ligados ao resíduo de glicose adjacente ao ácido glucurônico, (GASPERINI L, MANO JF, 2014; BONI; PREZOTTI; CURY, 2016). Possui uma cadeia linear e tem sido amplamente utilizada em alimentos, cosméticos, produtos de higiene e produtos farmacêuticos como um agente emulsificante, em suspensões, como estabilizante, gelificante ou espessante e pelas propriedades formadoras de filme (CARDOSO et al., 2017).

A goma gelana desacetilada possui propriedades mucoadesivas bem conhecidas e quando na presença de cátions, mono, di ou tri valentes, formam um gel transparente com forte rede estrutural (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020b)

A formação de hidrogéis de goma gelana é dependente de temperatura e, induzida na presença de cátions como o alumínio e cálcio. Devido a habilidade de formar micropartículas mucoadesivas por meio da reticulação iônica, a gelana tem sido muito empregada na obtenção de sistemas de liberação controlada de muitos fármacos (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; MENEGUIN et al., 2018).

2.5.2 Amido Retrogradado

O amido é um polímero amplamente distribuído na natureza. Ele é a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando mais de 80% de todos os polissacarídeos da dieta. A taxa e a extensão da digestão do amido no organismo humano podem ser influenciadas por diversos fatores, incluindo a variação na proporção amilose: amilopectina, o processamento dos alimentos e as propriedades físico-químicas, como gelatinização e retrogradação (SONIA; SHARMA, 2012; DOS SANTOS et al., 2021)

O amido é composto estruturalmente por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -D-(1-4), originando uma cadeia linear com baixo grau de ramificação, com massa molar em torno de 105 Da. Já a amilopectina é uma estrutura altamente ramificada, formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -D-(1,4) e α -D-(1,6) com massa molar variando entre 107 e 109Da. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, de acoo grau de maturação da planta (DENARDIN; SILVA, 2009; CARDOSO, 2019)

O amido é classificado em função da sua estrutura físico-química e da sua susceptibilidade à hidrólise enzimática, podendo ser classificado em: **rapidamente digerível**, quando, em contato com amilase pancreática e amiloglucosidase à uma temperatura de 37°C, converte-se em glicose em 20 minutos; **lentamente digerível**, quando essa conversão em glicose ocorre em 120 minutos; e **amido resistente** (AR), que resiste à ação das enzimas digestivas (LOBO; DE LEMOS SILVA, 2003).

Apesar do amido ser um material muito utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia, por apresentar características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e ser de baixo custo, muitas pesquisas avaliam a relação existente entre a estrutura molecular do amido, comprimento da cadeia de amilopectina, grau de cristalinidade do grânulo, com eventos associados com a gelatinização e com a retrogradação. Essas modificações físicas e químicas podem melhorar a estabilidade, mucoadesão e textura, tornando também o material mais resistente à degradação enzimática (DENARDIN; SILVA, 2009; CARDOSO, 2019).

Quando armazenado e resfriado, o amido gelatinizado pode sofrer um fenômeno denominado de retrogradação. Com o passar do tempo, a interação entre as moléculas do amido vai tornando-se mais forte. As características de retrogradação da amilose e amilopectina são cineticamente diferentes. A amilose apresenta endoterma de fusão de 140°C a 180°C, e a presença de ácidos graxos livres ou lipídios favorece a formação de complexos de inclusão. Por outro lado, a amilopectina retrograda numa taxa muito menor durante um longo período, e sua endoterma de fusão é menor, aproximadamente, 45°C a 60°C. A retrogradação é um fenômeno complexo e varia de acordo com diversos fatores, como: temperatura e tempo de armazenamento, pH, fonte de amido, presença de outros componentes (lipídios, eletrólitos e açúcares) e condições de processamento. Quanto à digestibilidade, pode-se relacionar a retrogradação, a uma menor digestão e absorção do amido (DENARDIN; SILVA, 2009)

Uma matéria prima que tem sido muito utilizada para a produção do AR, é a alta amilose (Hylon VII - ~ 68 % amilose - National Starch & Chemical) devido ao seu elevado conteúdo de amilose, o qual após o tratamento hidrotérmico permite a obtenção de um material retrogradado com elevado teor de amido resistente.

Considerando a capacidade do AR de não ser digerido no intestino delgado, ele se torna disponível como substrato para a fermentação pelas bactérias anaeróbicas do cólon, com isso o AR obtido a partir da alta amilose é considerado um material promissor para obtenção de sistemas para liberação cólon específica de fármacos. (LOBO; DE LEMOS SILVA, 2003; DENARDIN; SILVA, 2009; CARDOSO, 2019)

As micropartículas poliméricas obtidas por polissacarídeos, além de possuírem grande vantagem na vetorização para liberação do fármaco como descrito acima, também possuem propriedades mucoadesivas bastante relevantes. As propriedades mucoadesivas da GG e do AR contribuem para um contato mais íntimo entre o sistema e o epitélio da mucosa intestinal, favorecendo um maior gradiente de concentração do fármaco (MENEGUIN et al., 2018). Em um estudo reológico realizado por (DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020), foi explorado a interação da mucina com os polímeros GG e AR e observou-se um aumento do potencial da capacidade mucoadesiva desses polissacarídeos.

2.5.3. Obtenção das micropartículas por geleificação ionotrópica

A gelificação ionotrópica (GI) é uma técnica simples que não utiliza solventes orgânicos nem altas temperaturas, e de fácil escalonamento. GI se baseia na complexação entre um polieletrólito e contra-íons em soluções aquosas. Esta complexação estabelece ligações supramoleculares, principalmente eletrostáticas, intra e intermoleculares, formando uma estrutura tridimensional. Esta técnica tem sido amplamente explorada, porém seu uso à base de polissacarídeo aniônico, é recente (LAM; GAMBARI, 2014; PREZOTTI et al., 2020).

A gelificação ionotrópica ocorre quando grupos negativos dos polímeros interagem com os cátions di ou polivalentes presentes em solução, construindo uma forte e densa rede de hidrogel.

A reticulação de biopolímeros com íons como Ca^{2+} e Al^{3+} vem sendo amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa. Dentre os estudos envolvendo íons Ca^{+2} podemos citar o desenvolvido por Ferreira e colaboradores (2017), onde foi desenvolvido um hidrogel de alginato de cálcio para liberação de polimixin B e formação de um complexo polieletrólítica (PEC) com cloreto de cálcio.

Estudos com Al^{3+} são mais recentes, mas vem apresentando vantagens devido a sua maior valência que, de certa forma promove uma reticulação mais rápida e uma rede mais densa, o que significa maior capacidade de incorporação e ou maior controle na liberação do fármaco, como mostra o estudo feito por BONI e colaboradores (2016) que demonstrou que íons Al^{+3} promovem uma reticulação capaz de reduzir a liberação de cetoprofeno em meio ácido e alcalino contido em microesferas de GG. Em outro estudo, micropartículas de GG reticulada com Cloreto de alumínio (AlCl_3), aumentou o tempo de liberação da glipizida, porque cada íon Al

se ligava ao grupo carboxílico da GG, resultando em um gel com estrutura mais forte (MAITI et al., 2011).

Alguns fatores devem ser levados em consideração quando utilizamos a técnica de complexação polieletrólítica, como por exemplo a massa molar dos polímeros, densidade de carga dos polieletrólitos, pH do meio, e temperatura. (CARDOSO, 2019)

2.5 Desenvolvimento Racional de Sistemas de Liberação de Fármacos

O delineamento de sistemas de liberação de fármacos é um trabalho que enfrenta certas limitações. O entendimento de detalhes estruturais pelo método experimental pode ser difícil ou impossível, e a variação sistemática de propriedades como composição, tamanho e carga de superfície pode ser demorada e dispendiosa. Métodos teóricos e analíticos podem permitir triagem primária de variáveis, a fim de prever condições adequadas para novas experiências. Já as técnicas de modelagem computacional podem fornecer informações detalhadas sobre interações moleculares e outras propriedades físico-químicas de fármacos, o que vem corroborar os resultados práticos obtidos. Essa cooperação resulta em rapidez, confiabilidades dos resultados e na compreensão da relação estrutura-atividade dos sistemas (TEIXEIRA, 2014; RAMEZANPOUR et al., 2016)

2.6.1 Modelagem computacional

A modelagem computacional, especialmente química quântica, pode ser usado em tecnologia farmacêutica juntamente com estudos experimentais para avançar na compreensão da formação, mecanismo de ação, interação, propriedades mecânicas, caracterização e estabilidade de sistemas de liberação de fármacos. A modelagem computacional é capaz de complementar o estudo experimental e auxiliar no projeto racional de novos sistemas de liberação, auxiliando os experimentos e levando a uma resposta mais esclarecedora e confiável. Os cálculos quânticos químicos permitem a investigação da complexa formação, interação, estabilidade e caracterização de muitos sistemas (TEIXEIRA, 2014; DE SOUZA et al., 2016; RAMEZANPOUR et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2017).

Os métodos utilizados em modelagem molecular podem ser divididos em dois grupos: aproximações clássicas, onde inclui o método de mecânica ou dinâmica molecular e a aproximação quântica, que inclui métodos *ab initio* e semi-empíricos. Dentre os vários métodos semi-empíricos disponíveis, os mais utilizados são o AM1(Austin Model 1) e o PM3 (Parameterization method 3)(TEIXEIRA, 2014).

Essas simulações teóricas possuem diversas aplicações, podendo compreender estudos de estabilidade complexa, mecanismos de liberação, interações dominantes, assim como podem ser utilizados para projetar condições ambientais como, variações de pH, temperatura, condições salinas, entre outros (RAMEZANPOUR et al., 2016).

3. OBJETIVOS

Neste estudo, foi explorado o desenvolvimento de um sistema para de liberação alvo específico de mesalazina baseado em revestimento estratificado de nanopartículas, para atribuir propriedades mucoadesivas.

Etapas para alcançar o objetivo proposto

- Análise das propriedades físico-químicas da mesalazina conjugando as técnicas de modelagem computacional e estudo experimental.
- Desenvolvimento e caracterização de um sistema nanoparticulado de mesalazina pela da técnica de nanoprecipitação empregando reação ácido-base.
- Revestimento das nanopartículas com quitosana para melhorar a mucoadesão do sistema.
- Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de goma gelana e amido retrogradado para liberação colônica.
- Avaliação do percentual de nanopartículas incorporadas às micropartículas.
- Determinação do perfil de liberação in vitro da mesalazina.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Material

Ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) (Sigma Aldrich®), hidróxido de sódio 98% (L S Chemicals®), ácido clorídrico 37% (L S Chemicals®), alta amilose (Hylon VII®; ~68 % amilose – National Starch & Chemical), cloreto de alumínio (AlCl₃) (Vetec®), goma gelana (Kelcogel® CG-LA - NP Kelco), Polissorbato 20, quitosana de baixo peso molecular – grau de desacetilação 90% (Aldrich® chemistry), mucina tipo II (Sigma Aldrich®), SnakeSkin™ Dialysis Tubing (3500 MWCO – Thermo scientific),

4.1.1. Equipamentos

Agitador magnético (Kasvi); agitador magnético (Fisatom – modelo 752-A), analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator; balança analítica (AW220 Marte); centrífuga (Sorvall TC) centrífuga Excesall modelo 206BL (FANEN); estufa com circulação forçada de ar (Fabbe®); microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F); peagâmetro portátil (Kasvi); espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (AGILENT); gotejador Pump11 Elite (Harvard Apparatus), NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd.); estação de dissolução Hanson Research modelo New Hanson SR-8 Plus,

4.2. Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de mesalazina utilizando espectrofotometria UV-VIS.

Segundo a Resolução 166 (ANVISA, 2017) que dispõe sobre a Validação de métodos analíticos, a “Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos”. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade, precisão intermediária e repetibilidade, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

4.2.1.1 Preparo da solução estoque

A solução estoque padrão para determinação espectrofotométrica foi preparada, pesando 20mg de mesalazina em balão de 100ml (200µg/ml). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

4.2.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da Mesalazina na região do ultravioleta

Uma solução de mesalazina (27,0 µg/mL) em água foi submetida a uma varredura entre os comprimentos de onda de 200 e 800 nm, em espectrofotômetro UV-Vis a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção.

4.2.1.3 Especificidade e seletividade

A especificidade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017). Para este teste, foram comparados os espectrogramas da mesalazina (27,0 µg/mL), do HCl (0,5M) do NaOH (1M) e da mistura de HCl(0,5M) e NaOH (1M) na proporção de 1:1. As análises foram realizadas em triplicata

4.2.1.4 Linearidade

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de uma curva analítica da mesalazina, partindo de solução estoque a 200µg/ml, preparando diluições nas concentrações de 10, 15, 17, 20,25, 27, 30, 35 e 40 µg/ml. Cada amostra foi analisada em triplicata.

A linearidade foi avaliada utilizando a média dos valores de cada amostra e a equação da reta foi obtida através do estudo de regressão linear.

4.2.1.5 Precisão e repetibilidade

A determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios: I - avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Devem ser utilizados 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (ANVISA, 2017).

A determinação da precisão intermediária deve obedecer aos seguintes critérios: I.- expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos **dois dias diferentes**, realizada por **analistas distintos** (ANVISA, 2017).

Os testes foram realizados nas concentrações baixa, média e alta conforme preconiza a legislação, sendo que para o teste de repetibilidade, as amostras de 10, 25 e 40 µg/ml foram analisadas em triplicata no mesmo dia, sob condições de trabalho idênticas. Já para o teste de precisão intermediária, as análises foram realizadas em dois dias diferentes, por analistas diferentes, sob as mesmas condições analíticas.

4.2.1.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (ANVISA, 2017).

As medidas de exatidão foram realizadas em triplicata e o valor da concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, considerado 100%, e a exatidão foi calculada através da Equação

$$\text{“Exatidão} = (C / C_t) \times 100\text{”}$$

em que C expressa a concentração média determinada experimentalmente e C_t a concentração teórica correspondente.

4.2.1.7 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e LQ foram determinados utilizando-se soluções de mesalazina nas concentrações de 10; 5 e 2,5 µg/mL, próximos ao limite inferior da curva analítica. Três curvas analíticas foram obtidas em triplicata e o LD e LQ foram calculados de acordo com a Equação “ $LD = (Dp / \alpha) \times 3$ ” e “ $LQ = (Dp / \alpha) \times 10$ ” respectivamente, em que DP expressa o desvio padrão e α a inclinação da reta.

4.2.1.8 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Para o método desenvolvido, foi determinada por meio da análise de soluções contendo 27 µg/mL de mesalazina em diferentes valores de pH e na presença de luz após 7 dias.

4.2.2 Estudo Computacional

A análise computacional foi realizada para esclarecer os eventos associados à precipitação da mesalazina. A determinação das espécies químicas ionizáveis de acordo com a variação dos valores de pH, a energia de interação entre as respectivas espécies químicas, os volumes e áreas ocupados pelos clusters, foram realizadas aplicando cálculos químicos em nível quântico e clássico com parametrizações quânticas.

Para a otimização da estrutura dos compostos iônicos foi utilizado o cálculo quântico em nível DFT, por ter menor custo computacional quando comparado a cálculos *ab initio*. Teoria do Funcional da Densidade (DFT), método B3LYP juntamente com um conjunto de base 6-31+g (d, p), foi utilizado para permitir que todas as coordenadas atômicas e moleculares pudessem ser ajustadas para um estado de mínimo energia (TEIXEIRA, 2014; VALENTE et al., 2017).

Após a definição das conformações moleculares dos compostos iônicos no estado de mínima energia, foi utilizado o módulo Adsorption Locator 9 (ANON, 2017), do Materials Studio suite software para achar o cluster de menor energia para diferentes quantidades de moléculas. Este método de natureza clássica possui parametrizações de resultados quânticos. Com a utilização do campo de força Universal, foi possível calcular 1.10^6 possibilidades de interação entre os compostos, encontrando para cada sistema a coordenada espacial de menor energia. Com a conformação do estado de mínima energia do cluster formado pelas espécies cationica, zwitterionica, e aniônica, calculou-se o volume e a área ocupada pelas espécies citadas (DOS SANTOS et al., 2017).

Para a visualização das moléculas, sistemas químicos moleculares e obtenção das figuras das estruturas químicas, foi utilizado o programa GaussView 5.0 (DOS SANTOS et al., 2017; VALENTE et al., 2017).

4.2.3 Avaliação experimental do efeito do pH no comportamento de precipitação da mesalazina

O estudo da influência do pH no tamanho e na carga superficial das partículas formadas, foi realizado a partir de uma solução ácida de mesalazina (0,67mg/ml de HCl 0,2M) com pH inicial ajustado para 1,31. A análise explorou a faixa de pH 1,31 a 7,0, por ser considerada uma faixa biorrelevante para o TGI. A análise foi realizada com incremento de pH de 0,3($\pm$ 0.2) a 25 °C, através da titulação com soluções de HCl 0,5M, NaOH 0,1M e NaOH 1M em equipamento Zetasizer Nanoseries (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, UK) acoplado de autotitulador MPT-Z (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, UK). Para cada valor de pH, foram realizadas medidas de tamanho e potencial zeta em triplicata e a média dos valores e o desvio padrão foram calculados.

4.2.4. Desenvolvimento das nanopartículas de mesalazina obtidas por precipitação nos valores de pH 1,5; 4,0 e 6,0

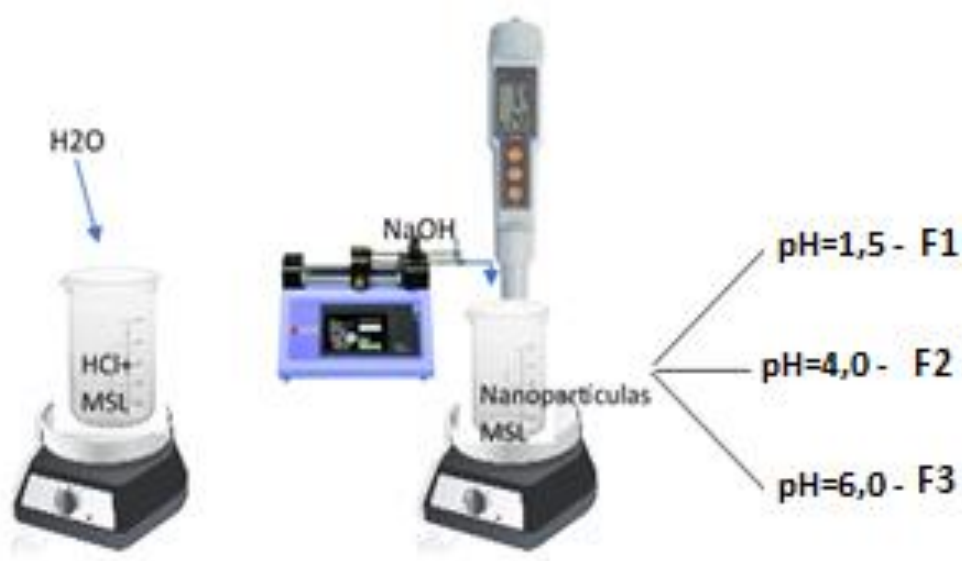
As formulações foram preparadas com o equivalente a 40mg/ml de mesalazina em HCl 0,5M. A solução foi submetida à agitação mecânica a 600 rpm por 10 minutos (Figura 11). Após a solubilização do fármaco, foi adicionado 10ml de água purificada e mantida sob agitação mecânica por mais 10 min. Com o auxílio do gotejador foi adicionado uma quantidade de NaOH (1M) até atingir os pHs 1,5; 4,0 e

6,0, estipulados no estudo computacional para cada espécie química estudada. Após adicionado o volume de NaOH, as concentrações finais de cada formulação esta demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Formulação da nanossuspensão de mesalazina obtidas em diferentes valores de pH. (F₁=pH 1,5; F₂=pH 4,0; F₃=pH 6,0).

	F ₁	F ₂	F ₃
MSL (mg)	200.00	200.00	200.00
HCl 0,5M (ml)	5.00	5.00	5.00
H ₂ O (ml)	10.00	10.00	10.00
NaOH 1M (ml)	1.00	2.48	3.18
pH inicial	1.20	1.20	1.20
pH final	1.50	4.00	6.00
Concentração final de mesalazina(mg/ml)	12.5	11.44	11.00

Figura11: Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas de mesalazina,



Fonte: próprio autor

4.2.5. Caracterização físico-química das nanopartículas F₁, F₂ e F₃

4.2.5.1 Tamanho e Índice de Polidispersão (PDI)

O tamanho e PDI das nanopartículas foram determinados utilizando-se a técnica de DLS, em equipamento Zetasizer Nano-ZS, em temperatura de 25 °C, e ângulo de detecção de 173°. As amostras foram diluídas 10 vezes com água purificada. As medidas foram realizadas em triplicata, com 10 determinações para cada amostra. As informações sobre o diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos foram obtidas com o auxílio do software Zetasizer nano ZS v7.11.

4.2.5.2 Análise do Potencial Zeta (PZ) das nanopartículas

A determinação do PZ das nanopartículas, foi realizada em analisador de partículas Zetasizer Nano-ZS. As amostras foram diluídas 10 vezes com água purificada. As medidas foram realizadas em triplicata, com 10 determinações para cada amostra. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Zetasizer nano ZS v7.11

4.2.5.3 Análise visual das formulações contendo nanopartículas

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3 e armazenadas em geladeira. Após 03 meses da data do preparo, as amostras foram avaliadas quanto a mudança de coloração e alteração do pico de absorção no espectrofotômetro.

4.2.5.4 Determinação da porcentagem de mesalazina precipitada nos diferentes valores de pH

4.2.5.5 Análise das nanopartículas de mesalazina obtidas nos diferentes valores de pH, utilizando as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).

As técnicas termoanalíticas foram utilizadas para investigar as alterações no ponto de fusão ou na entalpia proporcionada por modificações de pH que pudessem ser correlacionadas com a predominância de diferentes estados químicos.

Os estudos de DSC foram realizados utilizando um DSC Mettler 1 (Mettler Toledo®) sob atmosfera de nitrogênio (50 ml/min). A calibração foi realizada usando índio. As formulações F_{1,5}, F_{4,0} e F_{6,0} foram centrifugadas (30 min, 3600 rpm) e o sobrenadante foi removido, para retirar o excesso de água. A matéria prima mesalazina também foi utilizada para análise comparativa. As análises foram realizadas a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min, em uma faixa de temperatura de 0 a 320 ° C, utilizando um porta amostra de alumínio selado com um orifício central na tampa contendo cerca de 5 mg de amostra (MURA. et al. 2012). Após o tratamento dos dados, calculou-se a entalpia normalizada levando em conta a quantidade de água detectada nas amostras F_{1,5}; F_{4,0} e F_{6,0}.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para avaliar a degradação térmica em uma faixa de temperatura de 25-650°C usando um porta amostra de alumínio aberto como referência e porta amostras de alumínio com amostras (3,00 ± 0,5 mg) sob atmosfera de ar (taxa de fluxo: 100 mL.min⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 ° C min⁻¹. A calibração foi realizada sob as mesmas condições usando o índio como padrão de referência.

4.2.6 Revestimento das nanopartículas de mesalazina com quitosana

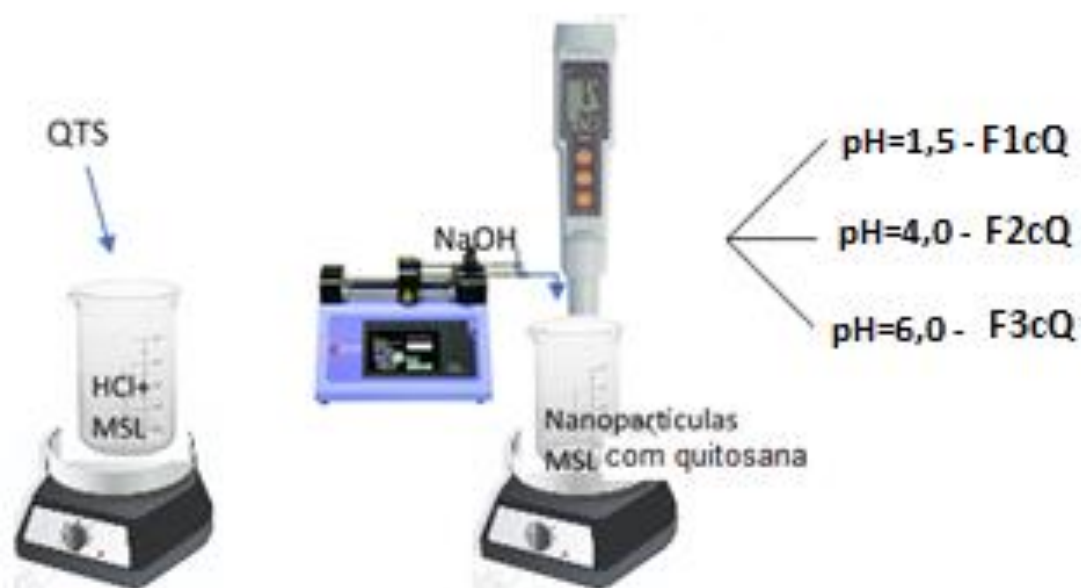
O revestimento das nanopartículas com quitosana foi realizado empregando dois métodos. No primeiro método, a quitosana em diferentes proporções, foi adicionada à dispersão de nanopartículas já formadas. No segundo, a quitosana foi adicionada à solução de mesalazina dissolvida em HCL, durante o processo de precipitação ácido/base.

A dispersão de quitosana foi obtida em solução de HCl 0,1M na concentração de 1mg/ml, sob agitação magnética por 24h. Os valores de pH das dispersões de quitosana foram ajustados para 1,5; 4,0 e 6,0 de acordo com o pH final das nanopartículas.

No primeiro método de revestimento, foram testadas as proporções NP:QTS(m:m) de 0,3; 0,6; 0,9 e 1,2. Para tanto, volumes de dispersão de quitosana(1mg/ml) de 3, 6, 9 e 12ml em relação à 1 ml nanossuspensão (10mg/ml) foram adicionados sob agitação de 30min a 400rpm. Após a incorporação da quitosana, foi avaliado o tamanho das partículas, o PDI e o potencial zeta através de equipamento Zetasizer Nanoseries (MALVERN INSTRUMENTS) em triplicata.

Para o segundo método de revestimento, as dispersões de quitosana (1mg/ml) foram adicionadas durante a obtenção das nanopartículas por precipitação ácido-base, substituindo a água, conforme demonstrado na Figura 12. A massa de quitosana adicionada, corresponde a 2,5% (m/m) em relação às nanopartículas obtidas.

Figura 12: Representação esquemática do método de revestimento das nanopartículas de mesalazina pela quitosana



Fonte: próprio autor

4.2.6.1. Análise das nanopartículas pela técnica de rastreamento NTA (Nanoparticle Tracking Analysis).

As análises foram realizadas em instrumento NanoSight NS300, equipado com laser de 532nm (verde), câmera e bomba de fluxo. As amostras foram diluídas, filtradas em membrana de PTFE 0,45 e injetadas sob fluxo constante, em temperatura ambiente.

4.2.6.2 Estudo da interação entre a mucina e as nanopartículas revestidas e não revestidas com quitosana, a partir da análise do potencial zeta.

O estudo de interação das nanopartículas com a mucina foi baseado no método (ANDREANI et al., 2015) com modificações. Foi preparada uma solução de mucina 500µg/ml em água. A partir desta solução foram preparadas diluições de 100, 200 e 300µg/ml em HCl 0,1N (pH=1,2) e em tampão fosfato (pH=6,8).

Após a mistura de 900 µl de solução de mucina com 300µl de nanopartículas, a amostra foi deixada em banho maria a 37°C/1h.

Foi determinado o potencial zeta das amostras em equipamento Zetasizer Nanoseries (MALVERN INSTRUMENTS) em triplicata, e os resultados foram comparados com as amostras sem quitosana.

4.2.7 Micropartículas

4.2.7.1 Retrogradação do amido

Dispersão aquosa de alta amilose (5% m/v) foi preparada sob agitação mecânica durante 30 min. Esta dispersão foi autoclavada (121 ° C / 1 atm, 15 min) e subsequentemente resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, a alta amilose gelatinizada foi retrogradada por ciclos alternados de temperatura (4°C e 30°C, 2 dias em cada temperatura), durante 16 dias, conforme citado nos artigos de CARDOSO et al., 2020, CARDOSO et al., 2017.

4.2.7.2 Obtenção das micropartículas

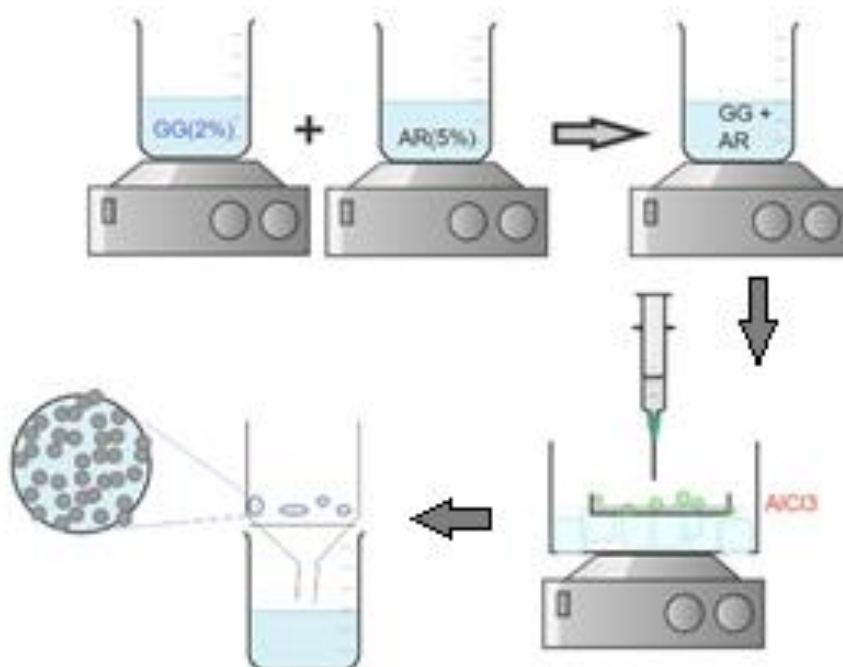
As micropartículas vazias foram preparadas através de uma dispersão de gelana a 2% (p/v) em água purificada sob agitação a 70°C por 15 min. Após a dispersão estar completa, foi adicionado AR 5% (p/v) na proporção 1:1, e mantido a agitação por 15min a uma temperatura de 50°C.

A dispersão foi gotejada em solução de AlCl_3 3% para que ocorra a reticulação das cadeias poliméricas por gelificação ionotrópica, em seguida as micropartículas foram filtradas e lavadas com uma porção de 80mL de água purificada (Figura 12). (OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017)

Em seguida as micropartículas foram secas em estufa de ar circulante a 35°C over nighth.

Figura13: Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas vazias

Fonte: próprio autor



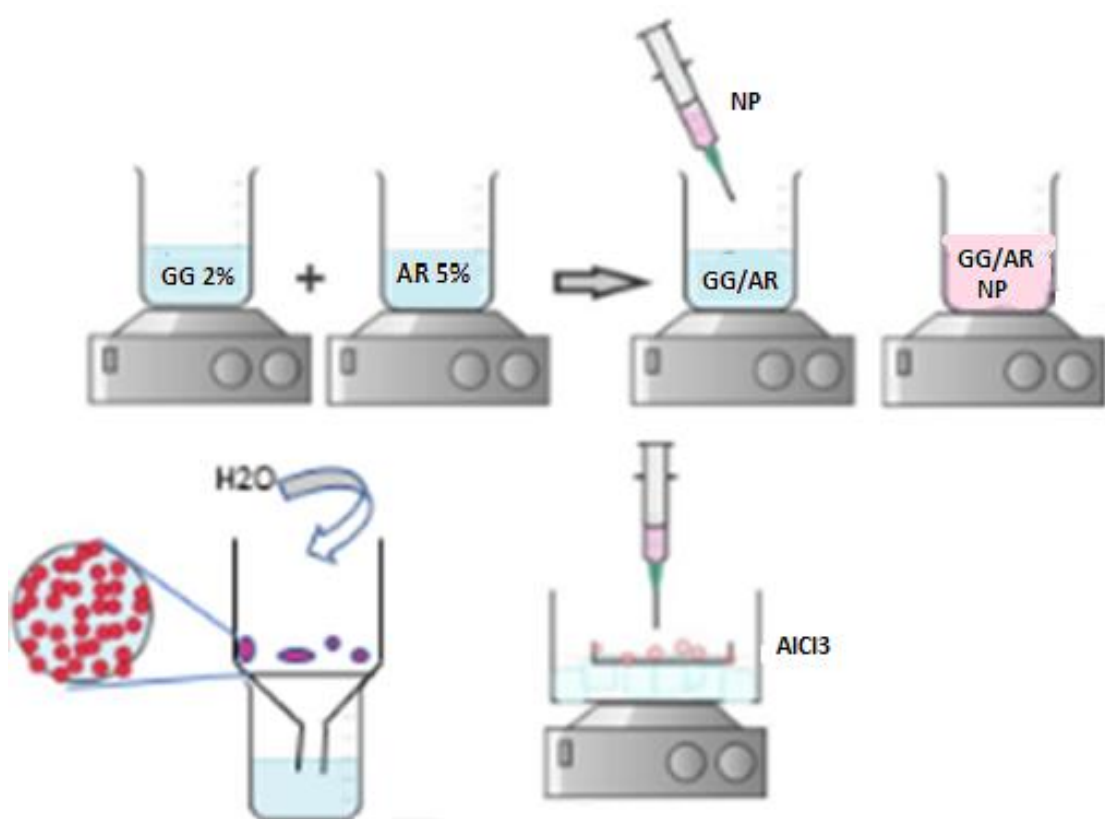
Fonte: Próprio autor

4.2.7.3 Estudo de seleção do método de incorporação das nanopartículas de MSL nas micropartículas poliméricas

4.2.7.3.1 Incorporação das nanopartículas de MSL não revestidas e revestidas com quitosana na dispersão polimérica (método 1)

A dispersão polimérica foi preparada conforme item 4.2.6, porém a GG (2%) foi dispersa em 3ml de água. Após a dispersão de GG: AR estar pronta, foi adicionado 2ml de dispersão de nanopartículas (10mg/ml) e homogeneizado por mais 15min (Figura 14).

Figura14: Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 1

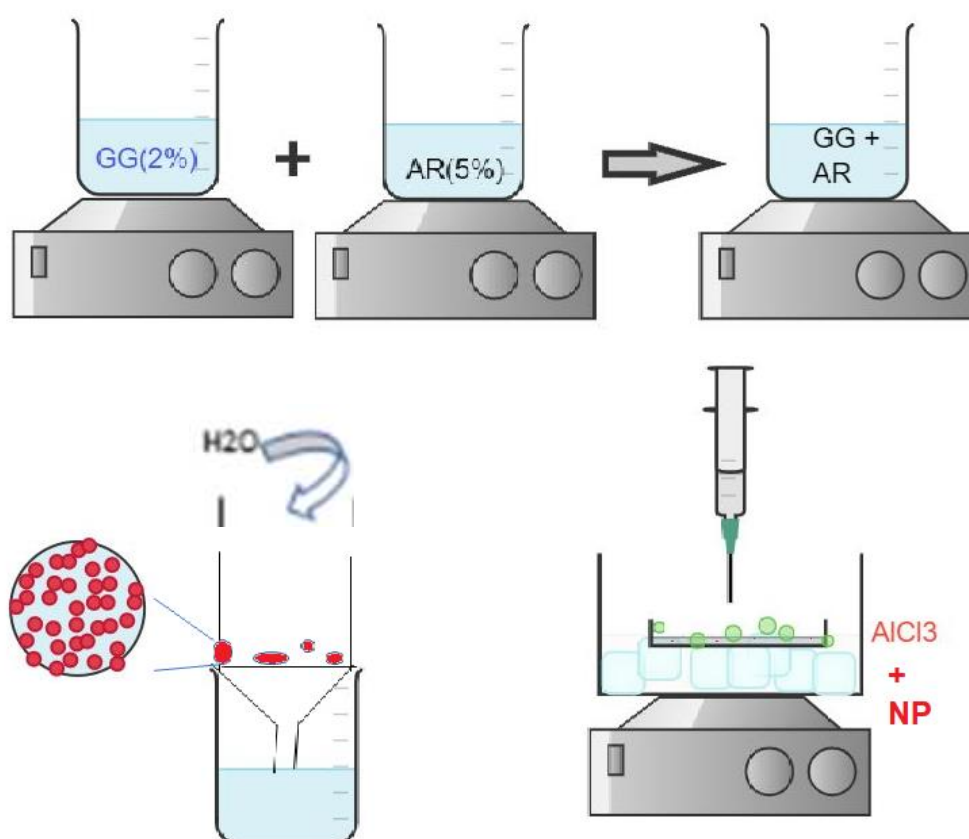


Fonte: próprio autor

4.2.7.3.2 Incorporação das nanopartículas de MSL na solução reticulante (Método 2)

A dispersão polimérica foi gotejada em 10 ml de AlCl_3 (3%) contendo 2 ml de dispersão de nanopartículas (10mg/ml), conforme figura 15.

Figura15: Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 2

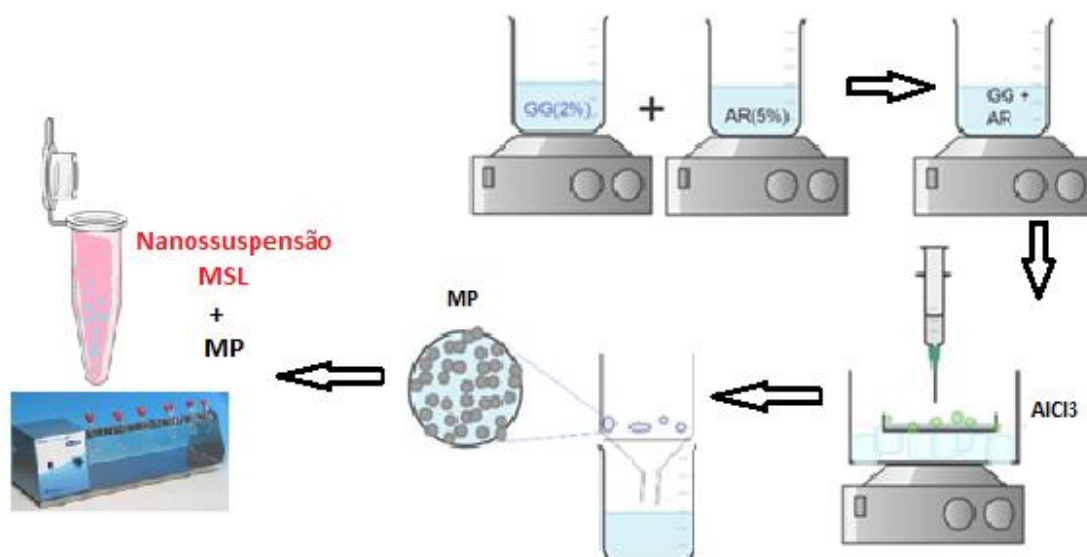


Fonte: próprio autor

4.2.7.3.3 Incorporação das nanopartículas de MSL por imersão (Método 3)

Foi pesado uma amostra de 100mg de MPs vazias e secas. Foi adicionado 1ml de dispersão de nanopartícula de mesalazina (10mg/ml) e colocado para agitação em homogeneizador por 24h, conforme figura 16. As MPs intumescidas foram secas até peso constante.

Figura16: Representação esquemática do processo de obtenção das micropartículas pelo método 3



Fonte: próprio autor

4.2.8 Avaliação das micropartículas contendo nanopartículas de mesalazina

4.2.8.1 Avaliação da eficiência de incorporação (EI%)

MPs secas contendo nanopartículas de mesalazina sem e com quitosana, foram precisamente pesadas (50mg) e incubadas em 3ml de tampão fosfato (TF) pH6,8 por 48h. Em seguida, todo o conjunto foi transferido para tubo falcon, e centrifugadas a 3600rpm por 30 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato celulose 0,45 μ m e a concentração do fármaco foi analisado em espectrofotômetro UV-VIS em 330nm, em triplicata. Para a determinação da porcentagem de MSL incorporada, aplicou-se a equação1.

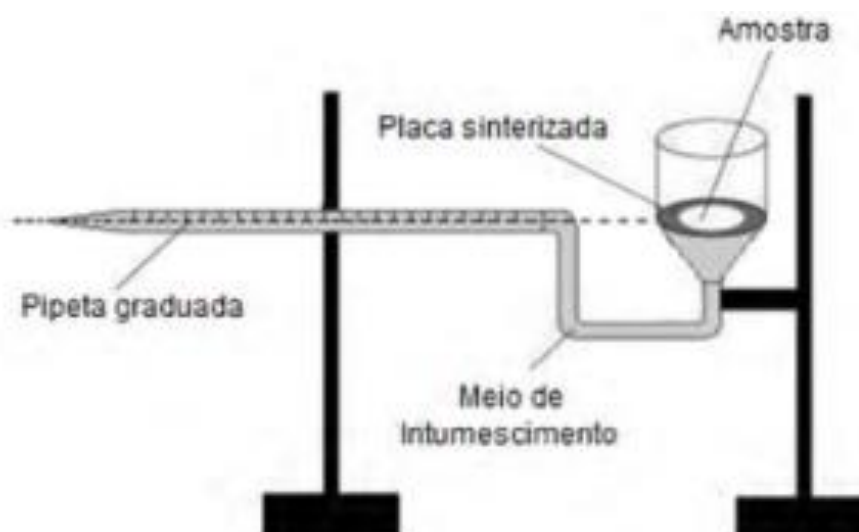
$$EI (\%) = \frac{\text{massa total de MSL incorporada} - \text{massa de MSL livre no sobrenadante} \times 100}{\text{Massa total de MSL incorporada}} \quad (\text{Eq 1})$$

4.2.8.2 Determinação do perfil de absorção de líquido das MP vazias e contendo NPs

A capacidade das MPs em absorver líquido foi determinada utilizando-se dispositivo de Enslin adaptado (Figura 17). Uma massa de MP foi precisamente pesada e disposta sobre a placa de vidro sinterizada do funil de Enslin conectado a uma pipeta de 1ml por meio de uma mangueira de látex. Após acertar o menisco da pipeta, o funil e a extremidade da pipeta foram cobertos com papel alumínio. O volume de líquido absorvido foi observado na pipeta, nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos para o meio ácido (HCl 0,1N, pH=1,2) e nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos para tampão fosfato (pH=6,8), pHs considerados biorrelevantes para o TGI. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em capacidade de absorção por massa de MPs, conforme Equação 2.

$$\text{Absorção de líquido (\%)} = \frac{\text{Volume médio absorvido} \times 100}{\text{massa das microparticulas}} \quad (\text{Eq 2})$$

Figura 17: Dispositivo de Enslin adaptado



4.2.8.3 Avaliação da erosão das MP em diferentes valores de pH

Para a avaliação da erosão, uma massa de MP foi precisamente pesada e a erosão das micropartículas foi avaliada colocando-as sobre um suporte acrílico, contendo uma malha para retenção em sua base (Figura 18). O conjunto foi imerso em HCl 0,1N (pH 1,2) ou em tampão fosfato (pH 6,8), durante 120 minutos. Em tempos pré-determinados (15; 30; 60 e 120 minutos), as MPs foram removidas e secas até peso constante. O teste foi realizado em triplicata e após a secagem as micropartículas foram novamente pesadas e calculou-se a porcentagem de erosão a partir da Equação 3

$$Erosão (\%) = \frac{\text{massa inicial da MPseca} - \text{massa final da MPseca} \times 100}{\text{massa final da MPseca}} \quad (\text{Eq 3})$$

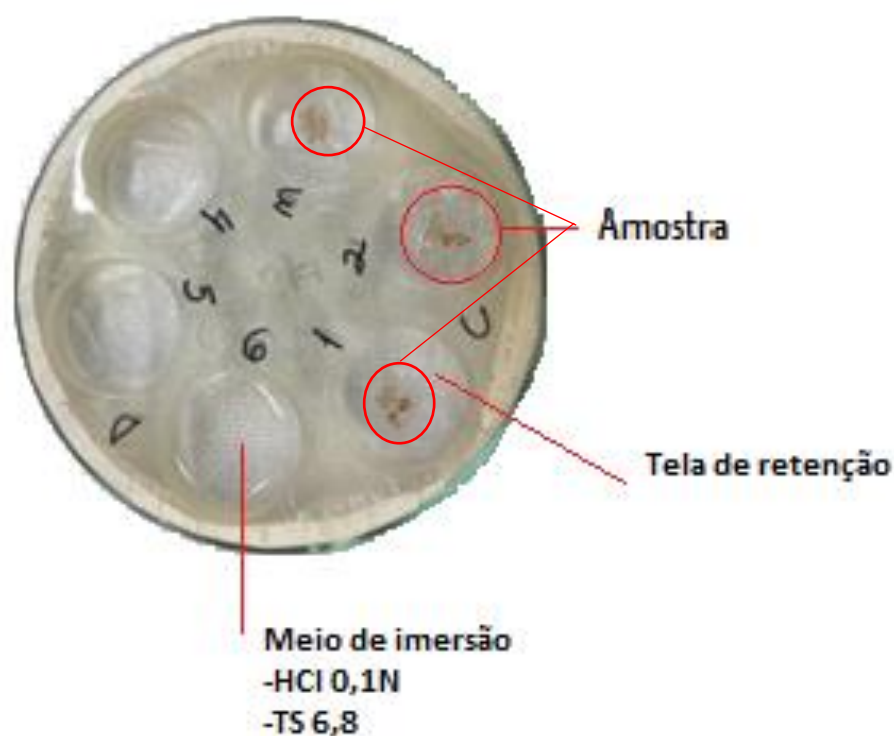
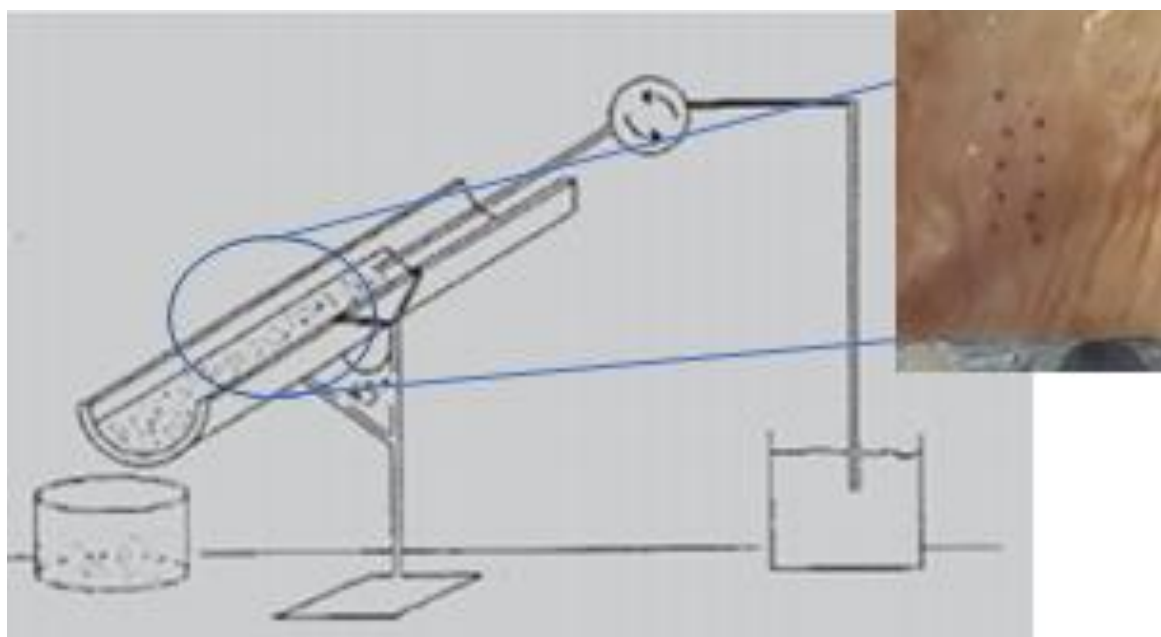


Figura 18: Dispositivo acrílico para teste de erosão

4.2.8.4 Avaliação *ex vivo* da mucoadesão da MP com mucosa de intestino de porco.

O método utilizado para estudo da mucoadesão foi o de escoamento de líquido, conforme descrito por (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Foram colocadas 10 MP em contato com a mucosa do intestino grosso de porco previamente hidratado com tampão fosfato, sob uma taxa de irrigação com solução salina (0,9%) de 20ml/min e um ângulo de 45° por 30 minutos, conforme Figura 19.

Figura 19: Representação esquemática do teste de mucoadesão por escoamento de líquido



Fonte: adaptado de VARUM et al., 2008

4.2.8.5 Análise de tamanho, forma e superfície das micropartículas

4.2.8.5.1 *Estereoscopia*

O tamanho e forma das micropartículas foram avaliadas utilizando imagens capturadas de um estereomicroscópio Leica M205C acoplado com uma câmera digital Leica DMC 2905 (FALCONE et al., 2020). As amostras foram previamente secas até peso constante e dispostas em placa de petri. Para cada amostra foram feitas 3 imagens com o aumento variando entre 1,37x e 6,46x.

4.2.8.5.2 *Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)*

O tamanho e a morfologia da superfície das micropartículas foram avaliados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todas as imagens foram coletadas através de um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução modelo JEOL JSM – 7500F, e processadas usando software ImageJ, versão 1.49.

As micropartículas foram secas por 48h em dessecador contendo esferas de sílica como dessecante sob vácuo à temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas inteiras e seccionadas ao meio através do auxílio de um bisturi. As amostras foram fixadas em fita dupla face, recobertas com carbono. Todos os parâmetros de preparação das amostras foram escolhidos de acordo com os critérios usados pelo Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Araraquara-SP.

4.2.9 Estudo de Dissolução da MSL

4.2.9.1 Estudo de solubilidade da MSL

A solubilidade da MSL foi determinada em água; HCl 0,1N pH=1,2; tampão fosfato pH=6,8 e tampão fosfato pH=7,4. Uma quantidade de fármaco suficiente para extrapolar a saturação foi colocada nos meios anteriormente citados, e levados a agitação orbital por 48h, em velocidade constante e ao abrigo da luz. Após o término do tempo, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 50min e o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato celulose 0,45 μ m e a concentração de MSL dissolvida foi analisada em espectrofotômetro UV-VIS nos comprimentos de onda de 300nm para água e HCl e de 330nm para tampão fosfato 6,8 e 7,4. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.9.2 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da MSL

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados com as amostras de MSL livre, nas nanopartículas F3 e F3cQ, e nas micropartículas contendo Nanopartículas MPF3 e MPF3cQ. O teste foi realizado em dissolutor SR-8 Plus Hanson Research, usando aparato 2 modificado, em cuba de volume reduzido (100ml), sob agitação de 30 rpm a temperatura de $37 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

Os ensaios foram feitos em triplicata em meios de diferentes valores de pH, sendo em HCl 0,1N (pH=1,2) por 2h e em tampão fosfato (pH=6,8) por 24h. Uma massa de amostra correspondente a 8,8mg de MSL foi precisamente pesada e adicionada em 100 ml de meio, garantindo a condição sink. As amostras foram

aconditionadas em membrana de diálise tubular snake skin 3,5 MWCO de 22 x 80 mm, amarradas nas extremidades e presas no aparato tipo pá. Em cada tempo de amostragem, foram recolhidos 3ml de meio, filtrados em membrana de acetato de celulose 0,20 μ m e analisados em espectrofotômetro, conforme método desenvolvido e validado neste estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

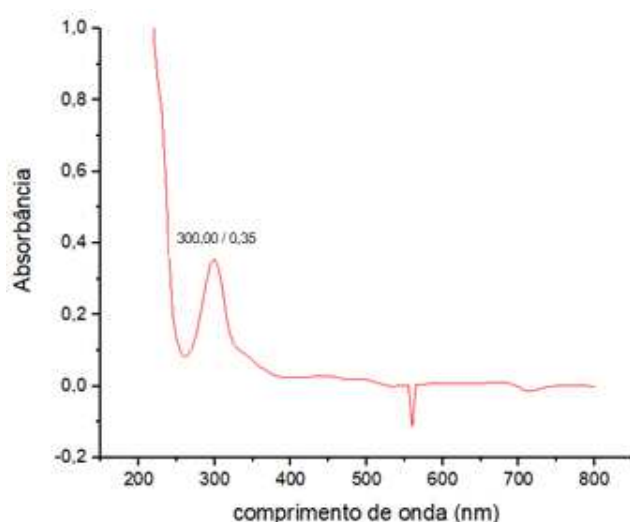
5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de Mesalazina utilizando espectrofotometria UV-VIS.

O método foi validado de acordo com as normas estabelecidas, Farmacopéia Americana, Farmacopéia Brasileira e Resolução 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA, que dispõe sobre a Validação de métodos analíticos. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade/seletividade, linearidade, precisão intermediária e repetibilidade, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

5.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção da Mesalazina na região do ultravioleta

O espectro de absorção de uma solução de Mesalazina (27,0 µg/mL) em água foi avaliado empregando espectrofotômetro UV-Vis a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção (Figura 20).

Figura20: Espectro de absorção a Mesalazina (27,0 µg/mL) em água

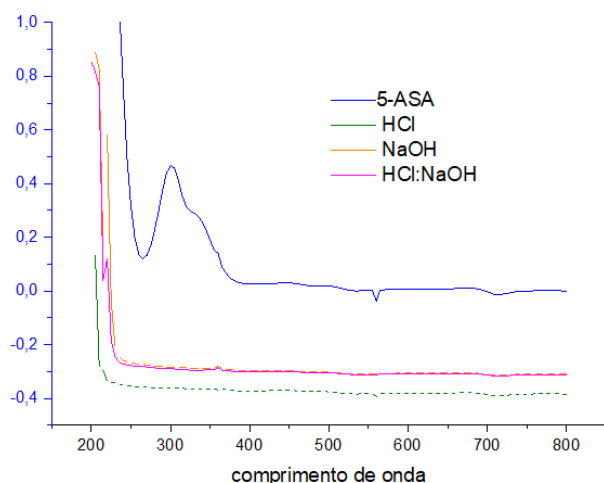


A partir do espectro obtido, verificamos que o pico de máxima absorção foi em 300,00nm.

5.1.2 Seletividade e especificidade

A especificidade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar e/ou quantificar, inequivocamente, o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. (ANVISA, 2017). Para este teste, foram comparados os espectrogramas do Mesalazina (27,0 µg/mL), do HCl (0,5M) do NaOH (1M) e da mistura de HCl(0,5M) e NaOH (1M) na proporção de 1:1. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos estão demonstrados a seguir na Figura 21.

Figura 21: Especificidade / seletividade do método analítico. Espectro de absorção da Mesalazina; HCl 0,5M; NaOH 1M e mistura de 1:1 (HCl;NaOH)

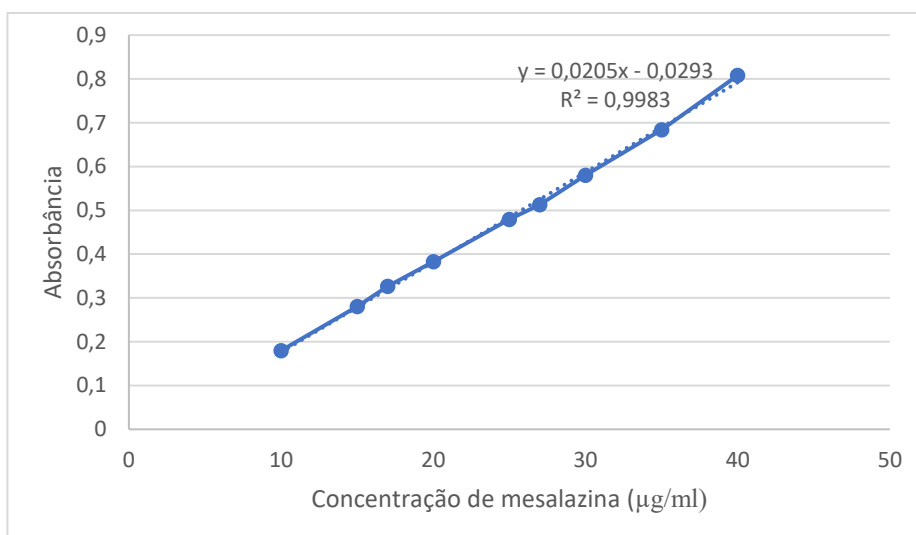


O método se mostrou seletivo, pois nenhum dos componentes da formulação possui um pico de absorção na região do apresentado pelo fármaco.

5.1.3 Linearidade e intervalo

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de uma curva analítica da Mesalazina, partindo de solução estoque a 200µg/ml, preparando diluições nas concentrações de 10, 15, 17, 20,25, 27, 30, 35 e 40 µg/ml. Cada amostra foi analisada em triplicata e o gráfico da correlação de concentração da mesalazina e da absorbância foi construído. (Figura 22)

Figura 22: Curva analítica da absorbância em função da concentração da mesalazina em 300 nm.



Desta maneira, a linearidade do método foi confirmada para concentração de Mesalazina na faixa de 10 a 40µg/ml, através dos valores de equação da reta e coeficiente de correlação linear (R^2), calculados a partir da equação 4. Os resultados estão em conformidade com a legislação que preconiza o valor de $R^2 > 0,99$.

$$y = 0,0205x - 0,0293 \text{ (Eq. 4)}$$

5.1.4 Precisão

A determinação da repetibilidade (precisão intra-corrida) foi determinada analisando as concentrações de 10, 25 e 40 µg/ml, em triplicata, sob as mesmas condições de análise da linearidade, com o mesmo analista e o mesmo instrumento, conforme preconiza a legislação. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos pelo teste de precisão intra-corrida(repetibilidade)

ABS	Conc. Teórica(µg/ml)	Conc. Real(µg/ml)	Conc. Média(µg/ml)	PD	PDR (%)
0,2089	10	8,760975610	8,913821138	0,28612	3,209833
0,2084		8,736585366			
0,2188		9,243902439			
0,4942	25	22,67804878	22,89430894	0,21958	0,959122
0,4985		22,88780488			
0,5032		23,11707317			
0,8541	40	40,23414634	40,16910569	0,17055	0,42457
0,8554		40,29756098			

A **precisão** foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR = (DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A determinação da precisão intermediária ou precisão inter-corrida (tabela 6), deve obedecer aos seguintes critérios: I.- expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos **dois dias diferentes**, realizada por **analistas distintos**; (ANVISA, 2017)

Tabela 6: Resultado obtido pelo teste de Precisão intermediária (inter-corrida)

Amostra	Conc. Teórica(µg/ml)	Conc. Real(µg/ml)	DP	DPR (%)
Analista1	10	8,9138	0,2861	3,20963
Analista2	10	8,2	0,16877	2,05817
Analista1	25	22,8943	0,21958	0,9591
Analista2	25	24,1789	0,86484	3,57684
Analista1	40	40,1691	0,17955	0,44699
Analista2	40	40,9317	0,19494	0,47626

Segundo a legislação vigente (ANVISA,2017), o teste foi considerado preciso, pois os valores de desvio padrão relativo se mantiveram abaixo dos 5%.

5.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.

As medidas foram realizadas em triplicata e o valor da concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, considerado 100%, e a exatidão foi calculada através da Equação 5, em que C expressa a concentração média determinada experimentalmente e Ct a concentração teórica correspondente. Segundo a legislação, os valores devem estar entre 80-120% (tabela 7)

$$\text{“Exatidão} = (C / C_t) \times 100 \text{ (Eq:5)}$$

Tabela 7: Determinação dos valores de exatidão.

Conc. Teórica($\mu\text{g/ml}$)	Conc. Média($\mu\text{g/ml}$)	Exatidão (%)
10	8,9	89,1
25	22,9	91,6
40	40,2	100,4

O método foi considerado exato, uma vez que todos os resultados estavam dentro do limite estabelecido pela legislação, de 80-120%

5.1.6 Limite de detecção e de quantificação

Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O LD e LQ foram determinados utilizando-se soluções de Mesalazina nas concentrações de 10, 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, próximos ao limite inferior da curva analítica. Três curvas analíticas foram obtidas em triplicata e o LD e LQ foram calculados de acordo com a Equação “ $\text{LD} = (\text{Dp} / \alpha) \times 3$ ” e “ $\text{LQ} = (\text{Dp} / \alpha) \times 10$ ” respectivamente, em que DP expressa o desvio padrão e α a inclinação da reta.

O LD, que representa a menor quantidade do analito capaz de ser detectada, e o LQ, que corresponde à menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método (BRASIL, 2017) foram avaliados e os valores calculados a partir das equações foram 1,9861 $\mu\text{g/mL}$ e 6,6204 $\mu\text{g/mL}$ para LD e LQ, respectivamente. Esses resultados demonstraram que a metodologia empregada foi capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de Mesalazina.

5.1.7 Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Para o método desenvolvido, foi determinada por meio da análise de soluções contendo 27 µg/mL de Mesalazina, variando o pH das amostras e os fornecedores diferentes dos reagentes utilizados (tabela 8) (ANVISA,2017).

Tabela 8: Determinação da robustez do método analítico desenvolvido

amostra a 27µg/ml	pH 6,5	pH 4	exposição a luz 10 dias
1	0,5095	0,536	0,5474
2	0,519	0,5705	0,5586
3	0,5092	0,5706	0,58
média	0,512566667	0,559033333	0,562
DP	0,005573449	0,019947514	0,016563816
DPR (%)	1,087360791	3,568215574	2,947298218

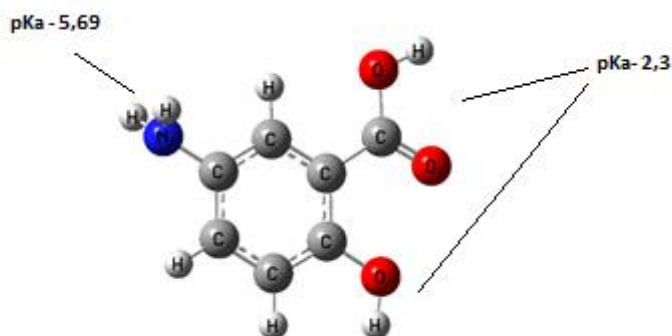
De acordo com os resultados apresentados, os valores de DPR calculados, para todos os parâmetros testados, foram menores que 4%, o que prova uma robustez apropriada do método analítico desenvolvido.

5.2 Abordagem computacional no estudo de pré-formulação

A técnica de modelagem computacional é uma ferramenta importante pois permite aos pesquisadores prever teoricamente as características conformacionais, interações moleculares e outras propriedades físico-químicas do fármaco que podem influenciar a obtenção de tipos de partículas diferentes, o transporte e sua liberação. Com a modelagem computacional é possível fazer uma correlação racional entre estudos teóricos e experimentais, contribuindo para a compreensão, do ponto de vista molecular das possíveis interações e outros eventos que impulsionam a formação de partículas e seu comportamento no meio fisiológico

A mesalazina é um fármaco que possui valores de pKa 2,3 que está associado ao grupamento carboxílico e pKa 5,69 associado ao grupamento amina da molécula (Figura 23). Com isso, a mesalazina pode ser considerada catiônica em valores de pH < 2,3, zwitteriônica em valores entre 2,3 e 5,69 e aniônica em valores de pH > 5,69 (FERNANDES PREVIDELLO et al., 2006; NOJAVAN et al., 2012).

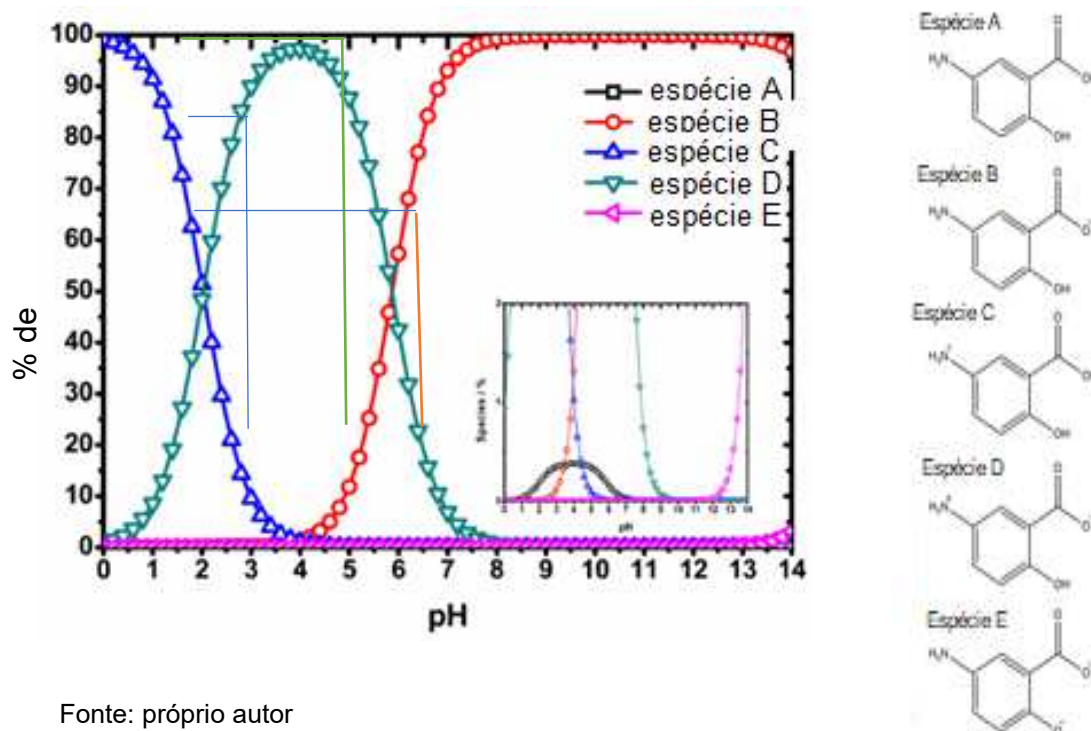
Figura23: Representação da geometria espacial da mesalazina com os respectivos grupos funcionais e valores de pKa



Fonte: própria autora gerada pelo programa GaussView 5.0.8

A análise de modelagem computacional da mesalazina mostrou que a variação do pH produz moléculas com predominância de cargas diferentes, conforme mostrado na Figura 24. Apesar do estudo ter detectado 5 espécies diferentes, somente as espécies B, C e D apresentaram uma porcentagem significativa.

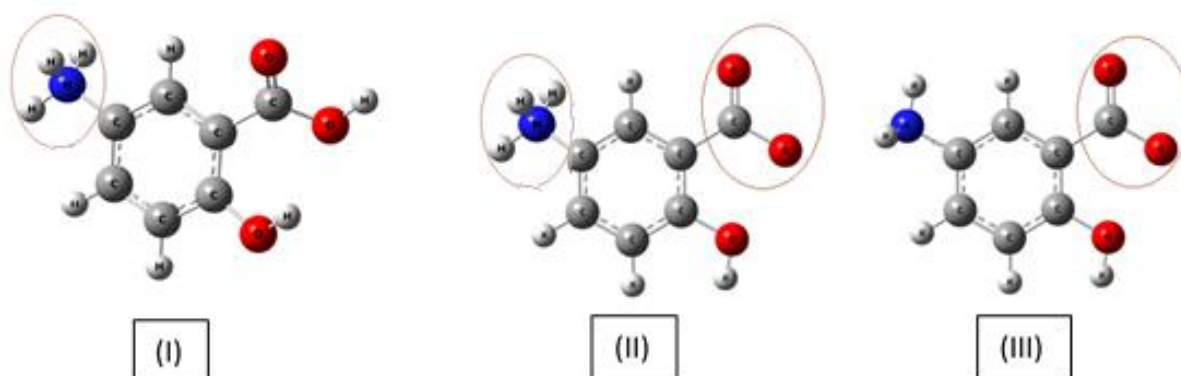
Figura 24: Porcentagem das diferentes espécies ionizadas da mesalazina em função do pH



Fonte: próprio autor

Em pH próximo de 1, foi observado a predominância da espécie C que possui o grupamento amina ionizado, tornando-a catiônica. (Figura 25-I). Em pH acima de 6, a espécie predominante é a B, em que o grupo carboxílico está ionizado, tornando a molécula aniônica (Figura 25-III), já em pH entre 2 e 6, a espécie predominante foi a D, com característica zwitteriônica, por possuir tanto o grupo amina quanto o grupo carboxílico, ionizados (Figura 25-II).

Figura 25: Configuração geométrica das espécies ionizáveis predominantes da mesalazina:
(I) Espécie catiônica; (II) Espécie zwitteriônica; (III) Espécie aniônica



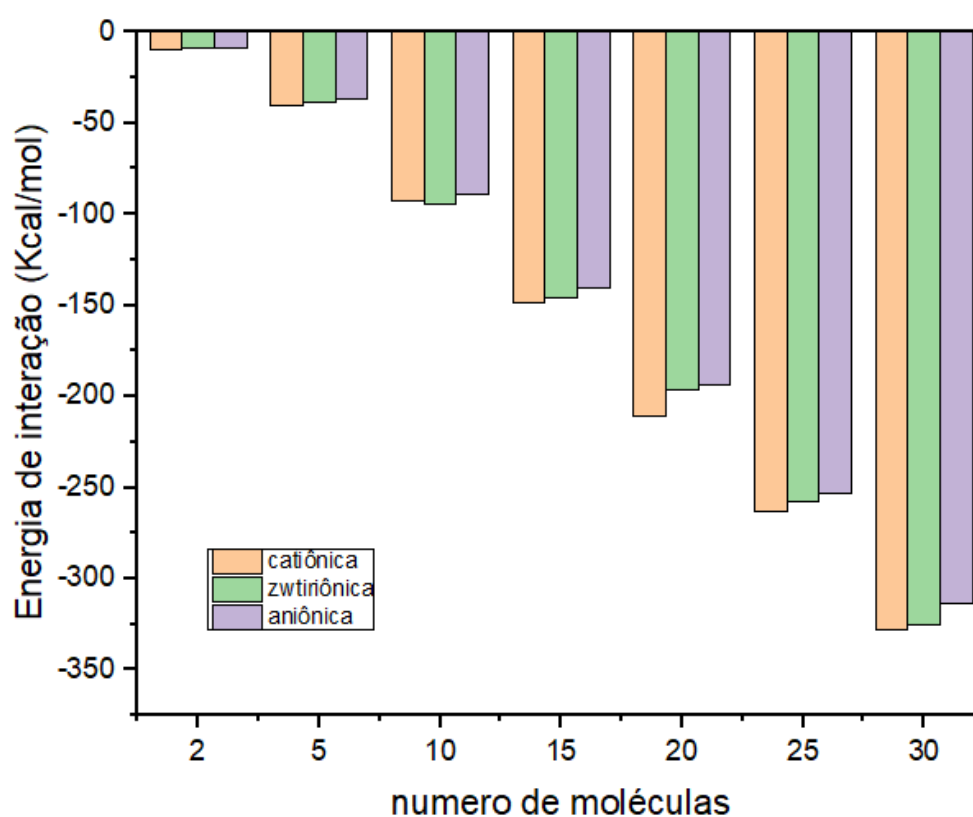
Fonte: Próprio autor

Para a obtenção de partículas de compostos ionizáveis pelo método de precipitação química é necessário conhecer seu comportamento de precipitação em função do pH. Com os resultados teóricos do comportamento de precipitação da mesalazina, foram selecionados 3 valores de pH para continuar os estudos, sendo eles 1,5; 4,0 e 6,0. Tais valores foram selecionados com base em alguns fatores, como a biorrelevância para a administração oral de fármacos e a porcentagem das espécies formadas nos valores de pH citados, sendo que em pH 1,5 observou-se que aproximadamente 80% das espécies se apresentam na forma catiônica, em pH 4, mais de 95% das espécies se apresentam na forma zwitteriônica e em pH 6,0, mais de 50% das espécies estão na forma aniônica. Em valores de pH inferiores a 1,5 e superiores a 6,0, há o aumento da solubilidade do fármaco, como descrito por (SOUZA, 2012).

A modelagem molecular foi utilizada também para entender a energia de interação entre as moléculas do mesmo estado iônico (Figura 20 e tabela), assim como o volume e área ocupados por elas, parâmetros importantes e cientificamente relevantes para o processo de nanoprecipitação (Tabela 3).

O estudo da energia de interação de sistemas químicos auxilia no entendimento da energia da interação entre compostos. Assim, quanto maior o valor em módulo, maior é a energia de interação, maior será a interação, indicando o estado de mínima energia. Neste sentido, quanto maior a energia, mais estável é o complexo formado (VALENTE et al., 2017).

Figura 26: Energia de interação das moléculas de mesalazina em diferentes estados iônicos: catiônico; zwitteriônico e aniônico.



Fonte: próprio autor

Tabela 9: Energia de interação das moléculas de Mesalazina em diferentes estados iônicos: catiônico; zwitteriônico e aniônico

Número de moléculas de mesalazina	Energia de interação (Kcal/mol)		
	Catiônica (pH1,5)	Zwiteriônica (pH4,0)	Aniônica (pH6,0)
2	-9,35471355	-9,221852	-8,72827797
5	-40,30288811	-38,42036811	-37,01995728
10	-92,75073251	-94,30789488	-88,72412734
15	-148,2252348	-145,5402476	-140,7533108
20	-210,8822863	-196,5034802	-193,9853528
25	-263,201834	-257,716868	-253,488863
30	-327,9100716	-325,5241806	-313,9200094

Fonte: próprio autor

Na Figura 26, podemos verificar que partículas formadas por moléculas catiônicas tiveram uma maior energia de interação, em relação as demais formas iônicas, independentemente do número de moléculas associadas, determinando assim que estas partículas formam complexos mais estáveis que as outras formas. As moléculas aniônicas por sua vez apresentaram uma menor energia de interação, principalmente a partir da adição da 15ª molécula, em que a diferença para as demais formas ionizáveis se acentua, podendo indicar um complexo menos estável.

O aumento da quantidade de moléculas elevou, em modulo, os valores de energia de interação, o que sugere a formação de complexos mais estáveis, indicando que o evento de precipitação é favorecido, porém, é necessário que seja controlado. O volume e a área ocupada pelos complexos formados nestas três condições são diferentes (Tabela 10). Comparando os complexos formados por 20 moléculas, a forma aniônica, obtida em pH6,0, ocupa um volume (3163,85) e área superficial (1766,48) menores que os complexos catiônicos formados por 20

moléculas em pH1,5 (3300,18 de volume e 1850,17 de área). Com isso quando há o aumento do número de moléculas presente, a partícula obtida em pH6,0 apresenta uma estrutura mais compacta, com valores de volume e área superficial menores que as demais formas, sendo uma característica favorável para a escolha desta condição de obtenção das nanopartículas.

Tabela 10: Volume e área superficial dos clusters de Mesalazina formados nos diferentes estados iônicos (catiônico; zwitteriônica e aniônico) em relação a quantidade de moléculas adicionadas.

mesalazina número moléculas	volume do clusters (Å ³)			Área superficial do cluster (Å ²)		
	Catiônica (pH1,5)	Zwitteriônica (pH4,0)	Aniônica (pH6,0)	Catiônica (pH1,5)	Zwitteriônica (pH4,0)	Aniônica (pH6,0)
2	297.56	291.05	286,14	268,26	259,12	257,09
15	2456.99	2417,00	2347,77	1404,54	1348,82	1389,75
18	2963.43	2890.42	2872,43	1667,65	1594,71	1553,19
20	3300.18	3219.04	3163,85	1850,17	1827,18	1766,48
22	3654.87	3576.35	3495,37	1995,08	1896,45	1906,65
24	4002.79	3878.67	3863,15	2191,81	2121,81	2027,5
28	4659.5	4559.63	4494,84	2511,73	2427,85	2236,77
30	5008.32	4889.54	4816,85	2666,82	2463,6	2457,61

Fonte: próprio autor

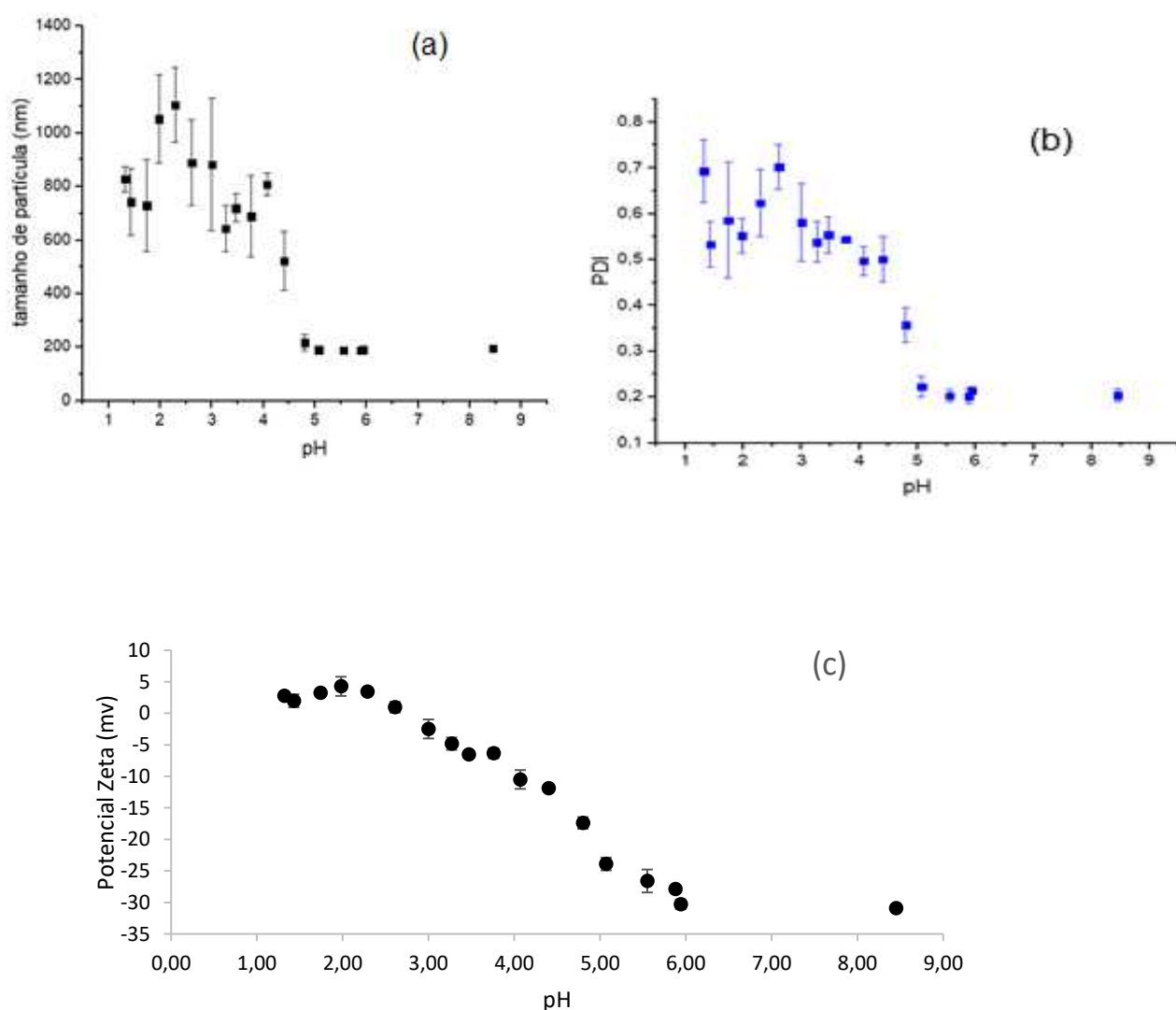
5.3 Abordagem experimental do efeito do pH no comportamento de precipitação da mesalazina

A formação de partículas contendo fármacos ionizáveis em meio aquoso depende da associação de espécies ionizadas através de interações intermoleculares, principalmente eletrostáticas (DOS SANTOS et al., 2017; FERREIRA et al., 2020). Alguns parâmetros devem ser controlados como concentração, massa molar, pH do meio dispersante, distribuição e densidade de carga, tempo e temperatura de agitação (LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009).

Nesta etapa do estudo, o objetivo foi avaliar o efeito do pH no comportamento de precipitação da mesalazina pelos valores de tamanho, PDI e potencial zeta das

partículas. Assim, baseados nos resultados de modelagem molecular, foi realizada a titulação da mesalazina no intervalo de pH de 1,3 a 9,0. Em valores de pH entre 1,3 e 4,0 a variação do tamanho (634,1 a 1184nm) e PDI (0,49 a 0,73) foi significativa. Entretanto, nas partículas obtidas em pH acima de 5,0 o tamanho variou de 198,13nm a 194,6nm e o PDI ficou em torno de 0,2. Estes dados mostram que existe uma forte dependência entre o tamanho e PDI das partículas obtidas e o pH do meio (Figura 27 a e b).

Figura 27: Efeito do pH no tamanho (a), PDI (b) e potencial zeta (c) das partículas de mesalazina



Os valores de potencial zeta variaram de +1,89mV a + 4,28mV no intervalo de pH entre 1,3 e 2,29, devido a predominância de espécies catiônicas, em que o grupamento amino está protonado. Em valores de pH acima de 4,8, ocorre a prevalência de espécies aniônicas, com valores de PZ variando entre -17,4mV e -30,9mV devido a ionização do grupamento carboxílico, tornando essas espécies mais interessantes por possuírem um valor de PZ mais próximo do valor ideal para a estabilização eletrostática. As partículas obtidas entre a faixa de pH 3,0 e 4,4, encontram-se na forma zwitterionica, ponto isoelétrico, com a ionização tanto do grupamento amino, quanto do carboxílico. Nesta faixa de pH, os valores de PZ encontrados variam de -2,48mV a - 11,9mV.

5.4 Desenvolvimento de nanossuspensão de Mesalazina por button up em diferentes valores de pH

Estudar o comportamento de precipitação da MSL em diferentes valores de pH, é importante para a seleção da metodologia de obtenção mais adequada e para compreensão do seu comportamento ao longo do TGI, quando este é administrado via oral.

Com os resultados do estudo teórico e experimental, e considerando os valores biorrelevantes reportados em literatura para esta via de administração e para o direcionamento do fármaco ao cólon, foram selecionados os valores de pH de 1,5, 4,0 e 6,0 para a obtenção das nanossuspensões de MSL pelo método de precipitação ácido/base.

As formulações que foram denominadas de F₁; F₂ e F₃, conforme a composição qualitativa e quantitativa de cada formulação estão descritas no item 4.2.3, tabela 2.

5.4.1 Caracterização físico-química das nanossuspensões

5.4.1.1 Análise de tamanho, PDI e potencial zeta

Estas formulações foram obtidas e, em seguida, foram analisadas em triplicata, quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela na Tabela 11.

Tabela 11: Tamanho médio, PDI e potencial zeta das nanopartículas de Mesalazina obtidas nos valores de pH de 1,5 (F₁), 4,0 (F₂) e 6,0 (F₃).

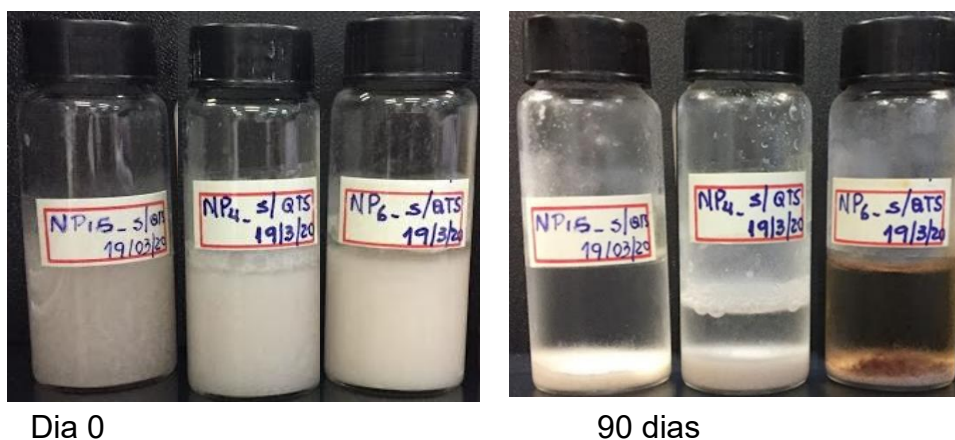
Amostras	Tamanho de partícula (nm) $\pm$ s.d.	PDI $\pm$ s.d.	Potencial zeta (mV) $\pm$ s.d.
F ₁	936,7 $\pm$ 20,25	0,588 $\pm$ 0,066	+8,5 $\pm$ 0,2
F ₂	556,2 $\pm$ 10,41	0,478 $\pm$ 0,078	-22,3 $\pm$ 1,4
F ₃	145,9 $\pm$ 41,64	0,497 $\pm$ 0,125	-31,6 $\pm$ 0,9

O tamanho das partículas da formulação F₃ mostrou ser menor que as partículas obtidas nas demais formulações, comprovando os dados do estudo da titulação e da análise computacional, em que as partículas obtidas em pH mais elevado, com comportamento aniônico apresentaram valores de volume e área menores que as partículas zwitteriônicas e catiônicas respectivamente e que o PZ das partículas formadas na F₃, favoreceu a formação de um sistema mais estável do ponto de vista eletrostático.

5.4.1.2 Análise visual da estabilidade das nanopartículas

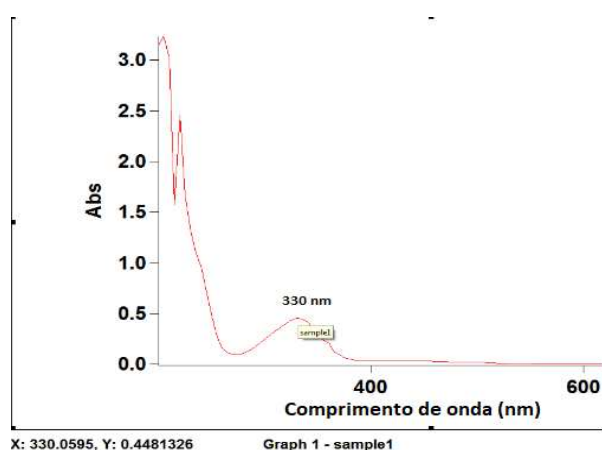
As formulações F₁, F₂ e F₃ foram preparadas e analisadas no dia 0 e colocadas em geladeira. Após 3 meses foram avaliadas novamente (Figura 28).

Figura 28: Aspecto das formulações de nanopartículas de mesalazina após estabilidade de 03 meses



As formulações F₁ e F₂ mantiveram as características de cor do momento do preparo, porém a formulação F₃, alterou a coloração de rosa claro para castanho, indicando ser mais instável fisicamente, uma vez que a amostra F₃ foi analisada em espectrofotômetro UV-VIS e não apresentou deslocamento no pico de absorção, conforme demonstrado na Figura 29, indicando que não houve a formação de um novo composto ou a degradação química.

Figura 29: Análise espectrofotométrica da formulação F3 após 90 dias de estabilidade



5.4.1.3 Determinação do percentual de partículas precipitadas

A porcentagem de precipitação das nanopartículas nos valores de pH 1,5, 4,0 e 6,0 foi avaliada de forma indireta e está demonstrada na Tabela 12. Os resultados mostraram que em pH 1,5 (F_1) ocorre uma precipitação de 51,6% do fármaco solubilizado. Com o aumento do pH para 4,0 (F_2), a precipitação das partículas ocorre de forma mais intensa, atingindo 95,1%. Em pH 6,0 (F_3), a precipitação atinge o valor intermediário de 75,5%.

Tabela 12: Porcentagem de MSL precipitada em diferentes valores de pH.

Amostra	Concentração inicial da amostra (mg/ml)	Concentração de fármaco no sobrenadante (mg/ml)	% de mesalazina dissolvida	% de mesalazina precipitada
F_1 (pH1,5)	12,5	6,05	48.4	51.6
F_2 (pH4,0)	11,44	0,56	4.9	95.1
F_3 (pH6,0)	11,00	2,70	24.5	75.5

5.4.1.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)

A técnica de DSC tem sido bastante utilizada para obter dados sobre eventos térmicos de materiais como, fusão, cristalização, transição vítrea, e reações de decomposição. Esta técnica baseia-se na medida entre o fluxo de calor da amostra e uma matéria de referência termicamente inerte.

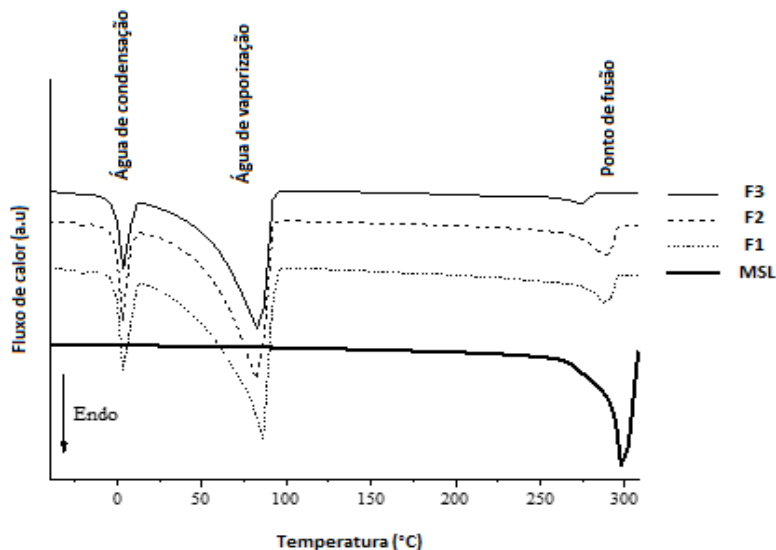
A análise por DSC fornece indicações importantes para avaliações associadas à incompatibilidade e estabilidade físico-química de fármacos em um curto período de análise (CHADHA; BHANDARI, 2014). A análise DSC do fármaco exibiu um termograma característico da mesalazina que compreende um pico

endotérmico acentuado em torno de 290°C, relacionado ao seu ponto de fusão (Figura 24) (MLADENOVSKA et al., 2007b).

Por outro lado, as curvas de DSC de todos os sistemas a diferentes valores de pH são semelhantes com variações de temperatura e entalpia (Tabela 13). Além disso, eventos endotérmicos adicionais exibidos em F₁, F₂ e F₃ podem ser atribuídos à água presente na amostra. Os primeiros eventos ocorridos próximos a 0°C foram ligados à água de condensação. As amostras tendem a perder água livre, demonstrada por um pico de cristalização acentuado em torno de 0°C devido ao efeito de super resfriamento, conforme demonstrado na figura 30 (FERREIRA et al. 2016).

Um segundo evento é observado em torno de 100°C e pode estar associado à água de vaporização, que inclui a perda de água livre e total. Portanto, usando os resultados do DSC é possível calcular o teor de água em cada amostra, a entalpia de vaporização normalizada, a percentagem de água livre e total e o ΔH ajustado para a ocorrência do ponto de fusão

Figura 30: Curva de DSC do fármaco MSL e das formulações F₁, F₂ e F₃



A análise dos parâmetros extraídos da Tabela 7, demonstrou que a mesalazina exigiu uma energia maior ($\Delta H = -809,29 \text{ J.g}^{-1}$) para a ocorrência do ponto de fusão em comparação com a F₁ ($\Delta H = -252,25 \text{ J.g}^{-1}$); F₂ ($\Delta H = -252,25 \text{ J.g}^{-1}$) e F₃ ($\Delta H = -234,70 \text{ J.g}^{-1}$). O estado sólido da mesalazina fornece um arranjo cristalino ordenado que justifica a energia necessária e a temperatura de início do evento. Entre todos os estados químicos analisados, a fusão ocorre primeiro em F₃ ($255,46^\circ\text{C}$, $\Delta H = -43,241 \text{ J.g}^{-1}$), em que há a predominância de forma aniônica. A amostra F₁ com predominância da forma catiónica exibiram $\Delta H = 102,71 \text{ J.g}^{-1}$ ($279,61^\circ\text{C}$). Tal comportamento pode estar relacionado ao fato dessas espécies químicas apresentarem uma menor percentagem de estrutura cristalina respectivamente (18,42% e 40,71%) em relação à forma zwitteriônica (F₂) que apresentou $\Delta H = -172,20 \text{ J.g}^{-1}$. Além da alta cristalinidade da forma zwitteriônica (68,26%), podem ocorrer associações intra e intermoleculares, o que deve resultar em uma maior energia requerida.

Tabela 13: Parâmetros do DSC da Mesalazina, F₁, F₂ e F₃

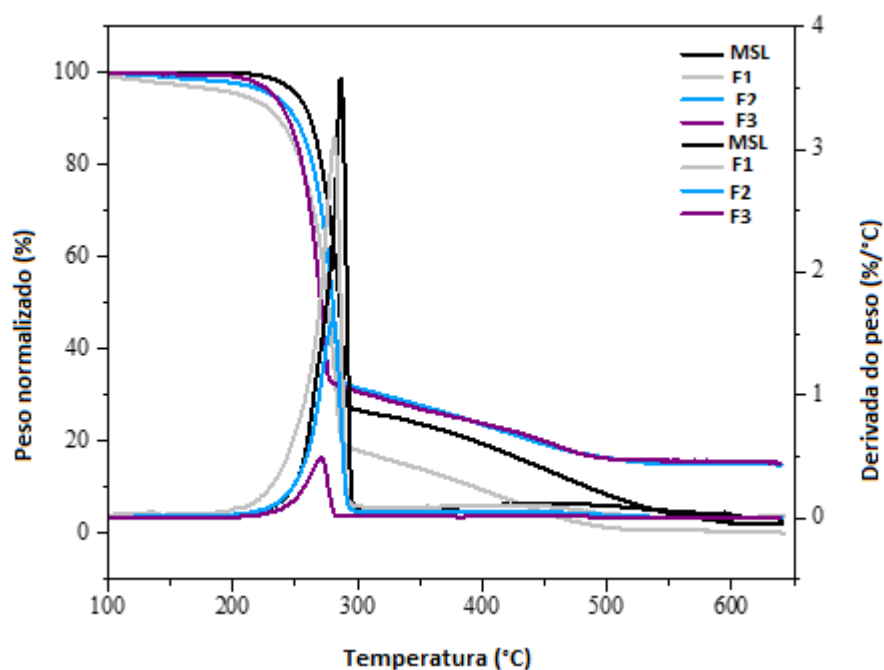
	Água de vaporização				Ponto de fusão da mesalazina				
	Entalpia calculada (J.g ⁻¹)	Entalpia normalizada (J.g ⁻¹)	Valor inicial (°C)	Massa (%)	Entalpia calculada (J.g ⁻¹)	Entalpia normalizada (J.g ⁻¹)	Valor inicial (°C)	Valor do pico (°C)	Cristalinidade do fármaco (%)
MSL	n/d	n/d	n/d	n/d	809.29	809.29	293.05	299.34	100
F ₁	229.58	222.77	-0.91	1.95	252.25	102.71	279.61	289.70	40.71
F ₂	229.58	209.58	-0.90	6,02	252.25	172.20	267.79	290.11	68.26
F ₃	236.81	212.32	-0.97	8.72	234.70	43.241	255.46	275.41	18.42

** n/d – água não detectada

A energia calculada para fornecer as aglomerações moleculares a F₃ (prevalência aniônica) foi menor do que nas outras espécies resultando em sistemas nanométricos e, exatamente este estado, também deve ser o primeiro a atingir o ponto de fusão.

A Figura 31 mostra os resultados da termogravimetria derivada (DTG) e perda de peso em função da temperatura. Todas as amostras apresentaram transição térmica associada à temperatura de fusão da mesalazina, porém com intensidades diferentes. Como as amostras em diferentes valores de pH foram preparadas em meio aquoso, a perda de massa não foi calculada desde o início, uma vez que a porcentagem de água no sistema pode ser variada. Por esse motivo, a perda de peso foi normalizada para 100°C para considerar os eventos associados apenas à degradação da mesalazina. De acordo com a Figura 25, é possível notar que a amostra F₁ inicia primeiro o processo de degradação. Por outro lado, a amostra F₂ que se apresenta na forma zwitteriônica exibiu um perfil de degradação semelhante a mesalazina.

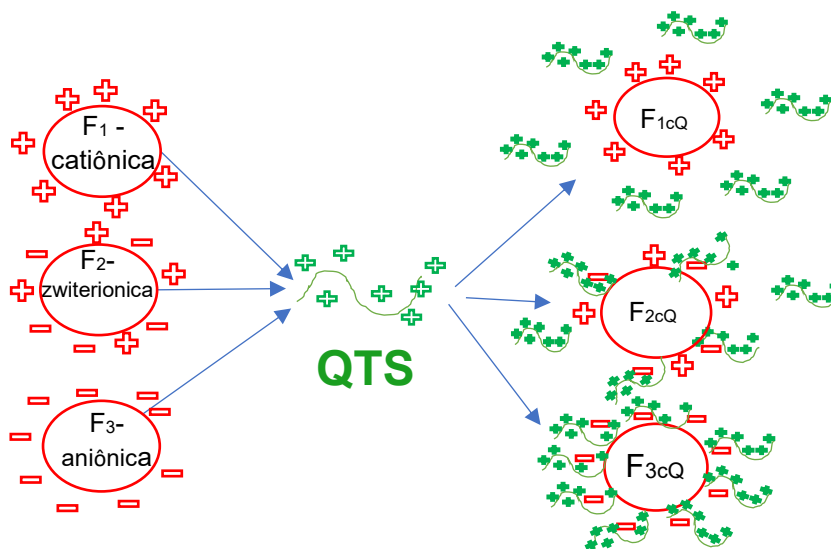
Figura 31: Curva de Termogravimétrica (DTG) de perda de massa versus temperatura da Mesalazina, F₁, F₂ e F₃



5.4.2 Revestimento das nanopartículas de mesalazina com quitosana

Biopolímeros são utilizados em sistemas de liberação de fármacos para modular o padrão de liberação. Estudos mostram que o revestimento de nanopartículas com quitosana prolonga a permanência do sistema no TGI, por melhorar as propriedades mucoadesivas (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; LI et al., 2016).

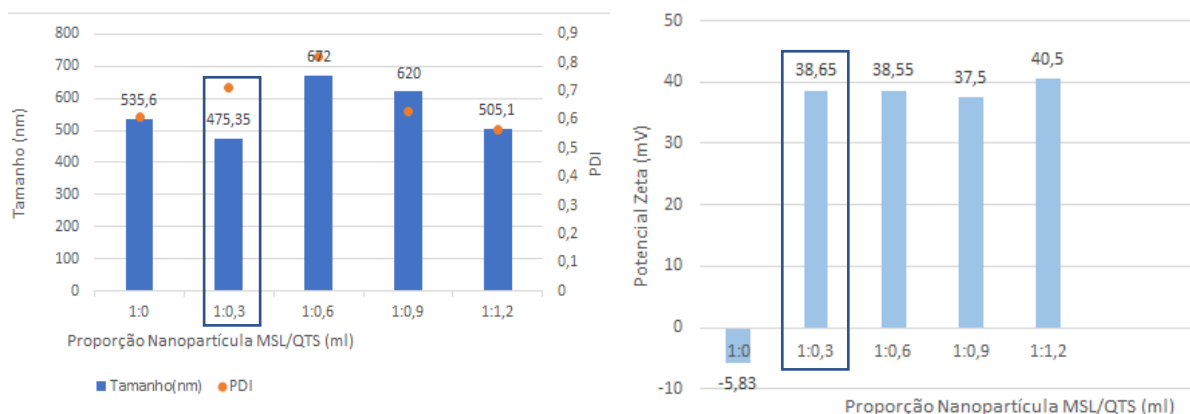
Figura 32: Esquema representativo da interação das nanopartículas F₁, F₂ e F₃ com quitosana



O revestimento das nanopartículas F₁, mostrou distribuição de tamanho e PDI muito ampla, podendo estar relacionado com o fato dessas partículas possuírem carga superficial positiva, assim como a quitosana, não favorecendo a interação entre elas Figura 32. Com isso não foi dado prosseguimento ao estudo da concentração de quitosana necessária para revestir tais nanopartículas.

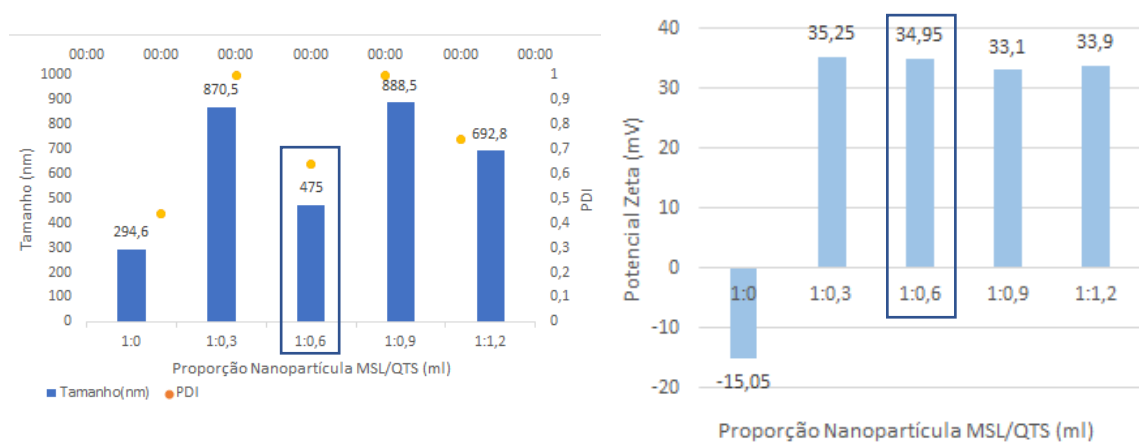
Nas nanopartículas F₂ e F₃ foi analisado a quantidade de quitosana necessária para que ocorra o revestimento das partículas pelo estudo 1, onde a quitosana foi incorporada nas nanopartículas já formadas. Diferentes concentrações de quitosana foram utilizadas e o tamanho, PDI e potencial zeta foram analisados e os resultados estão demonstrados nas figuras 33 (A) e (B) para F₂ e figura 34 (A) e (B) para F₃.

Figura33: Avaliação das características de tamanho e PDI (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas de mesalazina F2 revestidas com diferentes proporções de quitosana.



Na F₂, já com a menor proporção de quitosana (1:0,3) foi suficiente para o revestimento das partículas pois ocorre um aumento significativo no valor de potencial zeta, chegando a 38,65mV e uma redução no tamanho de partículas de 535,6nm para 475,35nm. Na proporção de 1:0,6 e 1:0,9, observou-se um aumento de tamanho de partícula de 535,6nm para 672nm, com a manutenção do potencial zeta acima de 30mV, o que significa um sistema estável. Esse comportamento pode estar relacionado à associação de mais moléculas de quitosana na superfície da partícula. Na proporção de 1:1,2, observa-se uma redução no tamanho das partículas, provavelmente como consequência da repulsão eletrostática das quitosana livre no meio com a quitosana do revestimento da partícula., o que resulta em uma compactação da camada de quitosana, influenciando no tamanho da partícula. Na proporção de 1:0,3, observou-se o menor tamanho de partícula (475,35nm) e um potencial zeta de +38,65, o que levou a escolha deste no prosseguimento do estudo, pois utiliza menos material de revestimento.

Figura34: Avaliação das características de tamanho e PDI (A) e potencial zeta (B) das nanopartículas de mesalazina F₃ revestidas com diferentes proporções de quitosana.

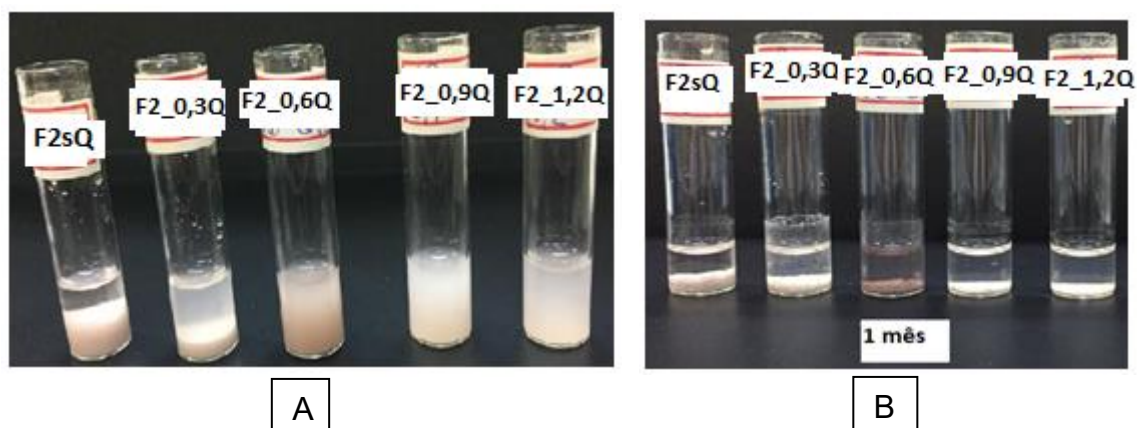


A proporção indicada de quitosana para revestir as NP F₃, foi 1: 0,6 (NP:QTS). Nesta proporção há indícios de que a quitosana interagiu com as partículas de uma forma mais organizada, tornando-as menor (475nm) que as outras proporções utilizadas que variaram de 692,8nm a 888,5nm. Quanto à carga superficial das partículas, todas as proporções testadas apresentaram valor de potencial zeta superior a 33mV, sendo que na proporção de 1:0,6, o valor de potencial zeta foi de 34,95mV, indicando um sistema estável (Figura 28).

A proporção maior de quitosana para revestir as NP F₃ se deve ao fato dessas nanopartículas possuírem mais grupamentos carboxílicos ionizados do que as NPF₂.

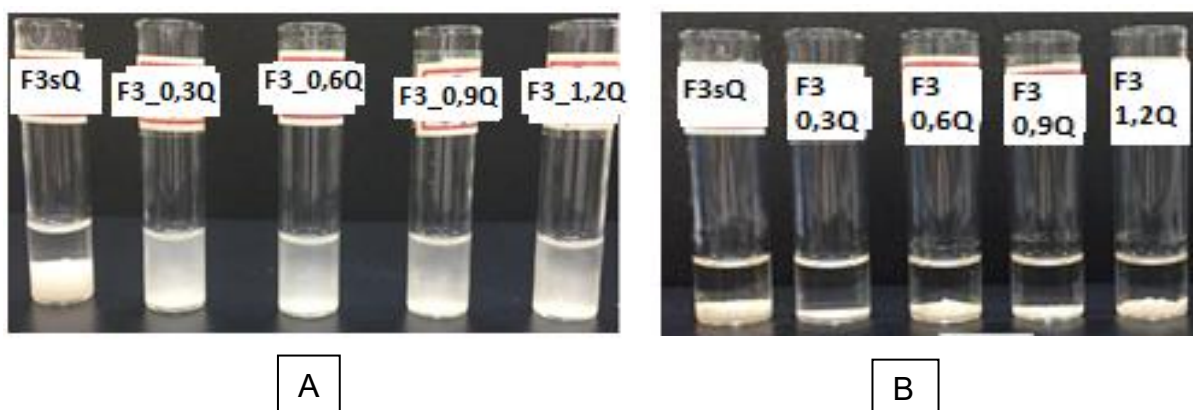
A estabilidade das nanopartículas revestidas com diferentes proporções de quitosana, também foi avaliada em relação a aparência das formulações, no dia do preparo e após 30 dias. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 35 e 36.

Figura 35: Aparência da formulação F₂ no dia do preparo (A) e após 30 dias(B), com diferentes proporções de quitosana



A formulação F₂, mostrou um escurecimento de algumas amostras, principalmente a amostra 1:0,6. A quitosana pode ser utilizada para estabilizar a nanossuspensão, porém em proporções inferiores a 1:0,6, houve uma precipitação logo após o preparo, indicando que a quantidade de estabilizante não foi suficiente.

Figura 36: Aparência da formulação F₃ no dia do preparo (A) e após 30 dias(B), com diferentes proporções de quitosana



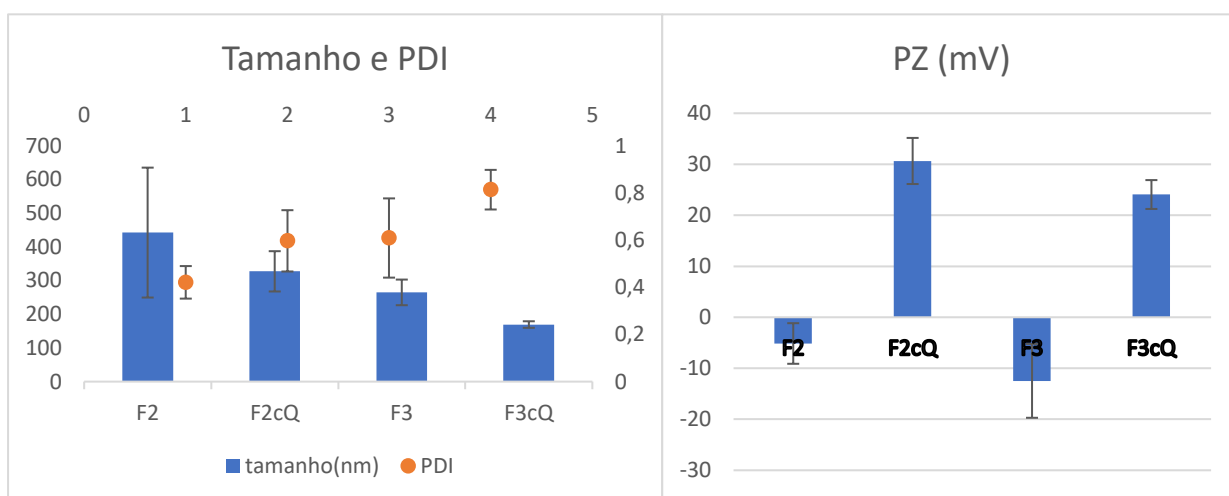
A formulação F₃ se mostrou estável fisicamente em todas as proporções testadas. A função do estabilizante fica evidente, uma vez que a formulação sem quitosana, apresentou sedimentação do sistema logo após o preparo.

Tanto a F₂ quanto a F₃ com quitosana, após 30 dias em estabilidade apresentaram redispersão facilitada, com isso foram selecionadas as formulações F₂ com revestimento na proporção 1:0,3 e a F₃ com revestimento na proporção 1:0,6 para dar continuidade aos testes.

Em outra forma de revestimento testada, foi feito a incorporação da quitosana durante o processo de preparação da nanopartícula. Para este método

A avaliação das características de tamanho, PDI e potencial zeta dessas nanopartículas com e sem quitosana (F₂; F₂cQ; F₃; F₃cQ), está demonstrada nas figuras 37.

Figura 37: Avaliação das características de tamanho e PDI e potencial zeta das nanopartículas de mesalazina F₂; F₂cQ; F₃ e F₃cQ revestidas com diferentes proporções de quitosana

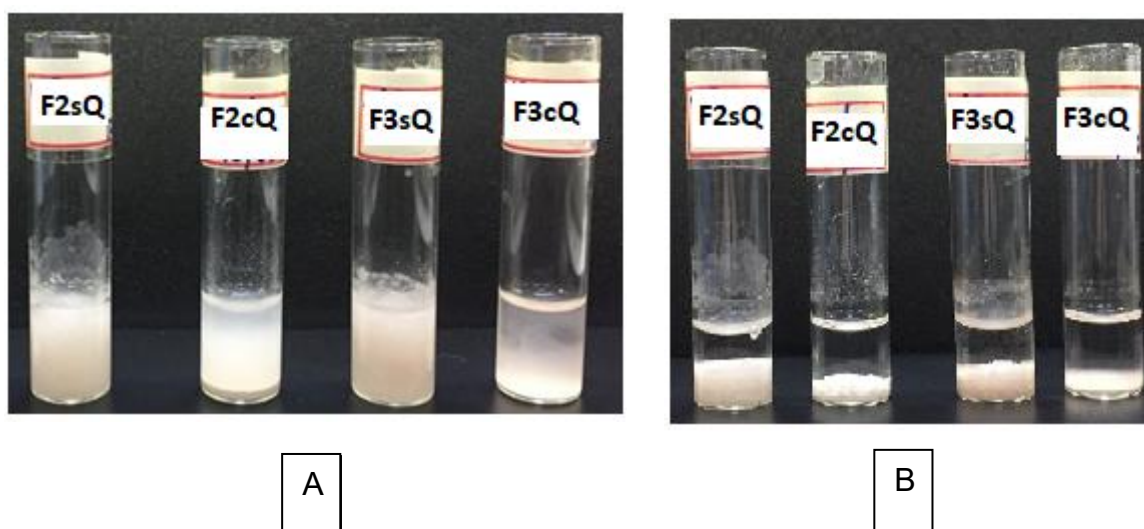


Analisando os dados de tamanho de partículas e PDI das formulações testadas pode-se observar uma variação significativa de tamanho (169,37nm a 442,4nm) e de PDI (0,421 a 0,814) com um desvio padrão elevado em todas as formulações (Tabela 14).

Tabela 14: Tamanho e PDI das nanopartículas F₂, F_{2cQ}, F₃ e F_{3cQ}

Amostra	Tamanho (nm) ($\pm$ DP)	PDI ($\pm$ DP)
F ₂	442,4 (192,83)	0,421 (0,069)
F _{2cQ}	327,4 (59,83)	0,597 (0,13)
F ₃	264,87 (38,05)	0,609 (0,168)
F _{3cQ}	169,37 (9,74)	0,814 (0,084)

A estabilidade das nanopartículas revestidas obtidas pelo estudo 2, em que a dispersão de quitosana foi incorporada na obtenção das nanopartículas segundo item 4.2.6, foi avaliada no dia do preparo e após 30 dias armazenada em geladeira, sendo que não houve alteração como observado na figura 38

Figura 38: Aparência da formulação F₂; F_{2cQ}; F₃ e F_{3cQ} no dia do preparo (A) e após 30 dias(B).

RIBEIRO e colaboradores (2018) discutiram a importância da medida de tamanho e PDI de sistemas heterogêneos para o acompanhamento da estabilidade dos sistemas de liberação de fármacos, que geralmente são medidos pela técnica

de DLS, que utiliza a intensidade do espalhamento de luz por partículas esféricas, o que impede sua aplicação para sistemas coloidais altamente polidispersos e não esféricos. Várias outras técnicas de rastreamento de partículas utilizam o princípio do movimento browniano. Dentre elas podemos citar além do DLS, a análise de difração a laser, e a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).

Para um melhor entendimento dos resultados, foi feito um estudo comparativo entre as técnicas de DLS e NTA, das nanopartículas F₂sQ; F₂cQ; F₃sQ e F₃cQ e os resultados estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Estudo comparativo da avaliação em termos de tamanho e PDI (DLS) e tamanho, e concentração (NTA) das nanopartículas de mesalazina revestidas e não revestidas com quitosana.

amostra	DLS		NTA			
	TAMANHO (nm) (±DP)	PDI (± DP)	MÉDIA	MODA	SPAN	CONC.
F ₂	442,4 (192,83)	0,421 (0,069)	162,6	170,5	0,8566	4.71e+08
F ₂ cQ	327,4 (59,83)	0,597 (0,13)	219,8	124,9	1,3317	2.42e+09
F ₂ 03Q	7130 (1115,6)	0,4805 (0,1355)	234.3	161.4	1,1632	2.27e+09
F ₃	264,87 (38,05)	0,609 (0,168)	220.8	157,7	0,8325	2.52e+08
F ₃ cQ	169,37 (9,74)	0,814 (0,084)	278.6	204.5	0,7596	3.26e+09
F ₃ 06Q	1405,5 (801,55)	0,9615 (0,0665)	266.0	231.6	0,7973	1.40e+09

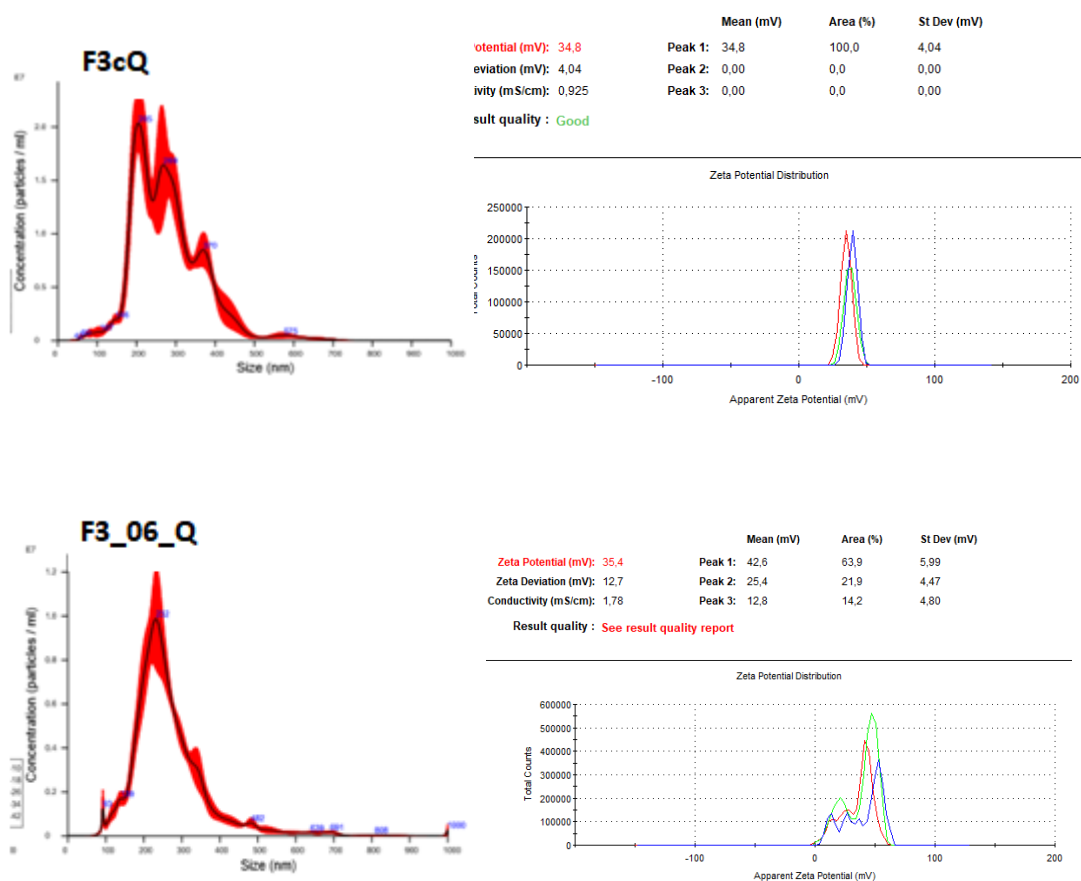
Com os dados encontrados, a formulação F₃cQ foi selecionada por apresentar um tamanho médio satisfatório, com o menor valor de span, para continuar os estudos.

Correlacionando o tamanho de partícula obtida pela técnica de NTA e a análise de potencial zeta obtida pela técnica de DLS (Figura 39), podemos observar que apesar da formulação F_{3_06_Q} apresentar um tamanho de partícula mais

homogêneo, as partículas apresentam uma variação grande no valor de potencial zeta, indicando que pode haver partículas não revestidas ou revestidas ineficientemente.

Entretanto a formulação F_{3cQ}, apresenta um tamanho de partícula menos homogênea, porém exibe um único pico de potencial zeta, sugerindo que as partículas foram revestidas com eficiência.

Figura 39: Estudo de correlação entre o tamanho (NTA) e o potencial zeta (DLS) das nanopartículas F_{3cQ} e F_{3_0,6_Q}, respectivamente



5.4.3 Estudo da interação das NP F₃sQ e F₃cQ com a mucina

No estudo de interação das nanopartículas com a mucina foi explorada a técnica de adsorção, onde foi analisado o potencial zeta como forma indireta para avaliar a mucoadesão. Os resultados estão expostos na tabela 16 (DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020)

Tabela 16: Valores de pontecial zeta (mV) das nanopartículas de mesalazina com e sem revestimento de quitosana, antes e após interação com mucina, nos meios HCl 0,1N (pH=1,2) e Tampão fosfato (pH=6,8)

meio	Mucina (µg/ml)			F ₃	F _{3cQ}	F ₃			F _{3cQ}		
						Conc. Mucina (µg/ml)			Conc. Mucina (µg/ml)		
	100	200	300			100	200	300	100	200	300
HCl 0,1N	2,3	2,7	3	-14,6	26,8	0,205	-0,307	-0,443	16,53	13,37	18,47
TF pH=6,8	-16,5	-19	-27	-29,6	10,2	-6,56	-3,99	-4,27	3,75	-0,81	-1,29

O potencial zeta da mucina variou de aproximadamente 2,3mV a -27,0mV nos valores de pH 1,2 e 6,8 respectivamente.

As nanopartículas possuem um valor de PZ negativo (-14,6 e -29,6mV) para a F₃ e positivo (26,8 e 10,2mV) para as NP revestidas com quitosana, o que indica que as NP foram corretamente revestidas, uma vez que a carga da quitosana é positiva. Para a nanopartícula F₃ a interação com a mucina em pH1,2 em todas as concentrações testadas, resultou em mudança significativas no potencial zeta, alterando de um potencial zeta de -14,6 para a -0,44. Esse resultado demonstra que a mucina adsorveu à superfície das nanopartículas majoritariamente por ligações eletrostáticas. Em contato com a mucina em pH6,8 também observou-se variação significativa no potencial zeta das nanopartículas, varando de um PZ de -29,6 para -3,99mV. Apesar de tanto a mucina quanto a F₃ apresentarem densidade de carga

negativa, a redução do potencial zeta, indica que houve adsorção, neste caso governada por outros tipos de interação supramolecular.

A F_{3cQ} possui um potencial positivo de 26,8mV em pH 1,2 por estar revestida com a quitosana. Em contato com as dispersões de mucina em pH1,2 observou-se redução do potencial zeta da F_{3cQ} de 10,2 para valores entre 3,75 e -1,29mV, sendo que a maior interação ocorreu com a mucina na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$. Apesar das NP apresentarem cargas positivas, a variação do potencial zeta da F_{3cQ} quando colocada em contato com a mucina indica que houve adsorção com a mucina. Em valor de pH6,8, a mucina apresenta elevada densidade de carga negativa o que favoreceu a interação eletrostática com a nanopartícula revestidas com a quitosana. Ambas as nanopartículas apresentaram uma elevada capacidade de interação com a mucina, no entanto a F_3 mostrou ter uma maior afinidade para interagir com a mucina em pH que simula o meio gástrico e a F_{3cQ} uma maior afinidade por interagir com a mucina em pH que simula o meio entérico.

Considerando que as nanopartículas serão microencapsuladas e vetorizadas para a região do cólon, onde ocorrerá sua liberação, a elevada interação com a mucina em pH 6,8, apresentada pela F_{3cQ} , é vantajosa considerando que o sistema permanecerá no local de ação por um tempo prolongado resistindo à eliminação prematura.

5.5 Micropartículas

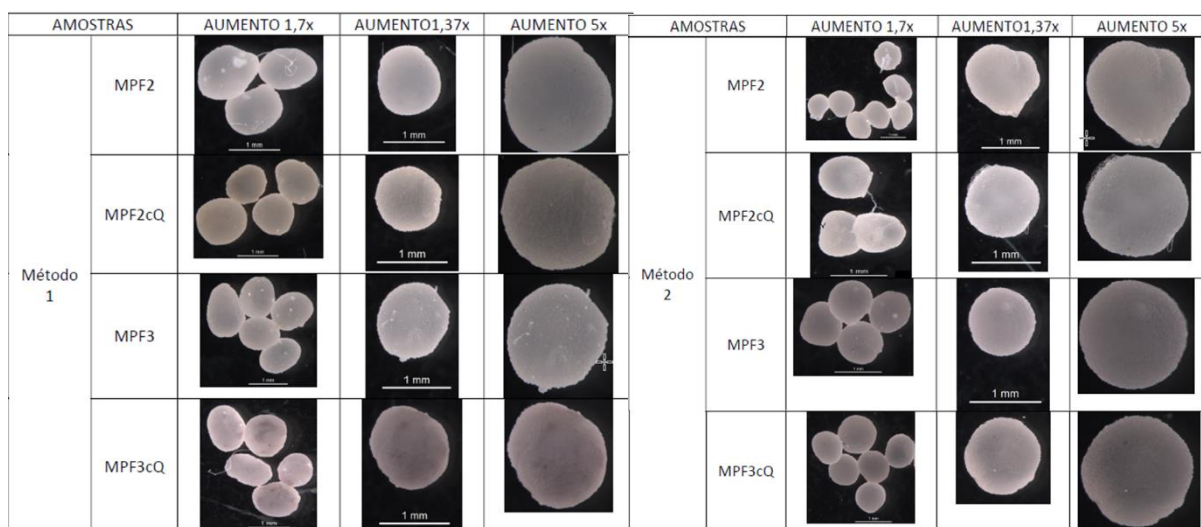
5.5.1 Obtenção das micropartículas

5.5.2 Caracterização das micropartículas

5.5.2.1 Análise Estereoscópica

As MP foram avaliadas de acordo com as características morfológicas e comparadas de acordo com o método 1 e 2 de obtenção (figura 40).

Figura 40: Fotomicrografias da MPvazia e das MP_{F2}, MP_{F2cQ}, MP_{F3} e MP_{F3cQ} obtidas pelos métodos 1 e 2.

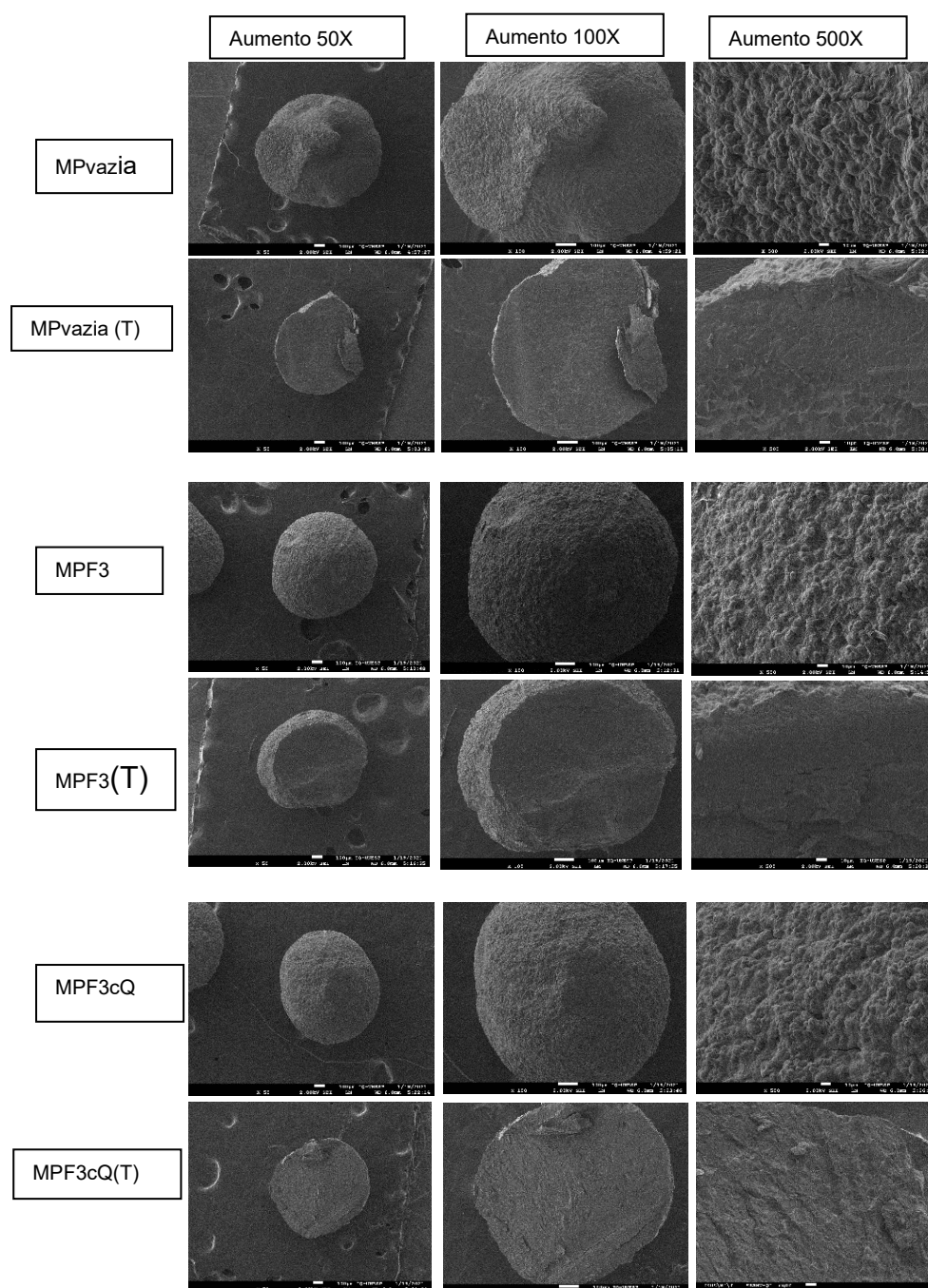


As micrografias mostram que o método de incorporação do fármaco nas MP pouco influenciam a circularidade das MPs quando comparados a MP_{vazia}, com excessão à MP_{F2} do método 2. Todas as MP formadas apresentam superfície rugosa.

5.5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

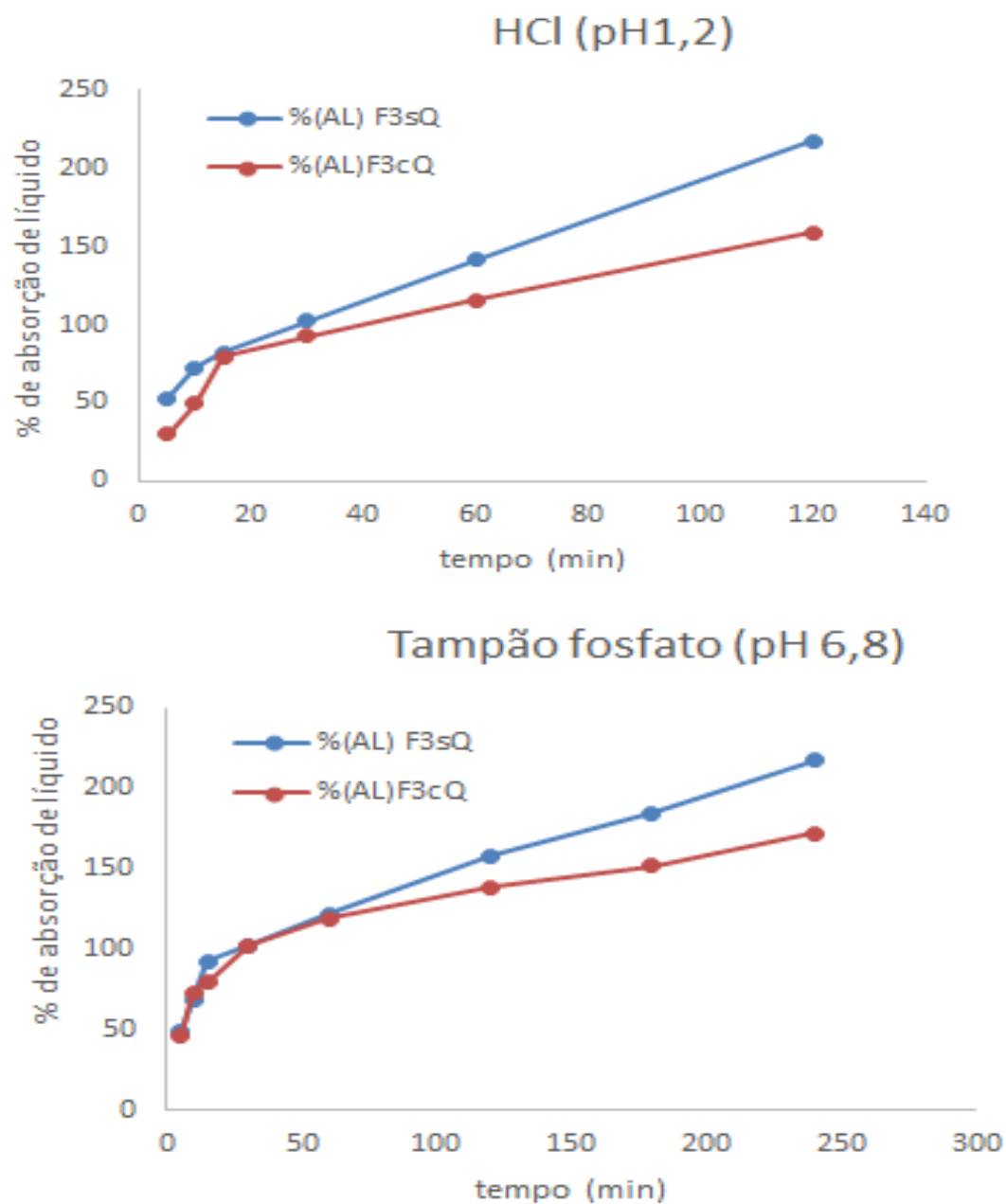
A superfície e a estrutura interna das micropartículas obtidas foram avaliadas e os resultados estão demonstrados na figura 41.

Figura 41: Fotomicrografias da MPvazia, MP_{F3} e MP_{F3cQ} inteiras e com cortes transversal (T) nos aumentos de 50, 100 e 500 vezes.



5.5.2.3 Determinação do perfil de absorção de líquidos

Figura 42: Perfil da absorção de líquido das MPF3 e MPF3cQ nos valores de pH 1,2 e 6,8

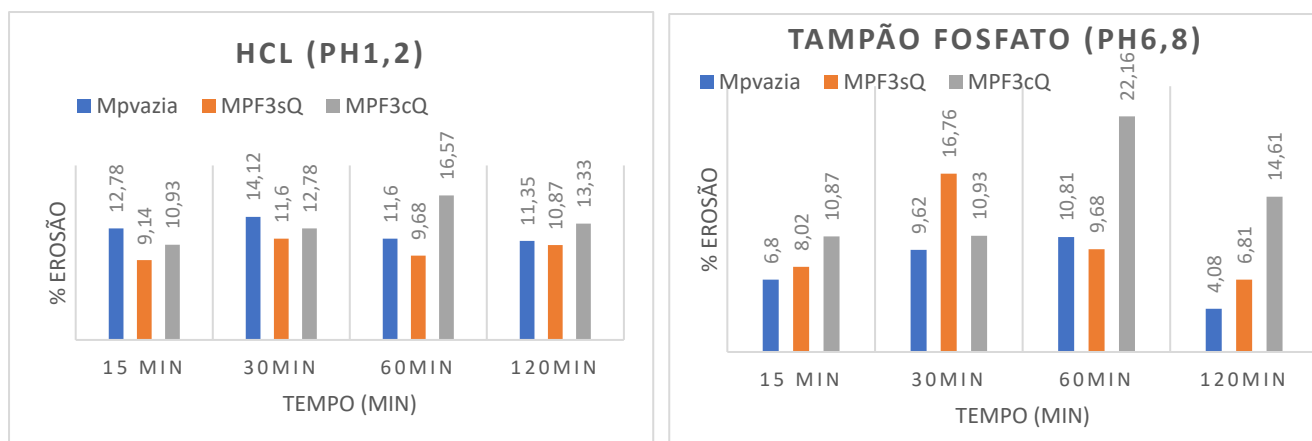


As micropartículas MPF₃ e MPF_{3cQ} foram avaliadas de acordo com a capacidade de absorção de líquido, utilizando os meios que simulavam o pH estomacal e intestinal de 1,2 e 6,8 respectivamente e os dados estão apresentados na Figura 42.

Nos tempos testados, as porcentagens de absorção de líquido foram crescentes nos dois meios, evidenciando a capacidade elevada de absorção de líquidos do sistema. Entre as partículas a MPF_{3cQ} absorveu menos meio nos dois valores de pH provavelmente pelo fato da matriz estar mais empacotada e compacta como discutido acima, a difusão de líquidos para o interior do sistema foi prejudicada.

5.5.2.4 Avaliação da erosão das MPs em diferentes meios de dissolução em função do tempo.

Figura 43: Porcentagem de erosão das MP nos diferentes meios de dissolução



A porcentagem de erosão das MP_{vazia} e MPF₃ e MPF_{3cQ} em meio ácido variou de 9,14% a 16,57% e em tampão fosfato de 4,08% a 22,16% (Figura 43).

Em HCl (pH1,2) a incorporação das nanopartículas na micropartícula não influenciou de forma significativa a porcentagem de erosão. Já em tampão fosfato (pH6,8) houve um aumento da porcentagem de erosão das MPF3 e MPF3cQ.

Considerando que a erosão pode influenciar no processo de liberação, essa maior porcentagem observada em TF pH6,8 deve favorecer a liberação das nanopartículas apenas na porção intestinal.

5.5.2.5 Ensaio de mucoadesão

O desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para liberação de fármacos, tem sido alvo de grande interesse nas últimas décadas. As vantagens da utilização destes sistemas para administração oral, vão de prolongar o tempo de residência no local de ação do fármaco, permitindo criar um contato mais próximo entre a forma farmacêutica e a membrana absorvente, reduzindo a degradação do fármaco no lúmen do TGI, o que permitiria um regime de administração em intervalos mais prolongados, aumentando a adesão à terapêutica e reduzindo os efeitos adversos (VARUM et al., 2008b; DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020).

Vários fatores que afetam a mucoadesão, podem estar relacionados com as propriedades dos polímeros, como peso molecular, hidrofiliicidade, carga superficial, concentração, conformação espacial da cadeia, e com o meio fisiológico em que se encontram, como pH, força iônica e espessura do muco. A mucoadesão é um processo complexo que envolve várias interações interfaciais simultâneas entre os polímeros e a superfície biológica, principalmente a mucina.

Alguns métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a mucoadesão de sistemas de liberação de fármacos na mucosa gastrointestinal. Um dos métodos é o baseado em sistemas de fluxo, utilizando como modelo mucosa intestinal de porco (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Tabela 18: Resultado da mucoadesão ex-vivo das micropartículas

Amostras	Quantidade de MP inicial	Quantidade de MP final	% de MP que ficaram aderidas
MP _{vazia}	10	10	100
MP _{F3}	10	10	100
MP _{F3cQ}	10	10	100

Foram testadas as micropartículas vazias (MP_v), as MP_{F3} e MP_{F3cQ}. Todas as micropartículas ficaram aderidas na mucosa ao longo de todo o teste, conforme tabela 18, demonstrando a elevada capacidade mucoadesiva dos sistemas desenvolvidos.

5.6 Estudo de dissolução da MSL

5.6.1 Estudo da solubilidade da MSL

A solubilidade da MSL foi determinada em vários meios: água purificada, HCL 0,1N (pH=1,2), tampão fosfato (pH6,8) e tampão fosfato (pH7,4) . A solubilidade do fármaco deve ser avaliada nos meios selecionados para o teste de dissolução, pois deve-se trabalhar dentro das condições sink, no qual uma quantidade excessiva de fármaco é adicionado no meio, garantindo a saturação (BONI, 2017).

As curvas de calibração do fármaco foram obtidas no meios propostos e estão apresentadas na Figura 44 Os valores de solubilidade de saturação da mesalazina para cada meio estão apresentados na Tabela 19

Figura 44: Curvas de calibração da MSL nos comprimentos de onda 300nm (A) e 330 nm (B) e equação da reta para utilizada para o cálculo de concentração

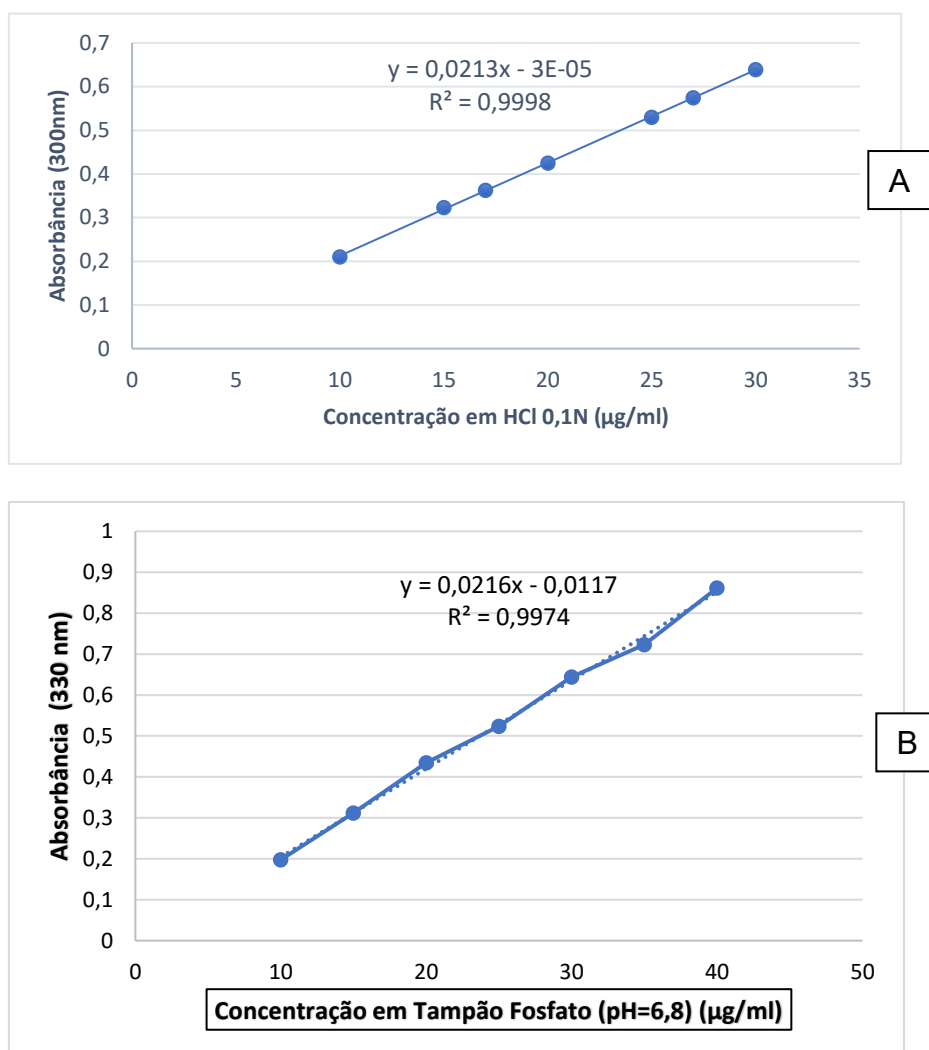


Tabela 19: Valores de solubilidade da MSL em diferentes meios

Meio	Conc. Final (ug/ml)
H ₂ O	971,887
HCl 01N (pH 1,2)	2650,629
TF pH 6,8	2965,926

5.6.2 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da MSL

O teste de dissolução pode ser utilizado como preditivo para orientar a escolha de um sistema que melhor se adapte as condições desejadas para as características *in vivo* (AMARAL SILVA et al., 2019). A taxa de liberação do fármaco a partir de uma matriz polimérica, depende de vários fatores como a solubilidade do fármaco e uma sequência de eventos, que ocorrem quando a matriz entra em contato com o meio, como o intumescimento, a difusão, a erosão, ou até mesmo uma combinação desses fatores.

No meio ácido (HCl pH 1,2), verifica-se uma rápida liberação da MSL das nanopartículas onde as taxas de liberação são comparáveis ao perfil observado para o fármaco livre. Para essas amostras, 100% de liberação foi observado em aproximadamente 40 minutos de ensaio. A observação deste comportamento era esperada uma vez que a solubilidade da MSL, da F3, bem como a solubilidade do polímero quitosana, são altos neste valor de pH. Como já discutido anteriormente, a MSL possui uma solubilidade pH dependente. Desta maneira, o revestimento com quitosana não promoveu nenhuma influência na taxa de liberação do fármaco (Figura 45)

Para as MPs (MPF₃ e MPF_{3cQ}), os resultados foram significativamente diferentes daqueles observados para as NPs e fármaco livre. Entre as micropartículas MPF₃ e MPF_{3cQ} não houve diferença estatística no perfil de dissolução observado. Entretanto, nota-se que ambas apresentam um perfil de liberação controlado em meio ácido. Para essas amostras, uma liberação de aproximadamente 3,5 vezes menor foi observada após 40 minutos de ensaio em relação as nanopartículas e fármaco livre. Adicionalmente, os percentuais de liberação da MSL das micropartículas foram inferiores a 60% após 120 minutos.

Desta maneira, é possível inferir que as micropartículas foram capazes de alterar o perfil de liberação da MSL.

Em meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8, a liberação de 100% da MSL foi atingida por volta dos 120 min. Além disso, as NPs apresentaram um perfil de liberação imediato, semelhante ao fármaco livre (figura 46).

Em contrapartida, as MPs contendo NPs encapsuladas, apresentaram um perfil de liberação controlado, com taxas muito inferiores às NPs isoladas e do fármaco livre. Esse comportamento mostra a capacidade das MPs em controlar as taxas de liberação do fármaco também em pH 6.8.

Figura 45: Perfil de liberação in vitro da MSL livre e associada à NPs com e sem quitosana e incorporadas em MP de GG:AR em meio HCl 0,1N (pH=1,2)

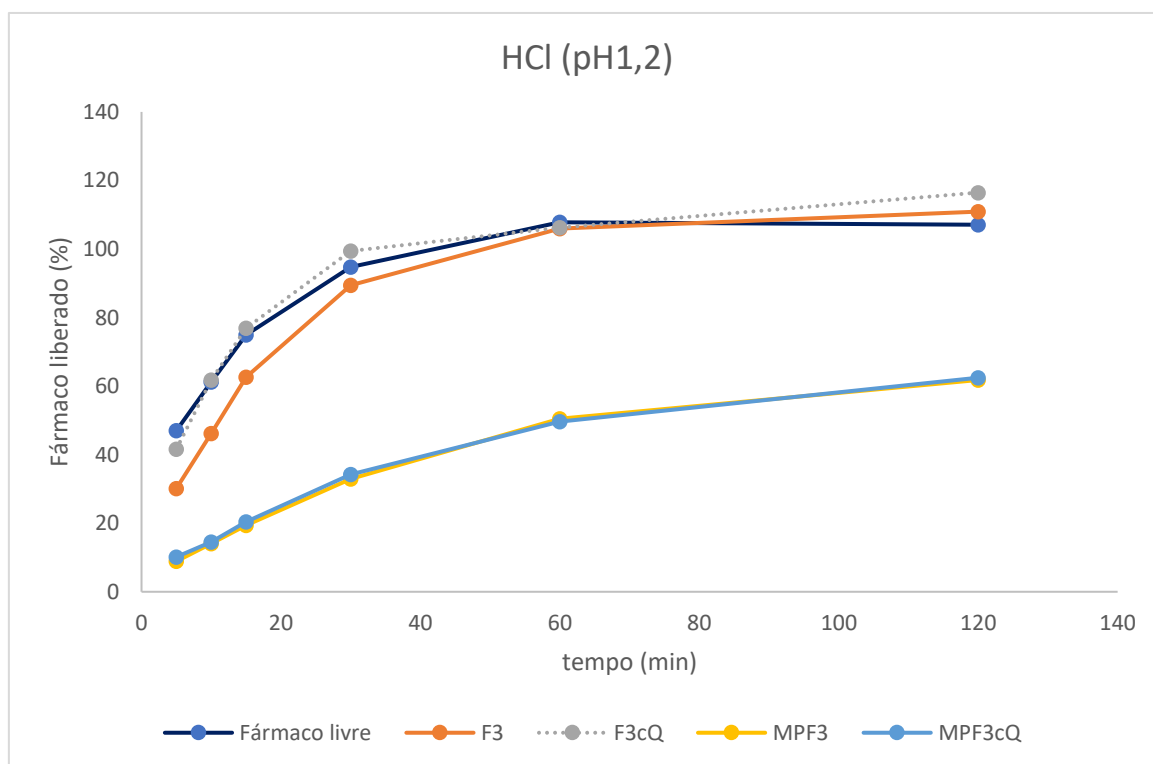
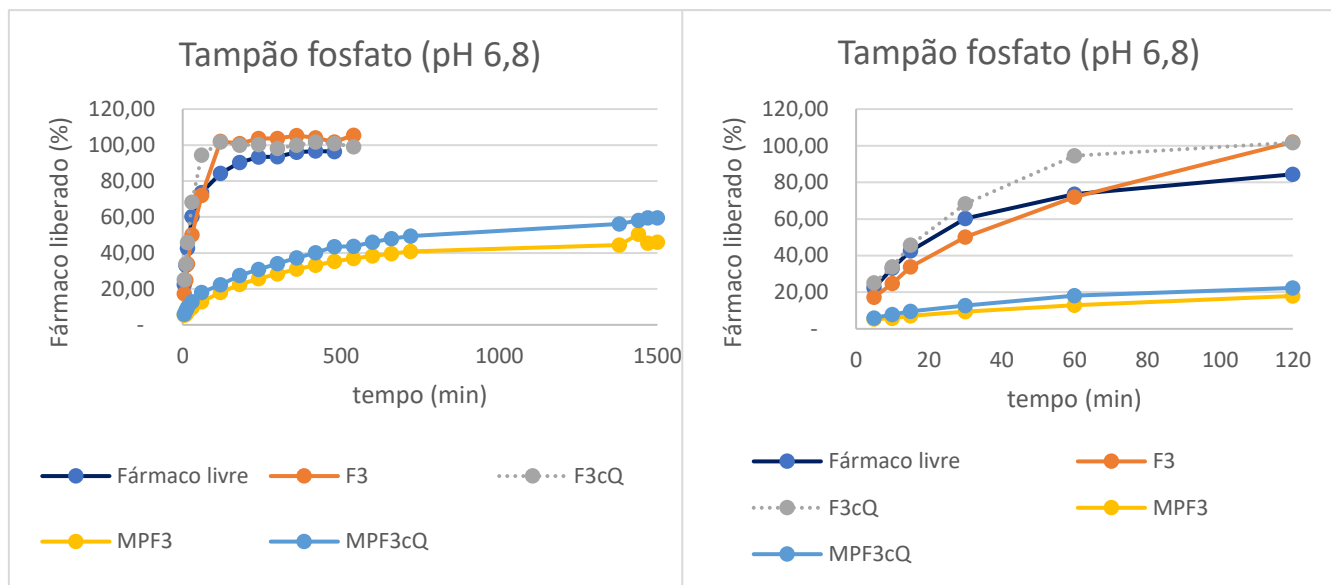


Figura 46: Perfil de liberação in vitro da MSL livre e associada à NPs com e sem quitosana e incorporadas em MP de GG:AR em meio Tampão fosfato (pH6,8) por 24H (A) e os 120 primeiros minutos da dissolução (B)



Portanto, considerando os perfis de liberação das micropartículas observados em pH 1,2 e 6,8, podemos inferir que ao passar pela condição ácida do estômago, esses sistemas são capazes de minimizar a liberação da MSL. Chegando no intestino, a liberação ocorre de forma lenta e progressiva, permitindo uma concentração mais efetiva da MSL no seu sítio de ação.

5.6.2.1 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

Os modelos matemáticos podem traduzir uma curva de dissolução em função de determinados parâmetros, permitindo assim a identificação dos mecanismos envolvidos na liberação do fármaco (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; SIEPMANN; PEPPAS, 2012)

Os parâmetros dos modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas, primeira ordem, Weibull, Hixson-Crowell e Higuchi) aplicados aos dados de

liberação dos sistemas desenvolvidos, estão apresentados na tabela 20. Usualmente, o critério para definição do melhor modelo de cinética de liberação é a avaliação do coeficiente de determinação (R^2) obtido.

Tabela 20. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do fármaco em pH 1,2 e pH 6,8

Modelos matemáticos		pH=1,2			pH=6,8		
		F3cQ	MPF3sQ	MPF3cQ	F3cQ	MPF3sQ	MPF3cQ
Baker-Lonsdale	r^2	0,91112	0,9812	0,9862	0,8957	0,9769	0,9879
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,9789	0,9889	0,9917	0,9367	0,9883	0,9951
Primeira ordem	r^2	0,9831	0,9670	0,9625	0,9978	0,7805	0,8449
Weibull	r^2	0,9988	0,9996	0,9995	0,9981	0,9969	0,9987
	b	0,6940	0,9958	0,9116	0,9665	0,7198	0,5605
Hixson-Crowell	r^2	0,8713	0,9440	0,978	0,7076	0,7232	0,7838
Higuchi	r^2	0,8542	0,9870	0,9908	0,6611	0,9597	0,9684

Considerando os perfis de liberação relatados para os diferentes valores de pH e os valores de r^2 registrados para cada modelo matemático, podemos inferir que para as nanopartículas, o modelo que melhor descreve a liberação da MSL deve ser o de primeira ordem (r^2 0,98 e 0,99). Embora os valores de r^2 tenham sido ligeiramente maiores para o modelo Weibull, este modelo expressa a quantidade de fármaco acumulado no meio de dissolução em um determinado tempo, ou seja, um perfil tempo dependente, o que não pode ser observado para essas amostras.

O modelo de primeira ordem descreve que a taxa de liberação do fármaco no local pode ser expressa por um processo exponencial onde a liberação é função da quantidade de fármaco adicionada no sistema.

Por outro lado, considerando os valores de r^2 adquiridos para as micropartículas bem como seu perfil de liberação tempo dependente, podemos inferir

que o modelo de Weibull é o que melhor descreve o mecanismo de liberação da MSL desta matriz. Para este modelo, o valor numérico do parâmetro b indica o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica. Quando valores de b forem $b \leq 0,75$ a liberação ocorre através de difusão Fickiana. Para $0,75 < b < 1$ a liberação ocorre através da difusão não Fickiana e para $b > 1$, o mecanismo de liberação pode ser considerado complexo onde o intumescimento e/ou erosão da matriz podem estar direcionando o processo (MADERUELO; ZARZUELO; LANA O, 2011)

Em pH 1,2, de acordo com os valores de b , concluiu-se que a liberação da MSL a partir das MPF3 e MPF3cQ ocorrem pela difusão não Fickiana, ou seja, a liberação é controlada pela taxa de difusão do meio para o interior da matriz. Em pH ácido, essa difusão é dificultada devido ao menor grau de relaxamento da matriz polimérica.

Em pH 6,8 observou-se que houve uma mudança nos mecanismos envolvidos no processo de liberação da MSL a partir das micropartículas. Neste pH os valores de b foram maiores que 0,75 indicando uma difusão não Fickiana. Este fato pode ser explicado pela formação de uma estrutura mais organizada e empacota dos polímeros neste valor de pH.

6. CONCLUSÃO

Nanopartículas de MSL foram obtidas com sucesso através da reação de precipitação ácido-base baseadas no delineamento da modelagem computacional. Os dados revelaram que a precipitação da MSL pode formar partículas com predominância de carga superficial positiva, predominância de carga superficial negativa e partículas com equilíbrio de carga superficial, dependendo valor do pH meio em que estão sendo precipitadas, além de tamanho nanométrico das partículas, principalmente as obtidas em valores de pH superior a 4, onde ocorre a predominância das partículas aniônicas. As NPs F3 apresentaram uma maior interação com a mucina em pH que simula o suco gástrico enquanto a F3cQ mostrou que a interação é favorecida principalmente em pH 6,8 que simula o fluido entérico trazendo certa vantagem ao sistema uma vez que este será direcionado ao cólon. Como a MSL possui solubilidade pH dependente e a quitosana também se solubiliza em pH ácido, o uso de uma estratégia para a incorporar das NPs em um sistema de liberação direcionada ao cólon se fez necessário.

As MP de GG e AR preparadas por geleificação ionotrópica apresentaram uma eficiência de incorporação das NP não revestidas e revestidas com quitosana de 22,15 e 25,4% respectivamente. As MPs também mostraram uma capacidade mucoadesiva em ensaio *ex vivo* bastante elevada além de apresentarem a capacidade em controlar a taxa de liberação da MSL a partir das NPs tanto em meio ácido como em meio entérico.

Desta forma, é possível evidenciar que a plataforma tecnológica sugerida para a obtenção de um sistema de nanopartículas de MSL com propriedades

mucoadesivas incorporadas em um sistema microparticulado para a liberação colônica possui potencial aplicabilidade.

REFERENCIAS

AMARAL SILVA, D. et al. Simulated, biorelevant, clinically relevant or physiologically relevant dissolution media: The hidden role of bicarbonate buffer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2019. .

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. 118–126, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.027>>.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2009. .

APARECIDA, J. et al. Coloproctology Epidemiological profile and clinical characteristics of patients with intestinal inflammatory disease. **Journal of Coloproctology**, v. 37, n. 4, p. 273–278, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcol.2017.06.004>>.

BARCLAY, T. G. et al. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 221, n. May, p. 94–112, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.067>>.

BELÉM, M. D. O.; ODA, J. Y. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS: CONSIDERAÇÕES FISIOLÓGICAS E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 1, p. 73–79, 8 set. 2015. Disponível em: <<http://www.revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/5267>>.

BERNSTEIN, C. N. et al. Cancer prevention in inflammatory bowel disease and the chemoprophylactic potential of 5-aminosalicylic acid. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 8, n. 5, p. 356–361, 2002.

BONI, F. I. “ Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de metotrexato”. **repositorio Unesp**, p. 150, 2017.

BONI, F. I.; CURY, B. S. F.; GREMIÃO, M. P. D. FM. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas para liberação colônica

de fármacos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada**, v. 37, n. agosto, p. 4532, 2016.

BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F. 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. 1283–1290, 2016.

BUNKER, A.; MAGARKAR, A.; VIITALA, T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2334–2352, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.025>>.

CARDOSO, VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA; CURY, B. de et al. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 317–333, 2017.

CARDOSO, V. M. de O. Sistemas mucoadesivos de gelana / amido retrogradado destinados à liberação colônica do bevacizumabe para o tratamento do câncer colorretal. p. 229, 2019.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polimeros**, v. 24, n. 2, p. 203–213, 2014.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening-Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.016>>.

COLLNOT, E.; ALI, H.; LEHR, C. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 235–246, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.028>>.

COSTA, M. A. Marina Albino Costa Marina Albino Costa. **1 Monografia. 2017;**, 2017.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2001. .

DAR, M. J. et al. Polymer-based drug delivery: the quest for local targeting of inflamed intestinal mucosa. **Journal of Drug Targeting** Taylor and Francis Ltd, , 9 ago. 2017.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.016>>.

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

DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. Insights into the impact of cross-linking processes on physicochemical characteristics and mucoadhesive potential of gellan gum/retrograded starch microparticles as a platform for colonic drug release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101445, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101445>>.

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

DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CURY, B. S. F. Mucin-polysaccharide interactions: A rheological approach to evaluate the effect of pH on the mucoadhesive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 234–245, 2020.

DE SOUZA, L. A. et al. Inclusion complex between cisplatin and single-walled carbon nanotube: An integrated experimental and theoretical approach. **Inorganica Chimica Acta**, v. 447, p. 38–44, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2016.03.034>>.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação

com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

DESAI, K. G. H. Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, n. 2, p. 107–158, 2016.

DOS SANTOS, A. M. et al. Computational and experimental approaches for development of methotrexate nanosuspensions by bottom-up nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, n. 1–2, p. 330–338, 2017.

DOS SANTOS, A. M. et al. Understanding the role of colon-specific microparticles based on retrograded starch/pectin in the delivery of chitosan nanoparticles along the gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 158, n. August 2020, p. 371–378, 2021.

DU, J. et al. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015. .

DUAN, H. et al. Mucoadhesive microparticulates based on polysaccharide for target dual drug delivery of 5-aminosalicylic acid and curcumin to inflamed colon. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, 2016.

ELBARY, A. A.; ABOELWAF, A. A.; AL SHARABI, I. M. Once Daily, High-Dose Mesalazine Controlled-Release Tablet for Colonic Delivery: Optimization of Formulation Variables Using Box–Behnken Design. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1454–1464, 2011.

FALCONE, R. et al. Differentiation of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by multiple parameters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–7, 2020.

FANGUEIRO, J. F. et al. Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1848–1853, 2012.

FERNANDES PREVIDELLO, B. A. et al. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 600–606, 2006.

FERREIRA, L. M. B. et al. Design of chitosan-based particle systems: A review of the

physicochemical foundations for tailored properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, n. May, 2020.

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**, v. 43, n. 10, p. 1656–1668, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1328434>>.

FRENCH, D. L.; MAUGER, J. W. Evaluation of the Physicochemical Properties and Dissolution Characteristics of Mesalamine: Relevance to Controlled Intestinal Drug Delivery. **Pharmaceutical Research. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, 1993. .

FRÓES, R. D. S. B. Tratamento Convencional na Doença Inflamatória Intestinal. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, vol. 11, p. 27-32, 2012.

GASPARINI, R. G. Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Diseases in the State of São Paulo - Brazil. **Repositório UNESP**, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/152905/gasparini_rg_dr_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

GASPERINI L, MANO JF, R. R. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of The Royal Society**, v. 11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>>.

GODGE, G. R.; HIREMATH, S. N. Development and evaluation of colon targeted drug delivery system by using natural polysaccharides/polymers. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2014.

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, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.018>>.

KARKOSSA, F.; KLEIN, S. A. Biopredictive In Vitro Comparison of Oral Locally Acting Mesalazine Formulations by a Novel Dissolution Model for Assessing Intraluminal Drug Release in Individual Subjects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107,

n. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.02.016>

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.032>.

KHAN, M. A. et al. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol. **Journal of Food Engineering**, v. 258, n. April, p. 45–53, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.04.010>.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v. 178, n. 1, p. 25–45, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.028>.

LAMPRECHT, A. et al. Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 37–43, 2004.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 481–487, 2009.

LEIFELD, L. et al. Mesalazine granules are superior to Eudragit-L-coated mesalazine tablets for induction of remission in distal ulcerative colitis - A pooled analysis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 9, p. 1115–1122, 2011.

LEIGHTON, M. P. et al. Efficacy and mode of action of mesalazine in the treatment of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D): Study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v. 14, n. 10, p. 1–7, 2013. Disponível em: <http://www.trialsjournal.com/content/14/1/10>

LI, J. et al. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 138–147, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.016>

LIANG, J. et al. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. **Food Hydrocolloids**, vol. 69, p. 286-292,

2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.041>

LICHTENSTEIN, G. R.; KAMM, M. A. Review article: 5-Aminosalicylate formulations for the treatment of ulcerative colitis - Methods of comparing release rates and delivery of 5-aminosalicylate to the colonic mucosa. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 6, p. 663–673, 2008.

LOBO, A. R.; DE LEMOS SILVA, G. M. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutricao**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.

MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA O, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2–19, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.002>>.

MAITI, S. et al. Al +3 ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164–172, 2011.

MARANHÃO, D. D. de A.; VIEIRA, A.; CAMPOS, T. de. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **Jbm**, v. 103, n. 1, p. 9–15, 2015a.

MEISSNER, Y.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: Particle targeting versus pH-sensitive delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, n. 1–2, p. 138–143, 2006.

MENEGUIN, A. B. et al. Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 123, n. October 2017, p. 84–94, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.012>>.

MLADENOVSKA, K. et al. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, n. 1–2, p. 124–136, 2007a.

MLADENOVSKA, K. et al. 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1–2, p. 59–69, 2007b.

MOHAMMED, M. A. et al. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. **Pharmaceutics**, vol. 9, n. 53, 2017.

MULTIPROP, E. 15 De Agosto De 2019. p. 2–3, 2019. Disponível em: <<https://www.medellincomovamos.org/download/presentacion-consejo-territorial-de-planeacion-y-plan-de-ordenamiento-territorial-2013/>>.

NAEEM, M. et al. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 1, p. 153–169, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12272-020-01219-0>>.

NÓBREGA, V. G. et al. The onset of clinical manifestations in inflammatory bowel disease patients. **Arq. Gastroenterol**, vol. 55, n. 3, p. 290–295, 2018.

NOJAVAN, S. et al. Electromembrane extraction of zwitterionic compounds as acid or base: Comparison of extraction behavior at acidic and basic pHs. **Analytica Chimica Acta**, vol. 745, p. 45-52, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.07.044>>.

OLIVEIRA CARDOSO, V. M. de et al. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 317–333, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.005>

PEREIRA, M. R. et al. Micropartículas secas contendo fármaco modelo lipofílico preparadas a partir de suspensão aquosa: Estudo de formulação. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 198–205, 2006.

PICHAJ, M. V. A.; FERGUSON, L. R. Potential prospects of nanomedicine for targeted therapeutics in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 23, p. 2895–2901, 2012. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i23/2895.htm>

PINHO, M. A. Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 1, p. 119–123, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-98802008000100018&lng=pt&tlng=pt>.

PREZOTTI, F. G. “Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia

para liberação controlada de fármacos”. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, p. 111, 2013.

PREZOTTI, F. G. et al. Oral nanoparticles based on gellan gum/pectin for colon targeted delivery of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 2, p. 236–245, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2020.1716374>>.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.021>>.

RAMEZANPOUR, M. et al. Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p. 1688–1709, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.028>>.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/2889>

ROBERT, Y.; CAMBUI, S. Doenças inflamatórias intestinais: Revisão Narrativa da Literatura. Revista Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, vol. 17, n. 3, p. 116-119, 2015.

ROMANO, M. et al. From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives. **Anticancer research**, v. 36, n. 4, p. 1447–60, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069120>>.

ROSSI-BERGMAN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciênc. cult. (São Paulo)**, p. 54–57, 2008.

SANTOS, A. M. Desenvolvimento e caracterização de micro/nanossuspensões com propriedades mucoadesivas para liberação cólon-específica de metotrexato. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências

Farmacêuticas, p. 160, 2015.

SANTOS, A. M. dos et al. The role of stabilizers and mechanical processes on physico-chemical and anti-inflammatory properties of methotrexate nanosuspensions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, n. January, 2020.

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.

SHARKEY, C. C. et al. Hypoxia potentiates the cytotoxic effect of piperlongumine in pheochromocytoma models. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 2–6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.052%5Cn>>.

SHARMA, S.; SINHA, V. R. Current pharmaceutical strategies for efficient site specific delivery in inflamed distal intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 272, n. October, p. 97–106, 2017.

SHI, S. F. et al. Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5593–5602, 2012.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 163–174, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>>.

SILVA, D.; MOURA, R. M. B. L.; HARTMANN, R. M. O Papel Antioxidante Da Mesalazina No Modelo Experimental De Colite Induzida Por Ácido Acético Em Ratos. **Revista de Iniciação científica da Ulbra**, n. 13, p. 30–40, 2015.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 13–14, p. 784–792, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.019>>.

SOUZA, D. F. DE. Desenvolvimento de minicomprimidos de liberação modificada contendo mesalazina. p. 1–94, 2012.

STABILE, S. A. B. et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. **Rev Einstein**, v. 10, n. 69, p. 466–472, 2012.

SUBRAMANIAN, S.; EKBOM, A.; RHODES, J. M. Recent advances in clinical practice: A systematic review of isolated colonic Crohn's disease: The third IBD? **Gut**, v. 66, n. 2, p. 362–381, 2017.

TAGLIARI, M. P. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de mesalazina em microesferas poliméricas. **Congresso Brasileiro de Polímeros**, n. Dii, 2009.

TEIXEIRA, D. A. Estudo eletroquímico e computacional de inibidores voláteis de corrosão adsorvidos sobre o zinco. **Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química**, p. 199, 2014.

VALENTE, M. A. G. et al. Caprylate Salts Based on Amines as Volatile Corrosion Inhibitors for Metallic Zinc: Theoretical and Experimental Studies. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. May, p. 1–18, 2017.

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

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

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, n. 1–2, p. 216–222, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591014001211>>.

VICTORIA, C. R.; SASSAKI, L. Y.; NUNES, H. R. D. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L. A. farmacêuticas de polímeros; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282010000100012&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

YU, S. et al. Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, n. February, p. 282–293, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.012>>.