



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Co-encapsulação de ácido 5-aminosalicílico
e probióticos em micropartículas cólon-específicas
de amido retrogradado/pectina e otimizadas
com nanofibras de celulose para o tratamento
de colite ulcerativa**

Silvio André Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim

**Araraquara - SP
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



"JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Co-encapsulação de ácido 5-aminosalicílico
e probióticos em micropartículas cólon-específicas
de amido retrogradado/pectina e otimizadas
com nanofibras de celulose para o tratamento
de colite ulcerativa**

Silvio André Lopes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim

**Araraquara-SP
2023**

L864c Lopes, Silvio André.
Co-encapsulação de ácido 5-aminosalicílico e probióticos em micropartículas cólon-específicas de amido retrogradado/pectina e otimizadas com nanofibras de celulose para o tratamento de colite ulcerativa / Silvio André Lopes. – Araraquara: [s.n.], 2023.
131 f. : il.

Orientadora: Andréia Bagliotti Meneguim.

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

1. Colite ulcerativa. 2. Liberação cólon-específica. 3. 5-ASA. 4. Probióticos. 5. Amido retrogradado. 6. Micropartículas. I. Meneguim, Andréia Bagliotti, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Co-encapsulação de ácido 5-aminosalicílico e probióticos em micropartículas cólon-específicas de amido retrogradado/pectina e otimizadas com nanofibras de celulose para o tratamento de colite ulcerativa

AUTOR: SILVIO ANDRÉ LOPES

ORIENTADORA: ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN

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

Profa. Dra. ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. PRISCILEILA COLERATO FERRARI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

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

Araraquara, 12 de dezembro de 2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus por toda a proteção e amparo nesta vida, à minha querida e amada mãe Nádia Valéria (*in memoriam*) pelo amor incondicional, carinho e dedicação para comigo desde sempre; ao meu amado e querido pai Sílvio Lopes, pela força, suporte e companheirismo; à minha avó Diva Bortolucci e ao meu avô Eduardo Mesquita (*in memoriam*). Saudades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha existência e por possibilitar o sucesso em minha caminhada.

Aos meus pais Nádia e Sílvio, minha irmã Maria, meus avós Diva e Eduardo, e a todos os integrantes de minha família que me ajudaram a concluir esta etapa da minha vida. Agradeço especialmente ao meu pai por toda a ajuda e tempo dispensados na elaboração e conclusão desta dissertação. Agradeço imensamente a todos os meus amigos de Ribeirão Preto-SP e Araraquara-SP que, de alguma forma, me auxiliaram nesse processo. Um agradecimento especial à minha amiga Tânia pelo apoio.

A Profa. Dra. Andréia Bagliotti Meneguim pela orientação, oportunidade concedida, empenho e paciência para comigo permitindo a realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade, apoio, ajuda e aprendizado.

A Prof. Dr. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury e ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.

Ao doutorando Cesar Augusto Roque-Borda por todo o apoio, ajuda, e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pela ajuda no início dos trabalhos.

Aos colegas de Laboratório do Departamento de Fármacos e Medicamentos e do Laboratório de Farmacotécnica pela ajuda, apoio, colaboração, incentivo e auxílio durante a trajetória.

A todos os membros da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que de alguma maneira me auxiliaram ao longo do percurso.

A Dr. Beatriz Sanchez da UNESP e ao Dr. Juan Camilo Cifuentes Arenas do Fundecitrus pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

A todos os membros do Instituto de Química, ao Departamento de Bioquímica, e a todos os envolvidos pelo auxílio em análises laboratoriais.

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

Por fim, agradeço imensamente a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste ciclo da minha vida.

EPÍGRAFE

*“Deus, conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar,
coragem para modificar aquelas que posso,
e sabedoria para reconhecer a diferença entre elas.
Só por hoje funciona, vivendo um dia de cada vez.”*

Reinhold Niebuhr.

RESUMO

A retocolite ulcerativa (RCU) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica que acomete o cólon e o reto, cuja causa ainda não é completamente conhecida. Redução do pH, aceleração do trânsito colônico, diarreia e desequilíbrio na microbiota intestinal (disbiose) são os principais sintomas. Os probióticos (PROB), quando sobrevivem ao ambiente estomacal ácido e alcançam o intestino, podem ajudar a minimizar a disbiose e modular a resposta imunológica local. O tratamento medicamentoso convencional da RCU é baseado no anti-inflamatório mesalazina (5-ASA), o qual é rápida e extensamente absorvido no trato gastrointestinal (TGI) superior, causando diversos efeitos colaterais e baixa concentração no órgão-alvo (cólon), reduzindo sua eficácia terapêutica. Dessa maneira, a co-encapsulação de PROB e 5-ASA em micropartículas (MPs) para liberação cólon-específica através da técnica de secagem por pulverização (*spray-drying*) deve oferecer proteção aos compostos encapsulados e vetorização da sua liberação no cólon, visando tratamento localizado. O amido retrogradado (AR), uma fração do amido que escapa da digestão nas porções superiores do TGI e é degradado pela microbiota colônica, tem sido utilizado com sucesso para o desenvolvimento de sistemas cólon-específicos. Além disso, a pectina (P) e nanofibras de celulose (NFC) foram usadas para garantir resistência em meio ácido e evitar o *burst* de liberação do 5-ASA. O objetivo desse trabalho foi co-encapsular o PROB *Lactobacillus rhamnosus* GG (Culturelle®) e 5-ASA por *spray-drying* usando AR/P/NFC. O AR foi obtido por retrogradação da alta amilose em associação à P. As dispersões obtidas foram acrescidas de NFC, PROB e 5-ASA, e submetidas a 18 diferentes condições de secagem (CS), variando-se a temperatura de entrada, taxa de aspiração e fluxo de alimentação. As MPs obtidas foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação (EE) por espectrofotometria UV/VIS, viabilidade probiótica por contagem de colônias em meio MRS e morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Na sequência, avaliou-se as propriedades dos materiais por difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), mucoadesão *in vitro* e perfil de liberação *in vitro* do 5-ASA. As MPs obtidas mostraram-se com forma aproximadamente esférica e com tamanho entre 1 e 10 μm . O ajuste fino das variáveis de processo, tais como temperatura de entrada e taxa de aspiração e fluxo de alimentação, permitiram a obtenção de MPs com elevada EE (até 81,5%) e manutenção da viabilidade do PROB ($5,74 \pm 0,01$ log UFC/g de amostra), inclusive após 30 dias de estocagem a 4°C. As análises por DRX indicaram que as CS não alteraram as propriedades estruturais dos componentes da formulação, porém a análise por DSC mostrou uma redução no pico de fusão do 5-ASA, sugerindo uma diminuição de cristalinidade. O ensaio *in vitro* de mucoadesão revelou que a CS aplicada durante a síntese das MPs modula a força de mucoadesão, sendo essa maior com o emprego de menores temperaturas de secagem. Além disso, o perfil de liberação *in vitro* mostrou menores taxas de liberação (abaixo de 15%) em meio ácido, fazendo com que a maior massa de 5-ASA fosse liberada em meio intestinal e colônico. Assim, o desenvolvimento dessas MPs representa uma promissora estratégia para promover a liberação específica no cólon, minimizando os efeitos colaterais associados ao tratamento convencional e potencialmente melhorando a eficácia terapêutica no contexto da retocolite ulcerativa.

Palavras-chave: colite ulcerativa; liberação cólon-específica; 5-ASA; probióticos; amido retrogradado; micropartículas.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease (IBD) that affects the colon and rectum, the cause of which is not yet completely known. Reduction in pH, acceleration of colonic transit, diarrhea and imbalance in the intestinal microbiota (dysbiosis) are the main symptoms. Probiotics (PROB), when they survive the acidic stomach environment and reach the intestine, can help minimize dysbiosis and modulate the local immune response. Conventional drug treatment for UC is based on the anti-inflammatory mesalazine (5-ASA), which is rapidly and extensively absorbed in the upper gastrointestinal tract (GIT), causing several side effects and low concentration in the target organ (colon), reducing its therapeutic efficacy. Thus, the co-encapsulation of PROB and 5-ASA in microparticles (MPs) for colon-specific release through the spray-drying technique should offer protection to the encapsulated compounds and vectorization of their release in the colon, aiming to localized treatment. Retrograded starch (RS), a fraction of starch that escapes digestion in the upper portions of the GIT and is degraded by the colonic microbiota, has been successfully used for the development of colon-specific systems. Furthermore, pectin (P) and cellulose nanofibers (CNF) were used to guarantee resistance in acidic environments and avoid burst release of 5-ASA. The objective of this work was to co-encapsulate PROB *Lactobacillus rhamnosus* GG (Culturelle®) and 5-ASA by spray-drying using RS/P/CNF. AR was obtained by retrogradation of high amylose in association with P. The dispersions obtained were added with CNF, PROB and 5-ASA, and subjected to 18 different drying conditions (CS), varying the inlet temperature, drying rate, suction and supply flow. The MPs obtained were evaluated for encapsulation efficiency (EE) by UV/VIS'S spectrophotometry, probiotic viability by colony counting in MRS medium and morphology by scanning electron microscopy. Next, the properties of the materials were evaluated by X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), *in vitro* mucoadhesion and *in vitro* release profile of 5-ASA. The MPs obtained were approximately spherical in shape and between 1 and 10 μm in size. The fine adjustment of process variables, such as inlet temperature and aspiration rate and feed flow, allowed obtaining MPs with high EE (up to 81.5%) and maintaining PROB viability (5.74 ± 0.01 log CFU/g of sample), including after 30 days of storage at 4°C. XRD analysis indicated that CS did not alter the structural properties of the formulation components, however DSC analysis showed a reduction in the melting peak of 5-ASA, suggesting a decrease in crystallinity. The *in vitro* mucoadhesion test revealed that the CS applied during the synthesis of MPs modulates the mucoadhesion strength, which is greater with the use of lower drying temperatures. Furthermore, the *in vitro* release profile showed lower release rates (below 15%) in acidic environments, causing the greater mass of 5-ASA to be released in intestinal and colonic environments. Thus, the development of these MPs represents a promising strategy to promote specific release in the colon, minimizing side effects associated with conventional treatment and potentially improving therapeutic efficacy in the context of ulcerative colitis.

Keywords: ulcerative colitis; colon-specific delivery; 5-ASA; probiotics; retrograded starch; microparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação da RCU com incidência e principais sintomas.....	23
Figura 2. Incidência de RCU no mundo. Fonte: KAPLAN, 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. 2015. Disponível em < https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/IBDG2016r/UCinc_G.html >. Acesso em 23 de setembro de 2023.....	25
Figura 3. Prevalência de RCU no mundo. KAPLAN, 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. 2015. Disponível em < https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/IBDG2016r/UCpre_G.html >. Acesso em 23 de setembro de 2022.....	26
Figura 4. Distribuição percentual de pacientes acometidos por RCU, por regiões do Estado de São Paulo (Brasil), entre os anos de 2012-2015.....	30
Figura 5. (A) fatores de risco para DII e (B) principais diferenças entre RCU e DC.....	31
Figura 6. Esquema ilustrativo mostrando o dinamismo entre o sistema imunológico e a microbiota intestinal.....	36
Figura 7. Estrutura química do 5-ASA (mesalazina).....	43
Figura 8. Fotomicrografia de probióticos da espécie <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG. Apresenta dimensões de 0,8 a 1,0 µm de largura por 2,0 a 4,0 µm de comprimento. As setas vermelhas indicam os bacilos. GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 2015.....	50
Figura 9. Esquema mostrando a formação de amido retrogrado. Adaptado de HARALAMPU, 2000.....	57
Figura 10. Ilustração mostrando a estrutura e a composição da pectina. MENEGUIN, 2012.....	59
Figura 11. Nanofibras de celulose. Imagem adaptada e disponível em: < https://nanografi.com/blog/cellulose-nanofibers/ >. Consultado em 15 de dezembro de 2023.....	61
Figura 12. Ilustração esquemática mostrando as diferenças entre uma microcápsula e uma microesfera. Adaptado de TORRADO <i>et al.</i> , 1992.....	62
Figura 13. Imagem (A) e ilustração esquemática (B) do equipamento spray-dryer, contendo fluxo de ar de secagem. https://www.researchgate.net/ . c2008-2024. Disponível em < https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Imagem-real-A-e-o-esquema-B-do-spray-dryer_fig3_361226391 >. Acesso em 27 de outubro de 2023.....	63

Figura 14. Representação esquemática da diluição seriada das amostras em solução PBS.....	69
Figura 15. Imagens das colônias de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG presentes no produto comercial Culturelle, obtidas 72 horas após plaqueamento em meio de cultura MRS após diluição em série da suspensão original. A=diluição 10 ⁴ , B=diluição 10 ⁵ , e C=diluição 10 ⁶	73
Figura 16. Imagens das colônias de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG presentes nas micropartículas obtidas com temperatura de secagem à 135°C (A), 150°C (B) e 170°C (C), após plaqueamento em meio de cultura MRS, 24 horas após a síntese e observadas após 72 horas de incubação.	75
Figura 17. Número de UFC de probióticos enumeradas em placas de Pétri em meio de cultura MRS, a partir de amostras obtidas em CS2, CS3 e CS4 e sem adição dos conservantes Nipagin® e Nipazol®. Após após 30 dias de armazenamento à 4 e 30°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	78
Figura 18. Difratoograma do amido puro (A), pectina pura (B), amido retrogradado + pectina (C) e nanofibras de celulose (D)	85
Figura 19. Difratoograma do 5-ASA puro (A) e do probiótico (B)	86
Figura 20. Difratoograma da formulação F3 (AR/P/NFC+5-ASA+PROB) após processo de secagem CS6 (130°C) (A), CS7 (140°C) (B), CS9 (160°) (C), CS11 (180°) (D), CS12 (190°) (E).....	87
Figura 21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS6 (130°C-90A-P0,08), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.....	88
Figura 22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS2 (135°C-80A-P0,10), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.....	89
Figura 23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS7 (140°C-90A-P0,08), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.....	90
Figura 24. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS3 (150°C-80A-P0,10), aumentadas 5000 (A) e 6500 (B) vezes.....	90
Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de	90

secagem à condição CS9 (160°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 8000 vezes.....	
Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS4 (170°C-80A-P0,10), aumentadas 2500 (A) e 8000 (B) vezes.....	91
Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS11 (180°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 5000 vezes.....	91
Figura 28. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS12 (190°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 2500 vezes.....	92
Figura 29. Curva DSC do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	93
Figura 30. Curva DSC da blenda AR/P.....	94
Figura 31. Curva DSC do 5-ASA puro.....	94
Figura 32. Curva de análise térmica das amostras da formulação F3 (AR/P/NFC+5-ASA+PROB) após processo de secagem CS6 (130°C) (A), CS7 (140°C) (B), CS9 (160°) (C), CS11 (180°) (D), CS12 (190°) (E).....	96
Figura 33. Força (A) e trabalho de mucoadesão (B) de amostras oriundas das condições de secagem CS2, CS3, CS4, AR/P/NFC e AR/P seco.....	97
Figura 34. Perfis de liberação do fármaco 5-ASA a partir de micropartículas de AR/P/NFC/PROB/5-ASA em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2) (A) no intervalo de 0 a 120 min e em meio constituído de tampão fosfato pH 7,4 (B) e pH 6,8 (C), no intervalo de 0 a 240 min.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre as bactérias presentes na microbiota saudável e na microbiota patológica (disbiose)	42
Tabela 2. Benefícios do uso de probióticos, isoladamente ou combinados com 5-ASA, no tratamento da DII	51
Tabela 3. Estratégias abordadas na liberação cólon-específica de fármacos.....	55
Tabela 4. Variáveis aplicadas ao processo de microencapsulação do 5-ASA e probióticos pela técnica de spray drying, usando a blenda AR/P, otimizada com NFC	67
Tabela 5. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela mistura de amido retrogradado com pectina (AR/P), otimizadas com nanofibras de celulose (NFC), acrescidas ou não com o fármaco mesalazina (5-ASA) e do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (PROB), após secagem em spray-dryer à 210°C e taxas de aspiração de 70% e fluxo de 0,05% de alimentação (CS1). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão)	72
Tabela 6. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela blenda AR/P e NFC, acrescidas ou não do fármaco 5-ASA e do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (PROB), após secagem em <i>spray-dryer</i> em temperaturas de entrada de 135 °C (CS2), 150 °C (CS3) e 170 °C (CS4). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão)	74
Tabela 7. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela blenda AR/P e NFC, acrescidas do fármaco 5-ASA e do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (PROB), sem a adição dos conservantes antimicrobianos Nipagin® e Nipazol®, após diferentes condições de secagem em <i>spray-dryer</i> e faixas de temperaturas de saída. Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão)	77
Tabela 8. Eficiência de encapsulação (%) do fármaco mesalazina (5-ASA) em micropartículas baseadas em AR/P/NFC, contendo 5-ASA e probiótico, após diferentes condições de secagem (CS) em <i>spray dryer</i> , apresentados em ordem decrescente (média ±desvio padrão, n=3)	83
Tabela 9. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 1,2)	103
Tabela 10. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 7,4)	104
Tabela 11. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG, submetidas a três condições de	

secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 6,8) 104

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA = ácido 5-aminosalicílico

AR = Amido retrogradado

CS = Condição de secagem

DC = Doença de Crohn

DII = Doenças inflamatórias intestinais

DRX = Difração de raios-X

DSC = Calorimetria Exploratória Diferencial (do Inglês *Differential Scanning calorimetry*)

EE = Eficiência de encapsulação

MEV = Microscopia eletrônica de varredura com campo ampliado

MRS = Meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe

NFC = Nanofibras de celulose

P = Pectina

PROB = Probiótico

RCU = Retocolite ulcerativa

SLOCs = Sistemas de liberação colônicos orais

TGI = Trato gastrointestinal

UFC = Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Classificação das DII	22
2.1.2. Retocolite ulcerativa (RCU)	22
2.1.3 Doença de Crohn (DC)	24
2.2 Incidência e prevalência das DII no mundo	25
2.3 Incidência e prevalência das DII no Brasil	27
2.4 DII no estado de São Paulo	29
2.5 Fatores predisponentes	30
2.6 DII e outras doenças	33
2.7 Imunopatogênese das DII	33
2.7.1. O sistema imunológico intestinal (SII)	35
2.7.2. O sistema imunológico inato (SIIn)	36
2.7.3. O sistema imunológico adaptativo (SIA)	38
2.8 Microbiota intestinal e disbiose nas DII	40
2.9 Tratamento farmacológico das DII	43
2.9.1. Mecanismos de ação da mesalazina	45
2.9.2. Adesão ao tratamento com mesalazina	45
2.9.3. Problemas relacionados à terapia farmacológica convencional das DIIs	47
2.9.4. Tratamento alternativo das DII com probióticos	48
2.10 Sistemas cólon-específicos	53
2.10.1. Sistemas cólon-específicos baseados em polissacarídeos	55
2.10.2. Amido retrogradado.....	57
2.10.3. Pectina	58
2.10.4. Nanofibras de celulose.....	60
2.10.5. Micropartículas obtidas por <i>spray drying</i>	61
2.10.6. Viabilidade de probióticos pós-secagem por <i>spray drying</i>	65
3. OBJETIVOS	66
4. MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1 Retrogradação do amido para microencapsulação.....	66
4.2 Obtenção das micropartículas por <i>spray drying</i>	66
4.3 Rendimento das micropartículas	67

4.4 Viabilidade dos microorganismos após processo de spray drying	68
4.5 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)	69
4.6 Difração de Raios-X (DRX)	70
4.7 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV).....	70
4.8 Calorimetria exploratória diferencial)	70
4.9 Ensaio de mucoadesão <i>in vitro</i>	70
4.10 Ensaio de liberação do 5-ASA <i>in vitro</i>	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Síntese das micropartículas, rendimento e viabilidade do probiótico	72
5.2 Rendimento na obtenção das micropartículas	81
5.3 Eficiência de encapsulação (EE)	83
5.4 Difração de Raios-X (DRX)	84
5.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV).....	88
5.6 Análise térmica (DSC)	92
5.7 Ensaio de mucoadesão <i>in vitro</i>	96
5.8 Liberação <i>in vitro</i> do 5-ASA.....	98
5.8.1 Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> do 5-ASA	102
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são enfermidades caracterizadas por inflamações crônicas que acometem o sistema digestivo (MOLODECKY *et al.*, 2012). Elas podem atingir várias regiões do intestino, sendo as principais o íleo e o intestino grosso (BAUMGART; SANDBORN, 2012). As principais doenças que compõem essa classe são: retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) (MOLODECKY *et al.*, 2012). Enquanto a RCU se restringe às mucosas, acometendo o reto e o cólon (BARBOSA, 2018), a DC pode atingir, de forma descontínua, qualquer região do trato gastrointestinal (TGI) (BAUMGART; SANDBORN, 2012). Apesar de bem estudadas, as causas ainda não foram completamente esclarecidas (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2014). Porém, evidências disponíveis sugerem que estão relacionadas com uma resposta inflamatória incomum a microrganismos presentes na microbiota do TGI, resultantes de desordens imunológicas do paciente (ABRAHAM; CHO, 2009). Além disso, indícios apontam que essas doenças resultam de interações genéticas do paciente com o meio ambiente, tais como condições sanitárias e de higiene impróprias, uso de anticoncepcionais orais e antibióticos, infecções intestinais por helmintos, mudanças bruscas na dieta alimentar e o estresse físico e mental (ABRAHAM; CHO, 2009; DANESE *et al.*, 2004).

Estudos sugerem que habitantes de regiões urbanas e industrializadas são mais propensos a apresentar, de forma geral, doenças autoimunes, como as DII (SOUZA *et al.*, 2021). Dos cerca de 70.000 novos casos registrados por ano em todo o mundo (KESHARWANI *et al.*, 2018), a maior frequência ocorreu no norte da Europa e Estados Unidos, onde, de 2012 a 2017 a incidência variou de 15,7 a 24,3 casos a cada 100.000 pessoas ao ano, respectivamente (MOLODECKY *et al.*, 2012; SHIVASHANKAR *et al.*, 2017). Na América do Norte, de 1981 a 1994 (LOFTUS, SANDBORN, 2002), as DII afetaram aproximadamente 1,4 milhão de pessoas (ABRAHAM; CHO, 2009). A associação entre a ocorrência de DII e urbanização é evidenciada quando se analisa dados de outras regiões do mundo, incluindo o Brasil (LOGAN; BOWLUS, 2010). Na América do Sul e África essas doenças eram consideradas raras. Porém, nos países onde, de forma geral, houve melhoria das condições socioeconômicas, houve também aumento progressivo da incidência (ELIA *et al.*, 2007; VILELA *et al.*, 2022).

Do ponto de vista celular, existem fatores que sugerem o agravamento das DII. Geralmente a evolução da doença está associada a alterações na homeostase imune em

decorrência de defeitos na barreira mucosa da região acometida, resultando em secreção de endotoxinas e translocação bacteriana (KHOR *et al.*, 2011; NEURATH; TRAVIS, 2012). Em condições patológicas, vários tipos de barreiras epiteliais do cólon podem sofrer danos (SCHULZKE *et al.*, 2009; KOTLA *et al.*, 2018) em decorrência de redução da resistência do epitélio intestinal e diminuição das proteínas de junções paracelulares, como as claudinas e ocludinas. Como consequência, a permeabilidade a íons e água aumenta nos locais lesionados. Já o aparecimento de lesões da mucosa, apoptose e necrose está relacionado ao aumento de liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1B (IL-1B) e int erferon-gama (IFN- γ). O processo de apoptose pode permitir erosões, úlceras, vazamentos locais e aumento da transcitose e aumentar a captação de antígenos e bactérias (KOTLA *et al.*, 2018; SCHULZKE *et al.*, 2009).

As op es terapêuticas convencionais para DII envolvem principalmente a administração oral de anti-inflamatórios, sendo a mesalazina (5-ASA) a primeira escolha, que visa manter o tempo de remissão o maior possível, além de prevenir episódios de inflamação. Se não tratada, a DII pode agravar-se com sintomas mais intensos, como sangramento retal, anemia, espasmo gastrointestinal, náusea, febre, fadiga e perda de peso e apetite (KULKARNI *et al.*, 2022). Em casos mais avançados, os pacientes com DII podem apresentar erosões epiteliais, ulcerac oes e fibrose (KOTLA *et al.*, 2018) que podem progredir para câncer colorretal (LEE *et al.*, 2019).

Várias alternativas têm sido propostas para o direcionamento de fármacos para o cólon, tais como o uso de pr -fármacos, de sistemas de liberação pH- e/ou tempo-dependentes, e os ativados pela microbiota colônica. Na atual terapia da DII aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA), o 5-ASA é incorporado em formas farmacêuticas baseadas em polímeros específicos que apresentam diversos mecanismos de gastroresist ncia e/ou vetorização para os intestinos. Como exemplo, cita-se o Asacol[ ] (pH-responsivo), Colazal[ ] (um pr -fármaco com redução enzimática), Mezavant[ ] (pH-responsivo) e Pentasa[ ] (tempo-dependente) (KOTLA *et al.*, 2018; PALUMBO *et al.*, 2016). Tais medicamentos frequentemente tem sua eficácia comprometida devido ao tempo insuficiente de ativação em casos de diarreia, bem como alteração dos valores de pH das se oes gastrintestinais acometidas, além de estarem associados à incidência de efeitos adversos e colaterais, os quais também podem estar relacionados ao sistema transportador no caso dos pr -fármacos (YE; VAN LANGENBERG, 2015). Dessa forma, a eficácia destes sistemas é limitada (ZHANG; MERLIN, 2018) e até dois terços

dos pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento e necessitam de cirurgia (SHAH *et al.*, 2020). Além disso, nesta terapia os anti-inflamatórios são administrados em altas dosagens e por períodos prolongados, o que leva a efeitos colaterais adversos sistêmicos (SHAH *et al.*, 2020). A baixa eficácia do tratamento e os efeitos adversos graves ocorrem devido à rápida absorção da maior parte do fármaco na porção jejunal, com a porção restante sendo liberada continuamente em todo o TGI. Como resultado, apenas cerca de 20% do fármaco administrado atinge efetivamente o cólon (COTTONE *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a busca por novos sistemas de liberação cólon-específicos para o 5-ASA é urgente (SARDO *et al.*, 2019) e uma alternativa importante consiste em empregar alternativas que explorem o potencial dos polissacarídeos como ingredientes farmacêuticos inertes para a fabricação de sistemas nano e microparticulados (KOTLA *et al.*, 2018). Estes podem ser associados a microrganismos probióticos para que, além do efeito farmacológico do 5-ASA, possam beneficiar os pacientes dos efeitos complementares dos microrganismos probióticos (CELIBERTO *et al.*, 2017).

Vários estudos têm demonstrado benefícios importantes do uso de probióticos como adjuvantes no tratamento tradicional da DII (COQUEIRO *et al.*, 2019). O uso de probióticos foi associado à remissão ou atenuação dos sintomas, bloqueio da angiogênese, redução da inflamação, reforço da barreira intestinal e redução do tempo de recuperação da doença (CELIBERTO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2013; GHASEMIAN *et al.*, 2018; KRUIS *et al.*, 2004; MARDINI; GRIGORIAN, 2014; MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018; PALUMBO *et al.*, 2016; WIEERS *et al.*, 2020;). No entanto, o seu potencial terapêutico tem sido prejudicado por desafios como estabilidade limitada, viabilidade e liberação direcionada. A estratégia de vetorização de fármacos diretamente no cólon por meio de micropartículas tem sido estudada no tratamento da DII (LI *et al.*, 2023). A utilização dessas estruturas é potencialmente promissora, devido à capacidade dessas partículas de penetrar na camada mucosa e no epitélio intestinal afetado pela doença (COLLNOT *et al.*, 2012). Essas partículas protegem fármaco e probióticos da degradação e permitem que eles atinjam o cólon afetado em altas concentrações, conferindo efeitos farmacológicos prolongados e maximizados, minimizando os efeitos colaterais adversos (ZHANG; MERLIN, 2018). Assim, há uma demanda crescente pelo desenvolvimento de novos sistemas baseados em microtecnologias (SHAH *et al.*, 2020).

Estudos apontam que o uso de polissacarídeos biodegradáveis por enzimas secretadas pela microbiota colônica constitui um caminho eficiente para contornar esses

desafios, permitindo a liberação das moléculas de interesse no cólon, região alvo para o efeito terapêutico desejado (MENEGUIN, 2021). O amido retrogradado (AR), um amido modificado, tem sido considerado um forte candidato como insumo farmacêutico inerte de liberação colônica (MENEGUIN *et al.*, 2018, 2014). Essa fração do amido não é digerida nas porções superiores do TGI, sendo metabolizada apenas no cólon, desestruturando o sistema carreador e promovendo a liberação cólon-específica (HTOON *et al.*, 2010; MENEGUIN *et al.*, 2018). A pectina (P), um polissacarídeo extraído principalmente de frutos cítricos, tem sido associada ao processo de retrogradação, aumentando o rendimento do AR, além de também ser digerida pela microbiota colônica (MENEGUIN *et al.*, 2018, 2017, 2014). No entanto, sua elevada hidrofília permite que pequenas concentrações de fármaco sejam liberadas prematuramente no meio gástrico (MENEGUIN *et al.*, 2018).

Como estratégia, a associação de nanofibras de celulose (NFC) ao excipiente colônico de AR/P para a obtenção de micropartículas por *spray drying* levou à diminuição da liberação do 5-ASA no meio gástrico e duodenal e aumento da concentração do fármaco em meio colônico (MENEGUIN *et al.*, 2021). Tal comportamento foi atribuído ao fato dos feixes de nanofibrilas, longos e flexíveis (20-50 μm x 100 μm) e com domínios cristalinos e amorfos (MÜLLER *et al.*, 2013), dispersarem-se aleatoriamente estabelecendo alto grau de interação NFC-polímeros e NFC-fármaco, podendo aumentar consideravelmente as propriedades mecânicas, de barreira e controle das taxas de liberação. Assim, pequenas proporções de NFC adicionadas como reforço em compósitos poliméricos podem modular a velocidade de liberação do fármaco no local de ação (MANDAL; CHAKRABARTY, 2015).

Nesse sentido, parece evidente que a co-encapsulação do 5-ASA e probióticos por *spray-drying*, utilizando a blenda cólon-específica AR/P reforçada com NFC, parece uma estratégia racional para o tratamento localizado da RCU, a qual deve possibilitar a otimização das propriedades terapêuticas deste fármaco, com menor incidência de efeitos colaterais e adversos. Apesar do processo de microencapsulação por *spray-drying* ocorrer através da evaporação de solvente a partir de gotículas poliméricas atomizadas em ambiente sob altas temperaturas (BURGAIN *et al.*, 2011), a literatura mostra claramente sua segurança para o processamento de compostos termolábeis, como é o caso dos probióticos e proteínas.

Nas DII, ocorre uma aceleração no tempo de trânsito, presente nos episódios de diarreia. Dessa forma, os sistemas que abordam a liberação dependente do tempo por

meio de intumescimento ou ruptura de revestimento podem não ser totalmente adequados na terapêutica. Nesse sentido, reduzir o tamanho das formas farmacêuticas administradas pode ser uma estratégia tecnológica promissora para superar o tempo de trânsito acelerado. Ao diminuir o tamanho, as partículas se comportam como em uma fase líquida, permanecendo um tempo maior na região afetada. Nesse contexto, surgem como alternativa os sistemas microparticulados, identificados como estratégias promissoras na administração de fármacos direcionados ao cólon. Apesar disso, as alterações fisiológicas e patológicas ocasionadas pelas DII em células e tecidos, na perda de funções de barreira, nos danos ao muco e nas alterações no equilíbrio da microbiota, devem ser investigadas em conjunto, facilitando o desenvolvimento de um sistema de liberação cólon-específico adequado (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação das DII

As principais doenças caracterizadas como DII são a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) (MOLODECKY *et al.*, 2012; OKA; SARTOR, 2020). Esses dois subtipos das DII apresentam diferenças entre si na extensão das regiões afetadas e nos sintomas mais comuns. A RCU se restringe às mucosas, podendo acometer o reto e parcialmente ou totalmente o cólon, condição essa conhecida como pancolite. É caracterizada por inflamações na região afetada, podendo evoluir para ulcerações locais (BARBOSA, 2018). Já a DC pode acometer, de forma descontínua, qualquer região do trato gastrointestinal (TGI) (BAUMGART; SANDBORN, 2012), com maior frequência o íleo e o cólon. Podem ocorrer surgimento de granulomas intestinais, estenoses e fístulas, padrão que não se verifica na RCU. Em casos mais avançados, alguns pacientes acometidos pela DC podem apresentar quadros de psoríase, erosões no epitélio, ulcerações e fibrose (ABRAHAM; CHO, 2009; KOTLA *et al.*, 2018).

Com a progressão da doença, o paciente acometido não consegue manifestar reação imunológica satisfatória para se defender dos antígenos que agridem o local exposto (CARVALHO *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2021). O curso da doença pode ser imprevisível, mas geralmente é marcado por períodos alternados de ocorrência e remissão, podendo exigir hospitalização. Risco de desenvolvimento de câncer colorretal também está associado à ocorrência de retocolite ulcerativa (BRENTNALL, 2003; LEE *et al.*, 2019). A doença foi descrita como dispendiosa e de cura desconhecida (KESHARWANI *et al.*, 2018). O avanço das DII provoca mudanças evidentes na fisiologia das regiões afetadas. Uma delas é a redução nos valores de pH, de 6,0 a 7,2 de um cólon normal, para a faixa de 2,3 a 5,5 para o cólon acometido. Também foram relatadas mudanças enzimáticas no meio, com redução da microbiota, como as espécies bacteroides, bifidobactéria e *Escherichia coli*. Por sua vez, parece evidente um aumento de Eubacterium, além da aceleração do trânsito intestinal colônico com ocorrência de diarreia (KOTLA *et al.*, 2018). Ainda, é importante destacar que tal desequilíbrio na microbiota, tecnicamente conhecido por disbiose, é intensificado com o uso crônico de medicações destinadas ao tratamento das DII.

2.1.2 Retocolite ulcerativa (RCU)

A RCU foi reconhecida como uma doença pela primeira vez em 1859 por Samuel Wilks (WILKS, 1859). Caracteriza-se por inflamação difusa do intestino grosso, restrita à mucosa e submucosa e limitada ao cólon e reto. O envolvimento da mucosa é contínuo e ascendente, e a transição entre tecidos afetados e normais é bem demarcada (FUMERY *et al.*, 2018). A classificação da RCU varia de acordo com a sintomatologia, conforme mostrado na Figura 1. Dependendo da extensão do cólon afetado, a colite é classificada como proctite ou colite esquerda, ambas as condições afetando partes do cólon, ou pancolite, afetando todo o cólon. A proctite afeta cerca de 30 a 60% dos pacientes com RCU e a colite esquerda é observada na faixa entre 16 e 45% das pessoas afetadas. Proctite é a situação em que a colite acomete o reto, associada ou não a sangramento retal e tenesmo. A colite esquerda pode afetar o reto, o sigmoide e o cólon descendente, e está associada a diarreia sanguinolenta e cólicas abdominais intensas. Finalmente, a colite extensa (pancolite) é a condição em que a colite afeta todo o órgão e está presente em 15 a 35% dos pacientes. Inclui todas os sintomas acima, além de fadiga e febre (UNGARO *et al.*, 2017).

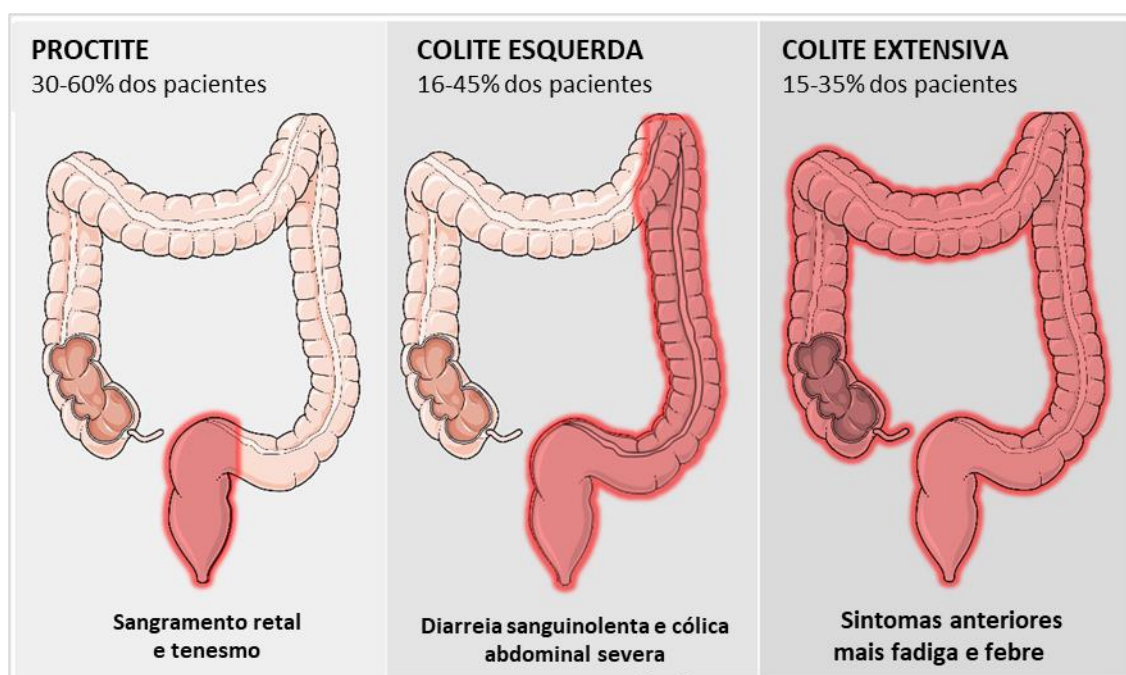


Figura 1. Classificação da RCU com incidência e principais sintomas. Fonte: LOPES *et al.*, 2023.

A principal característica da pancolite é a diarreia com rápido fluxo de conteúdo intestinal através do cólon inflamado causando lesões ulcerativas na parede interna deste órgão. As crises de diarreia podem ser pós-prandiais ou mesmo noturnas, acompanhadas

de sangramento retal, dor abdominal, febre, emagrecimento, fadiga, tenesmo (sensação de evacuação incompleta) e mal-estar geral (BAUMGART; SANDBORN, 2007; BOIRIVANT; COSSU, 2012; FLYNN; EISENSTEIN, 2019; FURMERY *et al.*, 2018). Quanto maior a gravidade da inflamação, maior a quantidade de diarreia, uma mistura de sangue e fezes (FLYNN; EISENSTEIN, 2019). Casos mais graves de RCU, envolvendo sangramento intenso, ocorrem em cerca de 10% dos pacientes com colectomias urgentes, e cerca de 1% de todas as pessoas afetadas apresentam pelo menos uma ocorrência de sangramento maciço, que pode exigir intervenção cirúrgica (BECKER, 1999). As principais complicações da RCU compreendem sintomas como megacólon tóxico, enterorragia e colite aguda grave (FUMERY *et al.*, 2018). Riscos mais altos de desenvolver câncer colorretal também estão associados à RCU (BRETNALL, 2003; LEE *et al.*, 2019), que pode aumentar em 2,2% em casos gerais de DII e 7,0% em casos de RCU de longo prazo (HARTWIG *et al.*, 2021).

2.1.3 Doença de Crohn (DC)

A DC foi relatada pela primeira vez em 1932 por Burrill B. Crohn, Leon Ginzburg e Gordon D. Oppenheimer (CROHN *et al.*, 1932). A DC pode atingir de forma descontínua qualquer região do TGI, desde a boca até o ânus, mais frequentemente o íleo e o cólon (BAUMGART; SANDBORN, 2012). Os sintomas mais comuns são episódios recorrentes de diarreia, febre, dor abdominal intensa e perda de peso, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (STEVENS; LOWE, 2002).

No início da DC, há hipertrofia da mucosa e submucosa intestinal, que modifica as pregas transversais normais, alterando o aspecto de úlceras hemorrágicas, que evoluem para fissuras. Na fase crônica há edemas na submucosa e úlceras fissuradas (STEVENS; LOWE, 2002). Assim, a DC causa alterações histológicas, formação de edema, redução das células produtoras de muco, hiperplasia das criptas intestinais, erosões, ulcerações profundas e agregados linfóides (ROBBINS; COTRAN, 2001). Em casos de complicações, podem ocorrer granulomas intestinais, fístulas, estenoses, abscessos (HARTWIG *et al.*, 2021) e perfuração intestinal, padrão que não é observado na RCU. Na DC, o aumento da atividade das células T auxiliares 1 (Th1) e 7 (Th17) leva à inflamação disfuncional e altera a resposta do sistema imunológico intestinal, resultando na liberação excessiva de citocinas como TNF-alfa, interferon-gama, IL-12, IL-3 e IL-17 (Pinho, 2008). Portanto, um estímulo ambiental em uma pessoa com predisposição genética para DC pode induzir um desequilíbrio imunológico de Th1 ou 17 em relação às

células T reguladoras (células Treg), situação que pode favorecer o aparecimento da doença (GOMES *et al.*, 2018).

2.2 Incidência e prevalência das DII no mundo

As DII apresentam distribuição global. Diante disso, a epidemiologia é bastante utilizada, referindo-se à frequência e distribuição da doença em populações específicas (WALDMAN; ROSA, 1994). Os parâmetros utilizados são incidência e prevalência (SZKLO, 2002). A incidência mede o número de casos novos que ocorrem em uma população de indivíduos, inicialmente saudáveis, durante um determinado período (WAGNER, 1998), e a prevalência a proporção de indivíduos afetados em uma população em um determinado período de tempo. A prevalência pode ser entendida como uma fotografia ou registro pontual em um intervalo de tempo (SZKLO, 2002), referindo-se a casos novos e existentes da doença na população. No caso da RCU, a incidência e prevalência podem ser observadas nas Figuras 2 e 3.

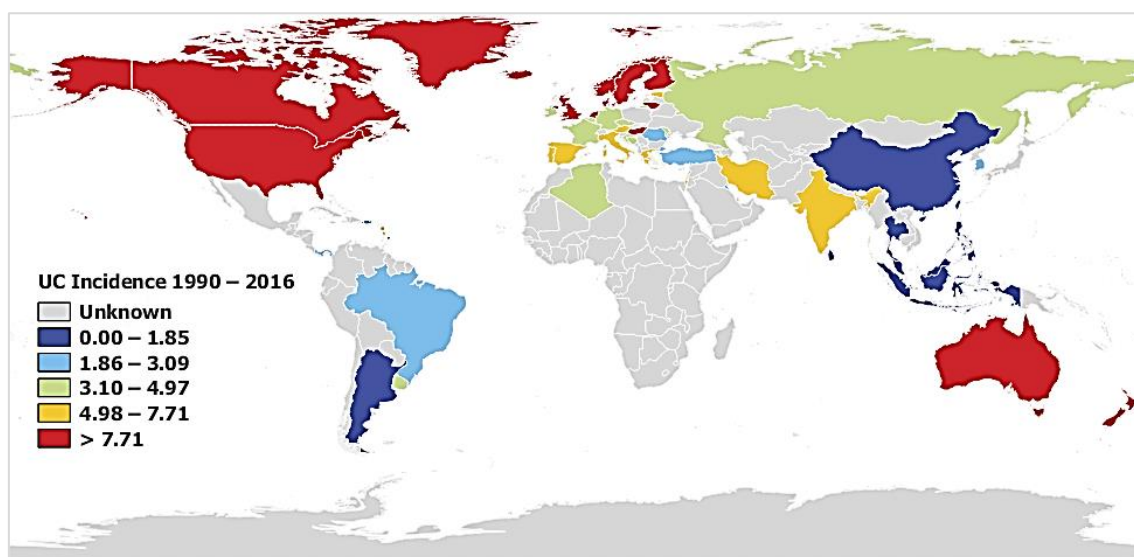


Figura 2. Incidência de RCU no mundo. Fonte: KAPLAN, 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. 2015. Disponível em https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/IBDG2016r/UCinc_G.html. Acesso em 23 de setembro de 2022.

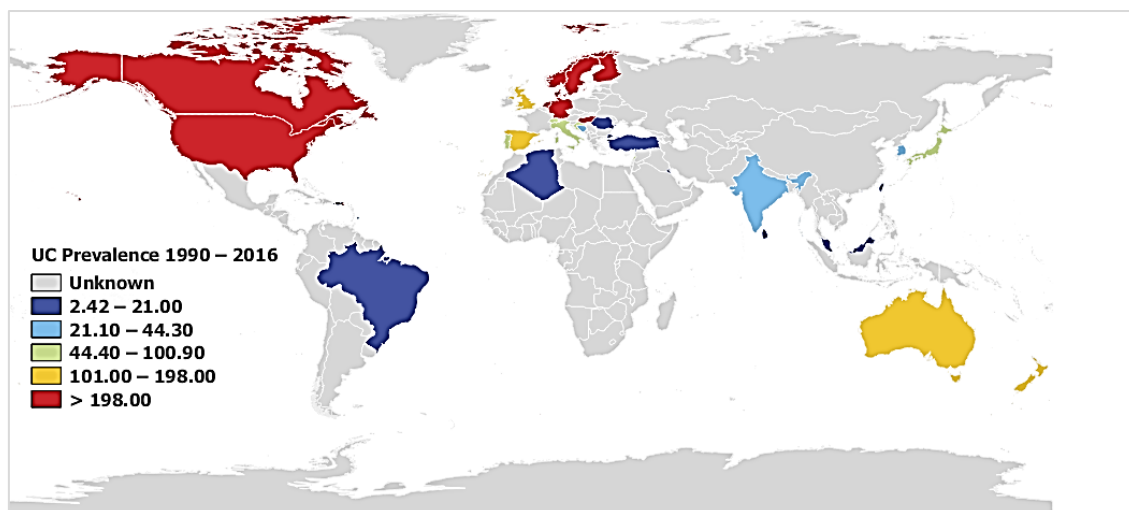


Figura 3. Prevalência de RCU no mundo. KAPLAN, 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. 2015. Disponível em https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/IBDG2016r/UCpre_G.html. Acesso em 23 de setembro de 2022.

A evolução epidemiológica das DII pode ser separada em quatro estágios: emergência dos casos, aceleração da incidência, agravamento de prevalência e equilíbrio de prevalência. A emergência de casos é representada por relatos de casos esporádicos. A aceleração na incidência ocorre ao aumentar, mantendo-se a prevalência relativamente baixa. O agravamento da prevalência reflete um aumento constante na população que vive com DII, apesar da estabilização ou mesmo de um declínio na incidência. Em 2020, os países em desenvolvimento estavam na fase de emergência, os países recém industrializados estavam na fase de aceleração da incidência e as regiões ocidentais estão na fase de prevalência agravada. As regiões ocidentais acabaram por fazer a transição para a fase de equilíbrio de prevalência, na qual a prevalência acelerada se estabiliza à medida que a população com DII envelhece (KAPLAN; WINDSOR, 2021).

Estudos sugerem que indivíduos caucasianos e habitantes de regiões urbanas e industrializadas são mais propensos a serem acometidos por doenças autoimunes em geral, incluindo DII (SOUZA *et al.*, 2021). Em países altamente industrializados da América do Norte e Europa Ocidental, a DII é considerada um grave problema de saúde pública (KESHARWANI *et al.*, 2018; LEDDIN *et al.*, 2014).

Desde o primeiro reconhecimento da RCU em 1859 (WILKS, 1875) e da DC em 1932 (CROHN *et al.*, 1932), suas incidências aumentaram substancialmente na Europa, Reino Unido e América do Norte (NG *et al.*, 2017). Em meados do século 20, a incidência aumentou progressivamente na América do Norte, Austrália e Nova Zelândia. Em 2015,

a prevalência de DII no mundo ocidental foi de aproximadamente 0,5% da população geral (KAPLAN, 2015) e, em 2017, estimou-se um total de 6,8 milhões de pessoas afetadas, 57% mulheres e 43% homens (HARTWIG *et al.*, 2021). Em 2018, aproximadamente 70.000 novos casos foram registrados por ano em todo o mundo (KESHARWANI *et al.*, 2018). Mais recentemente, foi relatado que em países da América do Norte, da Europa e da Oceania estão registrando uma estabilização na incidência, mas uma prevalência cada vez maior (KAPLAN; WINDSOR, 2021; WINDSOR; KAPLAN, 2019).

As DII afetaram aproximadamente 1,4 milhão de pessoas nos EUA, com as maiores taxas de incidência na faixa etária de 15 a 30 anos, durante os anos 80 e 90 (ABRAHAM; CHO, 2009; LOFTUS; SANDBORN, 2002). Em 2019, estimava-se que mais de dois milhões de norte-americanos viviam com DII, e é previsto que a população de acometidos se aproxime dos quatro milhões até próximo de 2030 (COWARD *et al.*, 2019; WINDSOR, KAPLAN, 2019), sendo normalmente diagnosticada em indivíduos entre 18 e 35 anos de idade (WINDSOR, KAPLAN, 2019). De 2012 a 2017, a incidência anual variou de 15,7 casos por 100.000 pessoas na América do Norte a 24,3 na Europa (MOLODECKY *et al.*, 2012; SHIVASHANKAR *et al.*, 2017). Observou-se que mesmo em áreas tradicionalmente de baixa prevalência, como Brasil (QUARESMA *et al.*, 2019), Coreia do Sul e China (KHAN *et al.*, 2019), houve aumento da incidência de DII após processos de urbanização e desenvolvimento (LOGAN; BOWLUS, 2010). Países recém-industrializados na Ásia, África, América do Sul e Oriente Médio também documentaram um aumento progressivo da DII nas últimas décadas (KAPLAN, 2015; KAPLAN, WINDSOR, 2021; UNGARO *et al.*, 2017; WINDSOR, KAPLAN, 2019), em taxas superiores a 14,9% (PORTER *et al.*, 2020), muito acima das taxas da Europa e América do Norte, o que é mais uma evidência de que a ocorrência de DII está associada às atividades de industrialização e urbanização (MOLODECKY *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2017) e provavelmente como resultado da exposição a uma taxa geralmente aumentada de poluição do ar (ZHANG; LI, 2014).

2.3 Incidência e prevalência das DII no Brasil

Pelo fato de as DII não serem de notificação obrigatória pelos agentes de saúde e não existir um banco de dados integrado de pacientes portadores da patologia, dados de incidência e prevalência são incompletos, limitando a estudos epidemiológicos abrangentes a nível nacional (ELIA *et al.*, 2007; GUEDES *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*,

2021). Essas enfermidades acometem pessoas economicamente ativas na faixa etária entre os 20 e 69 anos de idade (BRITO *et al.*, 2020) com alta morbidade. Os períodos de agravamento, as inúmeras complicações e o aspecto crônico dessas doenças tornam a evolução e o tratamento complexos e custosos, gerando impactos psicológicos e econômicos ao paciente, sua família e à sociedade (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Maior número de internações por DII tem sido verificado nas regiões Sul e Sudeste do que nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sabidamente menos industrializadas. Enquanto o custo médio das internações na Região Norte é de R\$ 467,33, no Sudeste é de R\$ 834,19, refletindo a maior quantidade de recursos diagnósticos e terapêuticos disponíveis nesta última região (GUEDES *et al.*, 2022).

No Brasil, houve um aumento acentuado na incidência de DC nos últimos 40 anos. A incidência, que era de 0,08 em 1988, aumentou para 5,48 em 2015, por 100.000 pessoas (WINDSOR; KAPLAN, 2019). Estudos indicam que essas enfermidades não são tão raras como se acreditava há alguns anos, com aumento da incidência nas últimas décadas, com forte associação ao grau de desenvolvimento socioeconômico regional. Em 2007, Elia e colaboradores conduziram análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com DII, internados em um hospital universitário do Rio de Janeiro. O tempo médio de internação esteve em 6,5 dias. Do total de pacientes, 93% eram oriundos de um polo industrial próximo à capital e todos possuíam saneamento básico nas residências. Além disso, nenhum paciente era analfabeto e 76,8% haviam completado o ensino fundamental (ELIA *et al.*, 2007). No tocante a renda mensal, verificou-se que 41,9% (18 famílias) dos acometidos recebiam até 1 salário-mínimo, 41,9% recebiam entre 1 e 5 salários mínimos, e apenas 2,3% (1 família) recebia entre 6 e 10 salários mínimos. Observou-se, assim, grande impacto das DII na renda familiar, reduzindo o ganho financeiro dos pacientes, afastados do emprego por conta da internação, sobrecarregando sua família. Segundo os autores, os elevados custos econômicos do tratamento das DII se devem ao uso prolongado de medicamentos, necessidade de complexos e inúmeros exames diagnósticos, internações hospitalares frequentes e, muitas vezes, necessidades de realização de procedimentos cirúrgicos (ELIA *et al.*, 2007).

Em 2015, Parente e colaboradores realizaram um estudo retrospectivo em um hospital no estado do Piauí, nordeste do Brasil, entre janeiro de 2011 e dezembro de 2012. Foram avaliados 252 pacientes com DII, dos quais 152 (60,3%) pacientes apresentavam RCU e 100 (39,7%) pacientes estavam acometidos por DC. A proporção de mulheres

para homens foi de 1,3:1,0 com idade média de 35,2 anos. Os pesquisadores também observaram que a maioria dos pacientes era parda (171; 67,9%), possuía ensino superior (157; 62,4%), residia em zona urbana (217; 86,1%) e tinha menos de 40 anos (97; 62,5%). Verificou-se que a taxa de ocorrência anual aumentou de 0,08 para 1,53 casos/105 habitantes/ano durante o período do estudo, e a taxa de prevalência foi de 12,8 casos/105 habitantes em 2012. Os pesquisadores concluíram que houve um aumento notável na frequência de DII na área de estudo nas últimas duas décadas precedentes ao estudo (PARENTE *et al.*, 2015).

Em 2019, Moreira e colaboradores analisaram 162.894 casos notificados em todo o país no período de 2008 a 2017. Maiores incidências foram verificadas nas regiões Sul e Sudeste e menores na região Norte (MOREIRA *et al.*, 2019). Em um outro estudo, Vilela e colaboradores analisaram dados de 2017 a 2020 obtidos do Sistema Único de Saúde (SUS). Os autores detectaram aumento de notificações no período entre 2017 e 2019, com queda em 2020 devido, a subnotificações causadas pela pandemia do novo coronavírus Sars-Cov-2 (VILELA *et al.*, 2022), muito provavelmente desestimulando as pessoas acometidas a procurar auxílio médico. De acordo com Vilela e colaboradores, as grandes diferenças regionais observadas no Brasil também podem ser devidas a diferenças entre regiões no que diz respeito à facilidade de acesso ao sistema de saúde e à qualidade de atendimento médico (VILELA *et al.*, 2022).

2.4 DII no estado de São Paulo

No estado de São Paulo, entre 1986 e 1990, a incidência geral de DII era de 1,0 por 100 mil pessoas. De 2001 a 2005 os dados existentes estão separados por classe de DII, com a incidência por 100 mil habitantes de 4,5 acometidos por RCU e 3,5 por DC (VICTORIA *et al.*, 2009). No período compreendido entre 2008 e 2017, foram identificados 162.894 casos, sendo 59% RCU e 41% DC, com média de idade de 42 anos. Do total de acometidos, 59% eram mulheres. A prevalência de DII foi de 80 por 100 mil habitantes, sendo 36 para DC e 46 para RCU por 100 mil habitantes, respectivamente. A maior prevalência de DII foi no estado de São Paulo (144/100 mil habitantes) e a menor foi no estado do Amapá (6/100 mil habitantes). Os dados foram colhidos a partir do DATASUS e revelaram que, em 2017, as taxas de entrada de DII para a população total foram 3 vezes maiores que as estimadas para 2008 (MOREIRA *et al.*, 2019).

Em 2020, Brito e colaboradores analisaram dados do Ministério da Saúde sobre interações por DC e RCU, correspondentes ao período de 2009 a 2019. De um total de

46.546 internações, o maior número de casos ocorreu na região sudeste com 21.100 internações e, dessas, 61,51% corresponderam ao Estado de São Paulo. Houve tendência de aumento da incidência ao longo do tempo, padrão similar ao de outros países (BRITO *et al.*, 2020).

Em um outro trabalho conduzido no Estado de São Paulo, entre 2012 e 2015, foi verificado que 53,83% dos pacientes acometidos por DII apresentavam RCU. Foram estudados 22.638 pacientes, de 0 a 97 anos, de ambos os sexos. A taxa média de incidência, para a RCU, foi de 7,16 casos novos por 100.000 habitantes/ano, enquanto a prevalência foi de 28,3 casos em 100.000 habitantes, representando um aumento em relação a anos anteriores (Fig. 4). As faixas etárias que apresentam maiores taxas de incidência e prevalência foram verificadas entre 20 e 60 anos, com maior acometimento do sexo feminino, sendo observadas em grandes centros urbanos (GASPARINI, 2018).

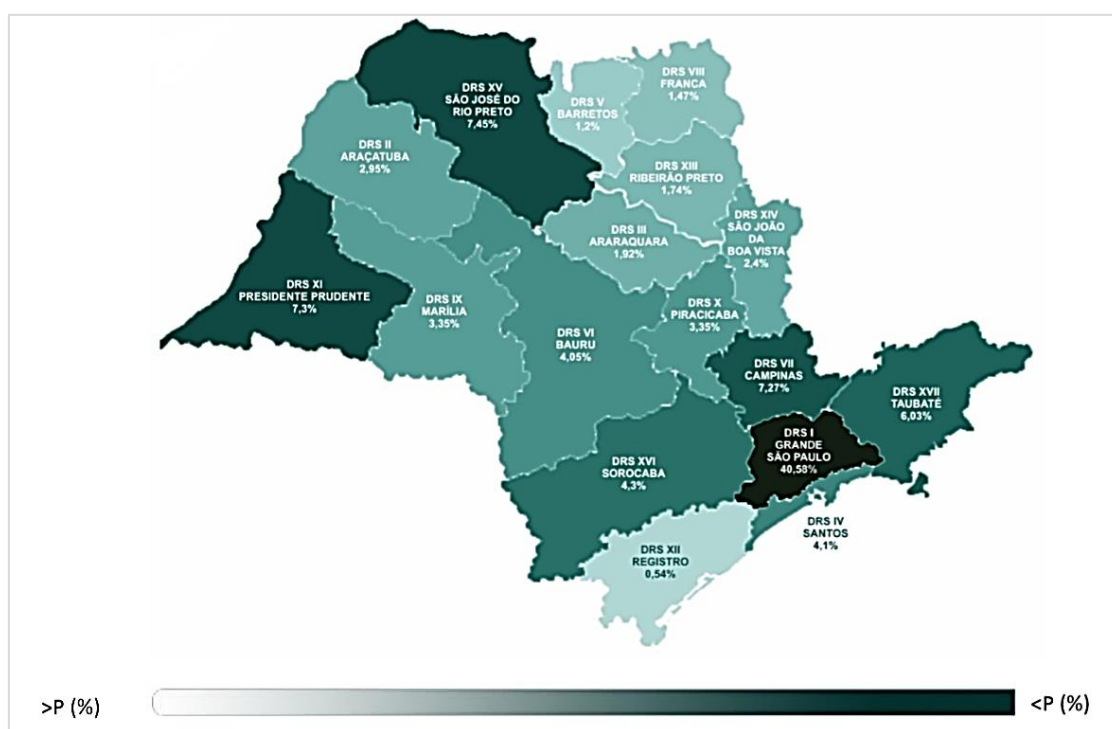


Figura 4. Distribuição percentual de pacientes acometidos por RCU, por regiões do Estado de São Paulo (Brasil), entre os anos de 2012-2015. Fonte: GASPARINI, 2018.

2.5 Fatores predisponentes

Vários fatores ambientais, fisiológicos, hábitos do paciente e psicológicos estão associados à ocorrência de DII, conforme descrito na Figura 5.

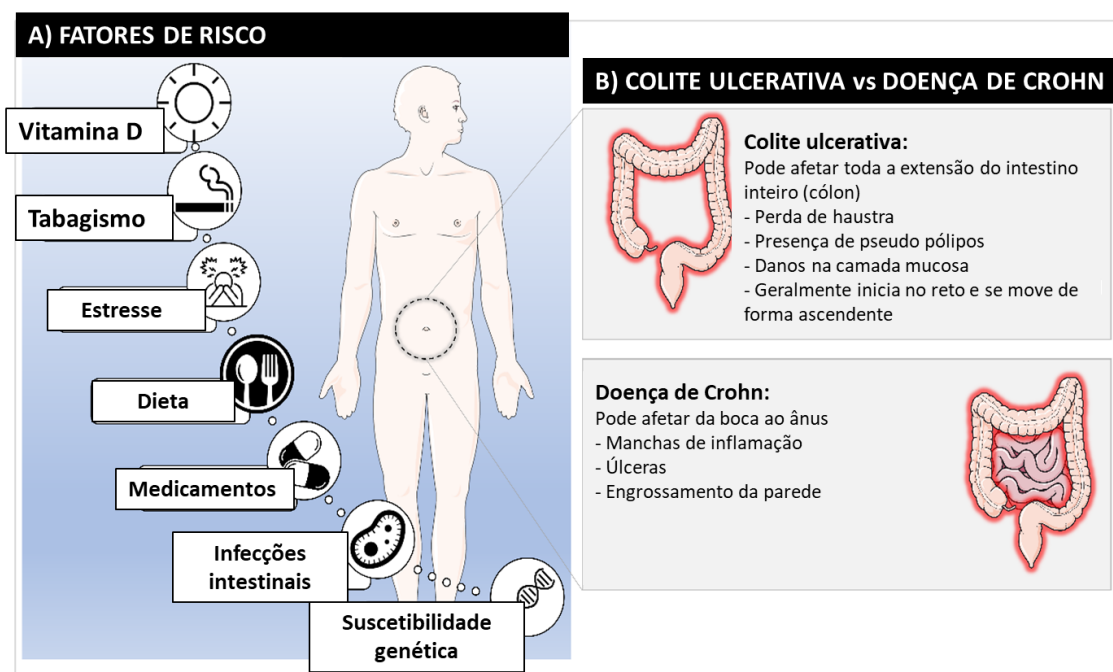


Figura 5. (A) fatores de risco para DII e (B) principais diferenças entre RCU e DC. Fonte: LOPES *et al.*, 2023.

Vários fatores físicos, fisiológicos e psicológicos estão associados à ocorrência de DII. Embora de etiologia desconhecida, há evidências sugerindo que a patogênese da DII está associada à suscetibilidade genética, resposta imune individual, ambiente externo e microbiota intestinal (ANANTHAKRISHNAN, 2015; ZHANG; LI, 2014), conforme Figura 5A. Como fatores predisponentes, condições sanitárias e higiênicas, interação do ambiente com a genética do paciente, ocorrência de infecções intestinais por helmintos, mudanças bruscas na dieta, uso de medicamentos como anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal, anti-inflamatórios não esteroides são fatores predisponentes citados como fatores predisponentes, estresse físico e mental (ABRAHAM; CHO, 2009; DANESE *et al.*, 2004; UNGARO *et al.*, 2017) e tabaco (Fig. 2) (ANANTHAKRISHNAN, 2015; BOIRIVANT; COSSU, 2012; ZHANG; LI, 2014).

O déficit de vitamina D, importante no metabolismo do cálcio, também pode favorecer o aparecimento de DII (ANANTHAKRISHNAN, 2015), a atividade física, ao contrário do sedentarismo, reduz o risco de DC em 44%. Os distúrbios do sono podem ser determinantes no desenvolvimento da fase ativa da doença (ANANTHAKRISHNAN, 2015), e a poluição do ar, que está relacionada ao aumento dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes, contribui para a ocorrência de DII (ZHANG; LI, 2014). Além disso, mudanças bruscas na dieta, uso de medicamentos como anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal, anti-inflamatórios não esteroides,

exercícios físicos e estresse mental (UNGARO *et al.*, 2017) e consumo de tabaco (ANANTHAKRISHNAN, 2015; ZHANG; LI, 2014) são citados como fatores predisponentes (ANANTHAKRISHNAN, 2015; UNGARO *et al.*, 2017; ZHANG; LI, 2014).

Historicamente, a década de 1930 foi a época em que gastroenterologistas e psiquiatras sugeriram pela primeira vez que eventos e experiências emocionais da vida poderiam estar relacionados à exacerbação de sintomas intestinais (KEEFER *et al.*, 2008), bem como em recidivas (ARAKI *et al.*, 2020). O processo de estresse pode estimular a alteração das funções motoras, secretoras e sensoriais do TGI, bem como os limiares para percepção da dor, favorecendo a permeabilidade intestinal e a exacerbação inflamatória. Acredita-se que em quase 75% dos pacientes com DII, eventos de estresse ou a própria personalidade dos pacientes sejam os principais contribuintes para o desenvolvimento dos sintomas (SAJADINEJAD *et al.*, 2012).

Entende-se que as consequências do estresse psicológico para a saúde intestinal são mediadas por vias neuroendócrino-imunes relacionadas ao eixo cérebro-intestino, especificamente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático, que podem interagir diretamente com o sistema imunológico (SAJADINEJAD *et al.*, 2012), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de macrófagos, alteração da permeabilidade e microbiota intestinal (ANANTHAKRISHNAN, 2015; ZHANG; LI, 2014). Não apenas os perfis das citocinas IL-1 β , IL6, IL10, IL4 e TNF α , mas também do hormônio cortisol (BERNSTEIN *et al.*, 2010; MAWDSLEY; RAMPTON, 2005) são alterados pelo estresse. Os mastócitos da mucosa podem ser ativados pelo estresse, graças à sua comunicação com os neurônios do TGI, por meio da liberação de eicosanoides, serotonina e IL-6, situações que podem favorecer o aparecimento de DII (SAJADINEJAD *et al.*, 2012).

O estresse psicológico estimula a secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF) das partes central e periférica do SNC (hipotálamo e córtex adrenal, respectivamente). A CRF central regula o sistema ACTH-cortisol enquanto a CRF periférica influencia diretamente a motilidade gastrointestinal. Em geral, o CRF, por meio do estresse como gatilho, inibe a motilidade gastrointestinal superior e estimula a motilidade do cólon, de modo que sintomas como dor abdominal e alteração na função intestinal podem ocorrer nas DII sem atividade significativa da doença (SAJADINEJAD *et al.*, 2012). Além disso, as DII e o estresse podem estar associados a alterações estruturais e funcionais nas estruturas límbicas que podem resultar em exacerbação dos

sintomas, devido à regulação das vias autonômicas e endócrinas do eixo cérebro-intestino (AGOSTINI *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2021). O estresse psicológico também pode aumentar a permeabilidade intestinal, possivelmente como resultado de alterações no sistema nervoso colinérgico e na função dos mastócitos da mucosa. Essa permeabilidade alterada reduz a função de barreira da mucosa e altera a interação hospedeiro-bactéria (SAJADINEJAD *et al.*, 2012).

2.6 DII e outras doenças

Em geral, pode-se supor que qualquer vírus (incluindo o novo SARS-CoV-2) infectando os tecidos intestinais e/ou entrando no corpo do hospedeiro, por meio de receptores localizados nos enterócitos intestinais, pode ser um gatilho para o aparecimento de DII em indivíduos com uma predisposição genética para desenvolver DII (DVORNIKOVA *et al.*, 2021).

A entrada do novo coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em uma célula hospedeira por meio de sua ligação à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) no intestino induz uma resposta inflamatória excessiva com agravamento da doença (DVORNIKOVA *et al.*, 2021). As vias intracelulares e extracelulares para a existência de uma resposta imune foram estabelecidas combinando o resultado da infecção com SARS-CoV-2 e o desenvolvimento e progressão da DII. Duas vias moleculares intracelulares para a transferência de material genético para a célula hospedeira endossômica e membrana citoplasmática foram consideradas, cada uma levando à ativação de respostas imunes inatas e adaptativas, formação de uma reação inflamatória e aumento da expressão de pró-citocinas inflamatórias. Após uma infecção pelo vírus SARS-CoV-2, a célula Th1 produz uma série de citocinas de alto nível, incluindo IL-2, IL-7, IL-6, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A e TNF- α , que leva ao desenvolvimento de uma “tempestade de citocinas” (WU *et al.*, 2020), que pode afetar o curso da DII em pacientes com COVID-19 por meio de um aumento da inflamação descontrolada e progressão da DII (DVORNIKOVA *et al.*, 2021).

2.7 Imunopatogênese das DII

Prejuízos na integridade da barreira epitelial intestinal podem ser o primeiro passo para o aparecimento de DII. Em indivíduos imunologicamente saudáveis, a comunicação entre as células do epitélio do sistema imune inato e adaptativo garante a homeostase intestinal (KHOR *et al.*, 2011). O epitélio, composto por células e mucosa intestinal, é a

primeira barreira de defesa do organismo contra a invasão de patógenos (ZHANG *et al.*, 2020). Por meio de processos de sinalização, o epitélio permanece em contato com a microbiota intestinal em estado de tolerância imunológica, que é mantido por amostragem constante por meio de células apresentadoras de antígenos (APCs) (GUO *et al.*, 2020) de material luminal do intestino, como como antígenos, que desencadeiam a resposta imune, regulada pelos linfócitos T (células T reg) (HARTWIG *et al.*, 2021). Estudos em modelos animais indicam que o equilíbrio entre as células Th17 e Treg, responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, é essencial para a homeostase intestinal e é diretamente afetado pelo conteúdo da microbiota normal (KHAN *et al.*, 2019).

Em um indivíduo saudável, a camada epitelial é renovada a cada dois ou três dias. A renovação inclui apoptose e descamação dos enterócitos das regiões criptográficas do cólon e das estruturas das vilosidades do intestino delgado. Se esse processo de renovação for interrompido, a integridade epitelial pode ser prejudicada e pode ocorrer inflamação crônica (WALLACE *et al.*, 2014). Variações genéticas, imunológicas, mas também microbiológicas, afetam o equilíbrio de renovação, com distúrbios nesse processo contribuindo para o aparecimento de distúrbios gastrointestinais, como as DII (KHOR *et al.*, 2011). Assim, defeitos na integridade epitelial podem favorecer a patogênese da DII pela livre passagem de microrganismos e desencadear o início de uma resposta imune (WALLACE *et al.*, 2014).

Além dos enterócitos, a microbiota sinaliza as células imunes inatas na lâmina própria por meio dos receptores de sinal de moléculas de reconhecimento de padrões (WALLACE *et al.*, 2014). Para viabilizar esse mecanismo, o reconhecimento de antígenos microbianos por meio da ação de receptores semelhantes a *tolls* (TLRs) é fundamental. Além desses receptores, a presença de receptores citoplasmáticos do tipo NOD é essencial para iniciar a fagocitose desses microrganismos (ROGLER *et al.*, 2018). Falhas nesse mecanismo resultam em deficiências na eliminação de bactérias e seus produtos, levando a invasões microbianas patogênicas e progressão da DII (ZHANG; LI, 2014). Esses sinais demonstraram ser necessários para a homeostase normal e resistência a lesões. Citocinas, como interferon-gama (IFN- γ), interleucinas IL-17 e IL-22, organismos patogênicos e bactérias comensais afetam o epitélio regulando a integridade e a função da barreira (WALLACE *et al.*, 2014). Assim, a evolução da RCU está associada a alterações na homeostase imune do intestino decorrentes de defeitos na barreira mucosa da região afetada, o que aumenta a permeabilidade tecidual, levando à

secreção de endotoxinas e translocação bacteriana, contribuindo para o estabelecimento da inflamação crônica (KHOR *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2020).

As barreiras epiteliais colônicas também podem ser danificadas por uma diminuição da resistência epitelial e das proteínas da junção paracelular, como claudinas e ocludinas. Consequentemente, a permeabilidade a íons e água nos locais lesados aumenta. O aparecimento de lesões, apoptose e necrose da mucosa está relacionado ao aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1B e IFN- γ . O processo de apoptose pode permitir erosões, úlceras, vazamentos locais, aumento da transcitose e aumento da captação de antígenos e bactérias (KOTLA *et al.*, 2018). Na fase de exacerbação das DII, ocorre aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (COSTELLO *et al.*, 2017). Além disso, distúrbios nas células epiteliais intestinais, como as células de Paneth (CADER & KASER, 2013), que produzem substâncias antimicrobianas e fatores de crescimento (WALLACE *et al.*, 2014), estão relacionados a importantes fatores de risco genético para DII e podem levar a inflamação intestinal (CADER & KASER, 2013).

Existem muitos fatores que explicam o agravamento das DII. A via de sinalização TLR4, um subtipo de receptores *toll-like*, influencia esse processo. Lu *et al.* relataram que o TLR4 causa efeitos destrutivos nos tecidos epiteliais intestinais e ulceração em pacientes com RCU, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias que agravam a inflamação intestinal (LU *et al.*, 2018). A inflamação, associada à via de sinalização TLR4, pode favorecer a ativação da microbiota intestinal oportunista e patogênica, e mudanças na diversidade da microbiota. Portanto, podem levar a uma intensa reação, estimulando a expressão de citocinas e induzindo a progressão da doença (DVORNIKOVA *et al.*, 2021).

2.7.1 O sistema imunológico intestinal (SII)

O SII evoluiu na presença de microrganismos, como mostra a Figura 6. Essa interação fornece proteção contra uma ampla gama de agentes infecciosos, necessários para o desenvolvimento normal das funções imunes (CADER & KASER, 2013). As células de defesa da mucosa intestinal toleram as bactérias residentes da microbiota, mas defendem o organismo contra a invasão de microrganismos patogênicos (ZHANG *et al.*, 2020). Vários componentes do sistema imune da mucosa estão envolvidos na patogênese da DII, como as células epiteliais intestinais, células linfóides inatas, células inatas (macrófagos/monócitos, neutrófilos, células dendríticas e natural killer) e células

adaptativas (células T e B células) com seus mediadores secretados (citocinas e quimiocinas) (WALLACE *et al.*, 2014). Células como macrófagos e NK produzem citocinas durante as respostas imunes inatas, ao passo que são produzidas por linfócitos T na imunidade adaptativa. Portanto, a resposta imune é dividida em duas classes - as respostas imunes inata e adaptativa.

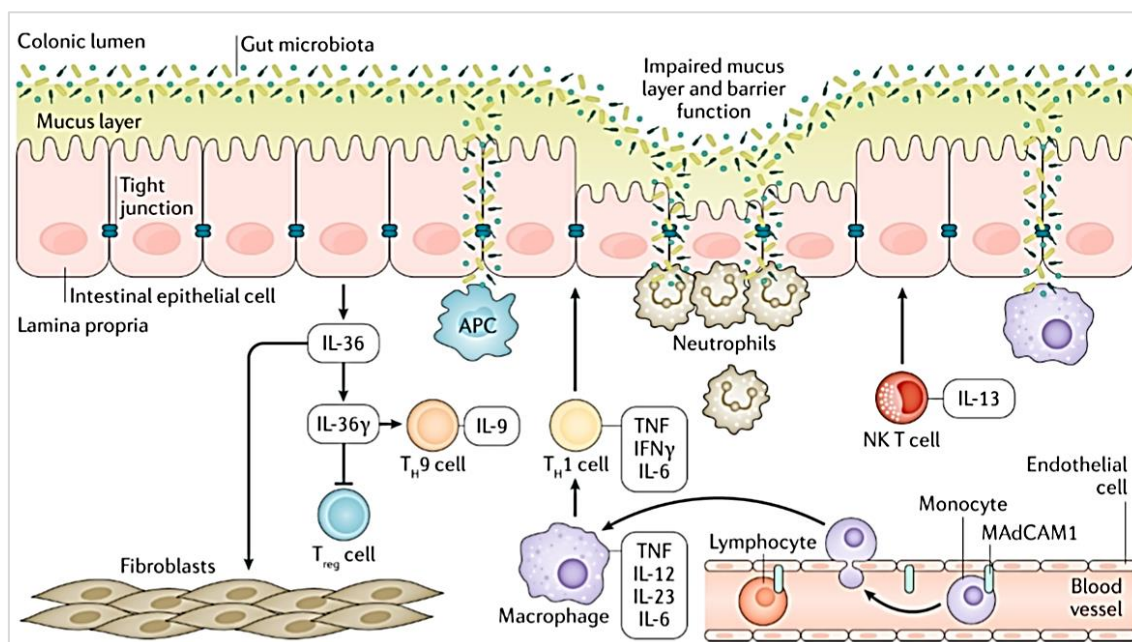


Figura 6. Esquema ilustrativo mostrando o dinamismo entre o sistema imunológico e a microbiota intestinal. KOBAYASHI *et al.*, 2020, com permissão.

2.7.2. O sistema imunológico inato (SIIn)

O SIIn é a primeira linha de defesa, fornece uma resposta protetora imediata contra infecções e também auxilia no início da resposta imune adaptativa. É inespecífico e não confere imunidade duradoura (memória) (SCHOULTZ & KEITA, 2019; ZHANG; LI, 2014). É composto pela barreira epitelial (células epiteliais intestinais), macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e *natural killer* (células NK), eosinófilos e basófilos, que atuam em conjunto para iniciar a inflamação através da secreção de citocinas, quimiocinas e agentes antimicrobianos (WALLACE *et al.*, 2014). A imunidade inata começa com o reconhecimento de antígenos microbianos por meio de receptores TLR e NOD-like (ZHANG; LI, 2014), o que leva à fagocitose de células e microrganismos, apresentação de antígenos e ativação do sistema imune adaptativo (WALLACE *et al.*, 2014). As células dendríticas podem conter e desencadear inflamação

através da ativação de células T e secreção de citocinas, respectivamente (CADER & KASER, 2013).

O conceito de inflamação pode ser entendido como uma sequência de eventos que desencadeiam aumento da temperatura local, dor, edema, dilatação capilar e eritema. Após o primeiro contato com o patógeno, células de defesa como macrófagos e mastócitos secretam substâncias como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas e fragmentos do complemento, que são mediadores inflamatórios, o que leva ao recrutamento de neutrófilos e proteínas plasmáticas em direção ao foco da infecção. Os mediadores promovem a vasodilatação dos vasos sanguíneos locais e auxiliam na quimiotaxia dos neutrófilos circulantes no sangue. A reação inflamatória clássica pode ser explicada pelo acúmulo de células e líquido na região da inflamação, edema, hipersensibilidade local e aumento da vermelhidão cutânea no local (DELVES *et al.*, 2013). A migração de neutrófilos do sangue para a mucosa colônica é um importante marcador de inflamação, e a extensão da infiltração de neutrófilos é diretamente proporcional à gravidade da DII (BRESSENOT *et al.*, 2015). Além disso, os macrófagos têm a função de manter a homeostase tecidual, regulando os processos de apoptose e produzindo fatores de crescimento. Em estudos feitos com camundongos que apresentaram colite induzida por DSS (sodium dextran sulfato), o número de macrófagos (células Mac2+) foi muito maior do que o número de neutrófilos (células MPO+), indicando que os macrófagos podem ter uma influência mais intensa na progressão da DII do que os neutrófilos (WANG *et al.*, 2017).

As células linfóides inatas (ILC) são um grupo de células imunes pertencentes à família das células efectoras hematopoiéticas, às quais pertencem as células NK (WALLACE *et al.*, 2014). As ILCs desempenham papéis nas barreiras superficiais do intestino, orquestrando a imunidade antimicrobiana, a remodelação tecidual e a inflamação. As células T auxiliares específicas do antígeno e as células NKT também contribuem para a inflamação intestinal (CADER & KASER, 2013). Os ILCs são entendidos como contrapartes inatas dos linfócitos T auxiliares, pois secretam citocinas como aquelas secretadas pelas células T auxiliares do sistema imunológico adaptativo. ILCs do Grupo 1 podem produzir citocinas associadas a células Th1, como IFN- γ ; ILCs do grupo 2 produzem citocinas Th2, como IL-5 e IL-13; e as ILCs do grupo 3 secretam citocinas do tipo Th17, como IL-17 e IL-22, sendo as ILCs do grupo 3 que desempenham um papel fundamental na inflamação das DII (WALLACE *et al.*, 2014). Além disso, os ILCs são mediadores da resposta inflamatória induzida por IL-23 no cólon (PORTER *et*

al., 2020), o que permite novas abordagens para estudos sobre a origem dos processos inflamatórios nas DII.

2.7.3. O sistema imunológico adaptativo (SIA)

O SIA é composto por linfócitos (células T e B) que, quando ativados, geram respostas efetoras, por meio de citocinas e anticorpos, respectivamente (WALLACE *et al.*, 2014). Ao contrário do SII, o SIA é altamente específico e confere imunidade duradoura (memória). A resposta imune adaptativa depende do número e tipo de linfócitos, sendo mais lenta que a resposta inata (SCHOULTZ & KEITA, 2019) e geralmente é mais eficaz em casos de infecção. Além da especificidade e diversidade de reconhecimento, é uma resposta especializada e apresenta tolerância a autoantígenos. Estas são características importantes da imunidade adaptativa.

Acredita-se que o SIA seja o principal contribuinte para a patogênese da DII (DE MATTOS *et al.*, 2015), sendo as células T as principais envolvidas na inflamação intestinal. Após a ativação, as células T virgens (Th0) se diferenciam em células Th1, Th2 ou Th17 por meio de células apresentadoras de antígeno. Esses três tipos de células alteram a homeostase intestinal e levam às DII. Eles aumentam o acesso de sinais imunoestimulantes ao tecido linfóide associado ao intestino e às células imunes residentes. Células imunes locais, incluindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos inatos, respondem secretando um coquetel de citocinas pró-inflamatórias para recrutar ainda mais células imunes. A não apresentação de antígenos leva a um aumento do processo infeccioso devido à não identificação do patógeno, estimulando uma reação inflamatória que danifica ainda mais o intestino (HARTWIG *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram que os linfócitos Th17 e outras células produtoras de IL-17 influenciam a inflamação intestinal. A IL-17 e a IL-22 podem estar relacionadas com a indução de colite, uma vez que iniciam e amplificam a inflamação local e ativam mecanismos contrarregulatórios direcionados às células epiteliais intestinais (DE MATTOS *et al.*, 2015). As células Th1 e Th17 são conhecidas por secretar citocinas pró-inflamatórias IL-17, IFN- γ e TNF que contribuem para a inflamação nas DII ao estimular a produção de TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 por macrófagos, células endoteliais e monócitos (PAZMANDI *et al.*, 2019). As células Th1 são induzidas por IL-12 e secretam IFN- γ , TNF- α e IL-12. As células Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Foi demonstrado que pacientes com RCU produzem quantidades aumentadas de IL-5 e têm células T natural killer (NKT) atípicas que secretam grandes quantidades de IL-13.

Entende-se que as respostas Th1/Th17 impulsionam a patogênese da DC, enquanto a RCU é impulsionada por respostas Th2, com alta IL-4, IL-5 e IL-13 (PORTER *et al.*, 2020; WALLACE *et al.*, 2014).

Existem subconjuntos de células Th, como células Th9 produtoras de IL-9, células Th22 produtoras de IL-22, células T auxiliares foliculares e células Treg. Além disso, pensava-se que as células Th, uma vez diferenciadas, raramente poderiam se diferenciar em outros subconjuntos Th, um conceito conhecido como plasticidade entre as células Th. Todos estes estão associados à patogênese das DII (WALLACE *et al.*, 2014). T-helpers produzem citocinas pró-inflamatórias através da via de sinalização NF- κ B. A célula Th17 produz as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-21, TNF- β e MCP-1, que atraem linfócitos e leucócitos da mucosa intestinal para o local da infecção (LI *et al.*, 2020).

Os avanços sugerem que as células Th17 emergiram como importantes contribuintes para a patogênese das DII (WALLACE *et al.*, 2014). As células Th17 são um subconjunto de células T auxiliares que são induzidas por IL-6 e TGF- β , expandidas por IL-23 e caracterizadas pela secreção de grandes quantidades de IL-17A, IL17F, IL-21 e IL-22. A família de citocinas IL-17 inclui seis membros: IL-17A-F. IL-17A e IL-17F são 50% semelhantes em sua estrutura de aminoácidos, enquanto IL-17B, IL-17C e IL17D têm menos homologia. Os principais efeitos pró-inflamatórios da IL-17A e IL-17F são a ativação de vários alvos celulares, incluindo o epitélio, endotélio, monócitos/macrófagos, fibroblastos e neutrófilos que causam a indução de TNF- α , IL-1B, quimiocinas (CXCL8, CXCL9, CXCL10), GM-CSF, G-CSF, IL-6 e metaloproteases. Existem dois subconjuntos principais de células Th17: células Th17 que produzem IL-17 e células Th1/Th17 que produzem IFN- γ e IL-17. Em comparação com o normal, os pacientes com RCU têm níveis aumentados de transcritos da mucosa intestinal de IL-17A e a lâmina própria contém números aumentados de células Th17 e Th1/Th17. Foi demonstrado que a IL-17A inibe diretamente as células Th1 e suprime o desenvolvimento da inflamação (WALLACE *et al.*, 2014). O papel proeminente das células Th17 nas DII está relacionado à secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22) que atuam em vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos e monócitos/ macrófagos, neutrófilos, culminando na indução da inflamação. Os linfócitos T reguladores, por outro lado, são o tipo de célula que equilibra as reações inflamatórias por meio da secreção de mediadores anti-inflamatórios, como TGF β e IL-10 (HARTWIG *et al.*, 2021).

O TNF α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias que atuam nas DII, produzida por macrófagos ativados, monócitos e linfócitos T, apresentando alto nível tanto intestinal quanto sistêmico. É responsável pela destruição da barreira intestinal com aumento da permeabilidade devido à diminuição da coesão das junções apertadas, mas também apoptose das células epiteliais intestinais (DE MATTOS *et al.*, 2015). Assim, uma das possíveis causas da manifestação da doença é observada como a perda da barreira de *tight junctions* e defeitos na proteção da camada de muco. Além disso, uma suscetibilidade da mucosa ou defeito na amostragem do antígeno luminal intestinal, por meio de processos de autofagia, pode levar à ativação da resposta imune inata, mediada pelo aumento da atividade do receptor toll-like (HARTWIG *et al.*, 2021). O excesso de TNF α induz a secreção de outras citocinas, incluindo IL-1 e IL-6, produzidas principalmente por mastócitos, macrófagos e neutrófilos (SCHOULTZ & KEITA, 2019). A IL-1 desencadeia processos inflamatórios locais, além de estar envolvida na indução de febre, hipotensão e na estimulação da produção de anticorpos após a imunização (COMINELLI & PIZARRO, 1996). A produção de IL-6 ativa diferentes respostas Th17 e Th2, que exacerbam a inflamação e afetam a função da barreira intestinal (SCHOULTZ & KEITA, 2019).

2.8 Microbiota intestinal e disbiose nas DII

A microbiota intestinal é uma comunidade complexa e diversificada de microrganismos que habitam o trato digestivo humano (HUA, 2020). Esta comunidade inclui bactérias (do filo Eubacteria e Archaea), vírus e fungos (GOMAA, 2020). Em indivíduos saudáveis, esses microrganismos desempenham papéis importantes na manutenção da saúde do sistema digestivo e do corpo como um todo. Além de auxiliar na digestão, a microbiota intestinal também está envolvida em uma variedade de outros processos fisiológicos, incluindo regulação e ativação do sistema imunológico, metabolismo e até função cerebral (GOMAA, 2020; MORAIS *et al.*, 2021). A microbiota intestinal saudável também funciona como um órgão homeostático participando da síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), em processos de fermentação de polissacarídeos não digeridos, síntese de vitaminas (como B e K), produção de energia e prevenção de infecções causada por microrganismos patogênicos (GOMAA, 2020; KHAN *et al.*, 2019).

Ao contrário do estômago e parte superior do intestino delgado, onde poucos microrganismos estão presentes, o número e a diversidade de espécies bacterianas

umentam progressivamente do jejuno ao cólon (SARTOR, 2008). O número de microrganismos que habitam um intestino humano saudável pode chegar a 10^{14} UFC/mL de conteúdo intestinal (SENDER *et al.*, 2016). No caso das bactérias, são mais de mil espécies, predominando representantes dos filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochetes*, *Tenericutes* e *Verrucomicrobiota*, incluindo os gêneros *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Fusobacteria* (GOMAA, 2020; HAJELA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019). Essas bactérias liberam grandes quantidades de enzimas responsáveis por desglucuronidação, descarboxilação, redução de ligações duplas e reações de hidrólise (ARÉVALO-PÉREZ *et al.*, 2020), todas importantes para o metabolismo do organismo.

A disbiose é qualquer alteração na composição ou capacidade funcional da microbiota intestinal, comumente associada a diversas patologias intestinais (BUTTÓ *et al.*, 2015). Em pacientes acometidos por DII, quando comparados a indivíduos não acometidos, há relatos que mostram que esse desequilíbrio advém da redução do número de bactérias com atividade anti-inflamatória e aumento do número de bactérias com atividade inflamatória (NISHIDA *et al.*, 2018). Esse desequilíbrio resulta em alterações funcionais, danos no processo de fermentação e alterações nos processos bioquímicos, levando ao desequilíbrio imunológico e até mesmo à liberação de fármacos (KHAN *et al.*, 2019; KOTLA *et al.*, 2018). Dieta, idade, genética do hospedeiro, exercício, consumo de antibióticos, tabagismo e impactos geográficos são fatores que podem modificar a composição da microbiota intestinal (GOMAA, 2020).

O perfil de disbiose mais comumente relacionado a pacientes com DII é uma diminuição no filo *Firmicutes* (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Roseburia*) (XU *et al.*, 2018), em espécies bacterianas comensais dos gêneros *Firmicutes* (*Clostridium* e *Enterococcus*), *Bacteroides* e bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Eubacterium*. Por outro lado, observa-se um aumento do filo *Proteobacteria* pertencente à família *Enterobacteriaceae* (por exemplo, bactérias como *Escherichia* e *Shigella*) (KHAN *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2018) e um aumento considerável de bactérias do filo *Bacteroidetes* (FUENTES *et al.*, 2017). Além disso, a inflamação favorece o crescimento de bactérias patogênicas como *Citrobacter rodentium* e *Salmonella spp.* (XU *et al.*, 2018). Essa diferença na microbiota pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre as bactérias presentes na microbiota saudável e na microbiota patológica (disbiose).

Microbiota saudável			Microbiota patológica (disbiose)	
Estômago	Intestino delgado	Cólon	Diminuição	Aumento
<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> e <i>Helicobacter pylori</i> <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Bacteroides spp.</i> , Bifidobacteria, <i>Clostridium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterobacterium spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , Fusobacteria, <i>Peptostreptococcus spp.</i>	Bacteroides, Bifidobactéria, <i>E. coli</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Blautia</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Enterococcus</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Enterococcus</i> .	<i>Proteobacteria</i> (<i>Escherichia</i> e <i>Shigella</i>), <i>Bacteroidetes</i> , <i>Citrobacter rodentium</i> , <i>Salmonella spp.</i> e <i>Peptostreptococcus spp.</i>

Fonte: próprio autor.

Embora a associação das DII com a presença de espécies patogênicas não seja clara, a *Escherichia coli* aderente-invasiva (AIEC) foi detectada com maior frequência em pacientes com doença de Crohn (22%) do que em pacientes saudáveis (6,2%) (DARFEUILLE-MICHAUD *et al.*, 2004). Como mencionado, bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridia* e *Bacteroides*, que são capazes de causar respostas anti-inflamatórias e aumento do número de células T-reg através de sinais antigênicos bacterianos, como o ácido retinóico de *Clostridium cluster* IV e XIVa (MUCIDA *et al.*, 2007) e o polissacarídeo A de *Bacteroides fragilis* (ROUND; MAZMANIAN, 2010), foram detectados com maior incidência no cólon de pessoas afetadas pelas DII. Por outro lado, *Faecalibacterium prausnitzii*, que pertence ao filo *Firmicutes*, foi menos frequente em pacientes com DII do que em controles saudáveis. Essa bactéria foi associada à menor gravidade da recorrência endoscópica após ressecção em humanos e, em camundongos, à menor gravidade dos sintomas de colite (MARTÍN *et al.*, 2014; SOKOL *et al.*, 2009).

Também foi demonstrado que a dieta do paciente exerce forte impacto na microbiota intestinal, o que pode influenciar na incidência da doença. Dietas envolvendo alta ingestão de proteínas animais e gordura saturada correlacionaram-se com a presença de *Bacteroides spp.* patogênicos, e aquelas envolvendo consumo de carboidratos e fibras correlacionaram-se com a presença de *Prevotella spp.* (DAVID *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2011). Além das bactérias, as DII também podem envolver desequilíbrios nas populações de vírus, Archaea e fungos. Bacteriófagos pertencentes à família *Caudovirales* tiveram maior incidência em pacientes com DC e RCU e a suscetibilidade de camundongos à

colite induzida quimicamente foi influenciada por uma resposta imune alterada a fungos nativos no intestino (ILIEV *et al.*, 2012; NORMAN *et al.*, 2015).

É importante destacar que a disbiose é intensificada com o uso crônico de medicamentos destinados ao tratamento das DII, como os anti-inflamatórios que incluem a amplamente utilizada mesalazina (KAUFMAN *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2018), antibióticos, laxantes e hábitos alimentares, que podem alterar a secreção de enzimas no cólon (KOTLA *et al.*, 2018). Por meio de episódios constantes de evacuação, as próprias DII também pode contribuir para a disbiose (GUARINO *et al.*, 2020).

2.9 Tratamento farmacológico das DII

O ácido 5-aminossalicílico, também conhecido como 5-ASA ou mesalazina (Fig. 7) e pertencente à classe dos aminossalicilatos é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da DII leve a moderada (TAVARES JUNIOR *et al.*, 2023).

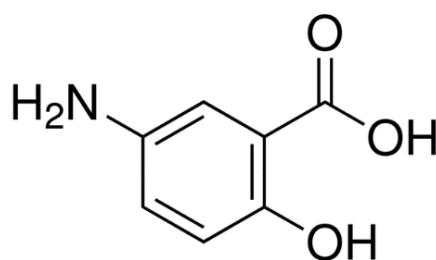


Figura 7. Estrutura química do 5-ASA (mesalazina).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a mesalazina é a um fármaco pertencente à classe IV, apresentando baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Sua solubilidade é sensível ao pH e à capacidade tampão, enquanto a sua biodisponibilidade pode variar dependendo das formas farmacêuticas (ZHANG *et al.*, 2022). Ainda de acordo com o SCB, a mesalazina também é considerada insolúvel em etanol 96%. O fármaco dissolve-se em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos e em ácido clorídrico diluído. A solubilidade em meio de HCl 0,1 M é maior do que 18 mg/mL, enquanto que em meios de tampão fosfato com pH 6,0 e 7,2, os valores de solubilidade são, respectivamente, de 1,2 mg/mL e 5,5 mg/mL (TENJARLA, 2015). Seu log p possui um valor de 0,98 possui dois pKa em 2,3 e 5,69. A sua fórmula molecular é C₇H₇NO₃ e a sua massa molecular é de 153,12 g/mol (THE BRITISH PHARMACOPOEIA, 2013), com ponto de fusão em 286,16°C (NEWTON *et al.*, 2012) e meia vida é de 1,4 a 6 horas, de acordo com o sistema de liberação (QURESHI; COHEN, 2005)

O 5-ASA tem sido administrado através das vias oral, por meio de cápsulas ou comprimidos com revestimento entérico, por via parenteral, através de injeções subcutâneas ou intravenosas, ou por via retal, com auxílio de supositórios ou enemas (KOTLA *et al.*, 2018). Nos casos leves e moderados de DII, grande parte dos pacientes responde ao tratamento com aminossalicilatos (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; HO *et al.*, 2015; KOTLA *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2019a).

Além do 5-ASA, a sulfassalazina (um pró-fármaco da mesalazina) é utilizada como alternativa nessas mesmas condições de DII (BAUMGART *et al.*, 2005; KOTLA *et al.*, 2018). A sulfapiridina e o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) compõem a sulfassalazina (GIONCHETTI *et al.*, 2003). No cólon, a sulfassalazina é clivada por bactérias presentes na microbiota, liberando o 5-ASA, responsável pela atividade anti-inflamatória e a sulfapiridina (QURESHI; COHEN, 2005), que gera efeitos colaterais (DESREUMAUX; GHOSH, 2006) como náuseas, vômitos, dor abdominal, cefaleia (FRÓES, 2012).

Existem situações em que os pacientes não respondem ao uso de aminossalicilatos (SU *et al.*, 2019a). Em casos moderados ou graves, é comum a administração de corticosteroides, como dexametasona, tiopurinas (azatioprina) ou inibidores de calcineurina (ciclosporina) (BAUMGART *et al.*, 2005; KOTLA *et al.*, 2018). Prednisona (HO *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2019a) e budesonida também são empregados (BERNSTEIN *et al.*, 2016; FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; SU *et al.*, 2019a). Ganho de peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, osteoporose, catarata, glaucoma, estrias, miopatia, suscetibilidade a infecções, esteatose hepática, hipertensão arterial sistêmica, *Diabetes mellitus* e pancreatite aguda são relatados como efeitos colaterais (FRÓES, 2012). Existem doentes resistentes aos esteróides, necessitando da administração de fármacos imunossupressores como azatioprina, tacrolimus ou metotrexato (HO *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2019a). O uso de azatioprina pode, por sua vez, causar febre, náuseas, vômitos, dor abdominal, depressão medular, alterações nas enzimas hepáticas e aumento do risco de linfoma não Hodgkin e de alopecia por metotrexato, pneumonite, alterações da função hepática, fibrose hepática e teratogenicidade (FRÓES, 2012).

Em pacientes com atividade RCU acentuada, o tratamento parenteral consiste no uso, em nível hospitalar, de corticosteroides, terapia biológica e ciclosporina. Dependendo da situação, o infliximab, um anti-TNF α , pode ser administrado (FRÓES, 2012). O tratamento com azatioprina ou imunoterapia anti-TNF- α ou vedolizumabe é usado nos casos em que a doença é frequentemente recidivante (HARTWIG *et al.*, 2021).

Se os pacientes não responderem à terapia medicamentosa e a doença evoluir para casos extremos de perfuração intestinal, megacólon hemorrágico e tóxico, pode ser necessária uma intervenção cirúrgica (colectomia) (FRÓES, 2012).

2.9.1 Mecanismos de ação da mesalazina

Acredita-se que a mesalazina atue na mucosa intestinal (MACDERMOTT, 2000; NIKOLAUS *et al.*, 2000) através de uma combinação de efeitos anti-inflamatórios. Os mecanismos de ação da mesalazina se caracterizam pela inibição da produção de IL-1 (RACHMILEWITZ *et al.*, 1992), pela redução da sinalização do receptor de TNF- α (KAISER *et al.*, 1999), pela inibição da ciclooxigenase (bloqueando a produção de prostaglandinas) e pela inibição da 5-lipoxigenase (bloqueando a produção de leucotrienos) (ABDU-ALLAH *et al.*, 2016; BANTEL *et al.*, 2000; DI MARIO *et al.*, 2006; MLADENOVSKA *et al.*, 2007), pela ação antioxidante (AHNFELT-RONNE, NIELSEN, 1987; STENSON, LOBOS, 1982) de eliminar radicais livres (JOSHI *et al.*, 2005), pela inibição da proliferação de células T, bloqueando a produção de IL-2 (STEVENS *et al.*, 1995) e pela inibição da expressão e ativação das moléculas de adesão nas células endoteliais (POOLEY *et al.*, 1995). Esses efeitos inibitórios de processos inflamatórios do 5-ASA podem ser esclarecidos pela sua capacidade de inibir a ativação do fator nuclear $\kappa\beta$, um fator regulatório de transcrição, relacionado a iniciar e manter inflamações (BANTEL *et al.*, 2000; BARNES, KARIN, 1997; MLADENOVSKA *et al.*, 2007). Além disso, esse fator está associado à sinalização de citocinas pró-inflamatórias, quimoquinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios (ABDU-ALLAH *et al.*, 2016; BANTEL *et al.*, 2000; DI MARIO *et al.*, 2006; MACDERMOTT, 2000; MLADENOVSKA *et al.*, 2007; NIKOLAUS *et al.*, 2000). Fatores nucleares $\kappa\beta$ ativos foram encontrados em macrófagos e nas células epiteliais em casos de mucosa inflamada por RCU (ROGLER *et al.*, 1998).

2.9.2. Adesão ao tratamento com mesalazina

As DII requerem terapia medicamentosa longa e, em muitos casos, por períodos indeterminados. Para o sucesso terapêutico é fundamental a total adesão do paciente em termos de tempo de tratamento e uso correto dos medicamentos prescritos (CARDOZO; SOBRADO, 2015; MISZPUTEN, 2011; SOUZA *et al.*, 2021), situação pouco comum (SOUZA *et al.*, 2021). A falta de adesão ao tratamento aumenta custos e diminui a eficácia (TESTA *et al.*, 2017).

Existem estudos que comprovam a baixa adesão ao 5-ASA na prática clínica mundial, variando entre 40-60% dos pacientes acometidos pelas DII (BUCCI *et al.*, 2017; CERVENÝ *et al.*, 2007; COENEN *et al.*, 2016; KANE *et al.*, 2001; KANE *et al.*, 2003; SHALE; RILEY, 2003).

Lee e colaboradores, em um estudo realizado em 2019, observaram que 49,8% dos pacientes apresentam baixa adesão ao 5-ASA oral. As justificativas mais comuns para a não adesão, relatadas no trabalho, foram as de que os 47,9% dos pacientes se sentem incomodados em manter o plano de tratamento, e a de que “pacientes às vezes esquecem de tomar seus comprimidos” em 44,8% dos acometidos. Além disso, este estudo mostrou que o consumo de álcool e o tabagismo foram fatores de risco relevantes associados à baixa adesão ao 5-ASA oral (LEE *et al.*, 2019).

No estudo conduzido por Tomar e colaboradores (2019), os motivos de não adesão citados pelos pacientes foram esquecimento, melhora do quadro, frequência de administrações, ausência de efeito da medicação, indisponibilidade de medicamentos, efeitos colaterais/adversos, tratamento ao longo da vida e custo do tratamento. A duração da doença em pacientes não aderentes foi maior do que em pacientes aderentes (TOMAR *et al.*, 2019).

Um estudo italiano revelou uma associação negativa da adesão com a duração da doença e uma associação significativa de não adesão com esquecimento, melhora do quadro, efeitos colaterais, frequência de administrações e terapia tópica com enemas em oposição à terapia oral (D’INCÀ *et al.*, 2008).

Um estudo de Praga associou a não adesão com maior escolaridade e efeitos colaterais da medicação. Porém, a não adesão diminuiu com a idade e os pacientes não aderentes eram mais suscetíveis a desenvolverem DII cronicamente ativas ou em episódios de recidiva (CERVENÝ *et al.*, 2007).

Segundo um estudo conduzido na Índia, os motivos de não adesão foram esquecimento (77%), melhora de sintomas (14,2%), alta frequência de doses (10,1%), nenhum efeito da medicação (7,8%), indisponibilidade de medicamentos (2,3%), efeitos colaterais e medicamentos de longo prazo (BHATT *et al.*, 2009).

Outro estudo, conduzido na Ásia, revelou que, na Coreia, a não adesão com idade mais jovem, intervalos mais longos entre as consultas ambulatoriais e conhecimento limitado da medicação prescrita. Além disso, os pacientes não aderentes tiveram um risco maior de recaída de DII do que os pacientes aderentes (SINGH *et al.*, 2017).

Em uma revisão sistemática de 17 estudos, sofrimento psicológico, crenças dos pacientes sobre medicamentos e discordância médico-paciente foram associados à não adesão, enquanto variáveis demográficas, clínicas e de tratamento não foram (JACKSON *et al.*, 2010). A taxa de pacientes que não aderem ao tratamento varia com a idade, sexo, duração do estímulo da doença, custos, via de administração, ocorrência de efeitos colaterais e nível de comprometimento da qualidade de vida (BERNAL *et al.*, 2006; BUCCI *et al.*, 2017; CERVENÝ *et al.*, 2007; COENEN *et al.*, 2016; KANE *et al.*, 2001; KANE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2019; SEWITCH *et al.*, 2003; SHALE; RILEY, 2003; SOUZA *et al.*, 2021; TOMAR *et al.*, 2019).

2.9.3. Problemas relacionados à terapia farmacológica convencional das DIIs

A via oral é a mais aceita para administração de medicamentos, sendo a via utilizada para aproximadamente 60% dos medicamentos de moléculas pequenas disponíveis comercialmente (ALQAHTANI *et al.*, 2021). É não invasiva, segura e custo-efetiva, fatores que contribuem para o aumento da adesão do paciente (KULKARNI *et al.*, 2022; ALQAHTANI *et al.*, 2021). No entanto, no caso das DII, a eficácia das formas farmacêuticas convencionais pode ser comprometida devido à diferentes condições adversas, como acidez estomacal, intestino delgado ligeiramente ácido a neutro e intestino grosso ligeiramente básico incluindo efeitos adversos graves, falta de direcionamento para o tecido inflamado e outros que estão associados à estrutura anatômica e fisiológica do TGI. Todo esse contexto representa um grande desafio em formulações que direcionam um fármaco ao cólon por via oral (KULKARNI *et al.*, 2022). Como foi mencionado acima, o principal tratamento de casos leves a moderados de DII envolve o uso de medicamentos administrados por essa via.

Embora seja altamente eficaz no tratamento das DII, o 5-ASA incorporado em formulações convencionais é rápida e extensamente absorvido nas porções superiores do TGI, o que justifica suas administrações em doses muito elevadas (LOFTUS *et al.*, 2004; QURESHI; COHEN, 2005; SARDO *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2021). Ao alcançar o estômago e intestino delgado, parte do 5-ASA (GOEBELL *et al.*, 1993) é convertido no metabólito N-acetil-5-ASA, através da enzima N-acetil-transferase, metabólito inativo em termos de efeitos anti-inflamatórios (QURESHI; COHEN, 2005). Essa rápida e extensa absorção no TGI e falhas no direcionamento da liberação específica do fármaco no cólon reduz a fração do 5-ASA que chega no alvo terapêutico, resultando em baixa eficácia do tratamento (NUNTHANID *et al.*, 2008), e no estabelecimento de efeitos

colaterais graves sistêmicos como diarreia, náusea, dor abdominal, cefaleia e vômito que geralmente diminuem a adesão do paciente ao tratamento (RASMUSSEN *et al.*, 1982).

Para que a mesalazina exerça a ação terapêutica em sua plena eficácia é estritamente necessário que seja liberada especificamente na região colônica (GOEBELL *et al.*, 1993). Isto resulta em redução de diversos efeitos colaterais. Além disso, a extensa e rápida absorção do fármaco reduz suas concentrações disponíveis para desempenhar efeito farmacológico no cólon (principal região acometida), diminuindo a eficácia do tratamento das DII. Diante disso, faz-se necessária a incorporação do fármaco a carreadores especializados que permitam seu direcionamento para as regiões inflamadas. Isso só é possível com o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos específicos para o cólon. Além de uma redução significativa da distribuição indesejada do fármaco no organismo, tal sistema permitiria redução da dose, diminuição dos efeitos adversos e tóxicos e concentração máxima do fármaco no alvo desejado (KULKARNI *et al.*, 2022).

2.9.4. Tratamento alternativo das DII com probióticos

Os probióticos podem ser entendidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (KHAN *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2018). O primeiro estudo abrangente que associava moléculas produzidas e secretadas por um microrganismo atuando como fatores que poderiam induzir o crescimento de outro microrganismo foi publicado em 1965 (LILLY; STILLWELL, 1965). Para que um microrganismo seja classificado como probiótico, ele deve ser não patogênico ao hospedeiro, sobreviver ao trânsito pelo TGI e, por fim, manter a viabilidade durante longos períodos de armazenamento (SARAO; ARORA, 2017). Os probióticos mais utilizados pertencem às espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium*. A maioria consiste em bactérias produtoras de ácido lático, como lactobacilos, estreptococos, enterococos, lactococos e bifidobactérias. *Bacillus spp.* e fungos tais como *Saccharomyces spp.* e *Aspergillus spp.* também têm sido utilizados (SARAO; ARORA, 2017).

Os probióticos fornecem benefícios importantes ao restaurar ou manter o equilíbrio da microbiota intestinal normal, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, melhorando a função de barreira do intestino, promovendo a imunidade local e interferindo positivamente nas respostas inflamatórias intestinais (NATH *et al.*, 2018;

SANDERS *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2018). Em relação às bactérias patogênicas, os probióticos competem pelos sítios de adesão por meio da produção de bacteriocinas e peptídeos antimicrobianos como defensinas, lisozimas e fosfolipases (NATH *et al.*, 2018), fornecendo nutrientes ao corpo do hospedeiro e inibindo o processo de apoptose do intestino células epiteliais. No geral, os probióticos podem melhorar o tratamento das DII e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes afetados por essas doenças (SHEN *et al.*, 2018). Os probióticos afetam o sistema imunológico de várias maneiras. Eles atuam aumentando os níveis de citocinas e imunoglobulinas, ativação de macrófagos, aumentando as atividades das células *natural killer*, modulação autoimune e estimulação imune contra bactérias patogênicas e protozoários (GHASEMIAN *et al.*, 2018).

Os lactobacilos foram os primeiros probióticos a serem descobertos. Pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas, compreendendo 183 espécies conhecidas, com diversas aplicações em processos industriais como na fabricação de conservantes, aromatizantes de alimentos, medicamentos e fabricação de cosméticos. Este gênero é o grupo dominante no sistema gastrointestinal, conforme Figura 8. Produz grandes quantidades de ácido lático e outros metabólitos usando várias substâncias como fontes de carbono, como glicose, frutose, lactose e galactose. Eles podem ser classificados de acordo com seu metabolismo como homofermentativos e heterofermentativos. Os homofermentativos produzem apenas ácido lático e os heterofermentativos, além do ácido lático, vários outros metabólitos, incluindo etanol, ácido acético e dióxido de carbono. Os lactobacilos também podem produzir metabólitos secundários, incluindo bacteriocinas, exopolissacarídeos e enzimas, que são utilizados para aumentar a qualidade e o prazo de validade de alimentos fermentados (DE MELO PEREIRA *et al.*, 2018).

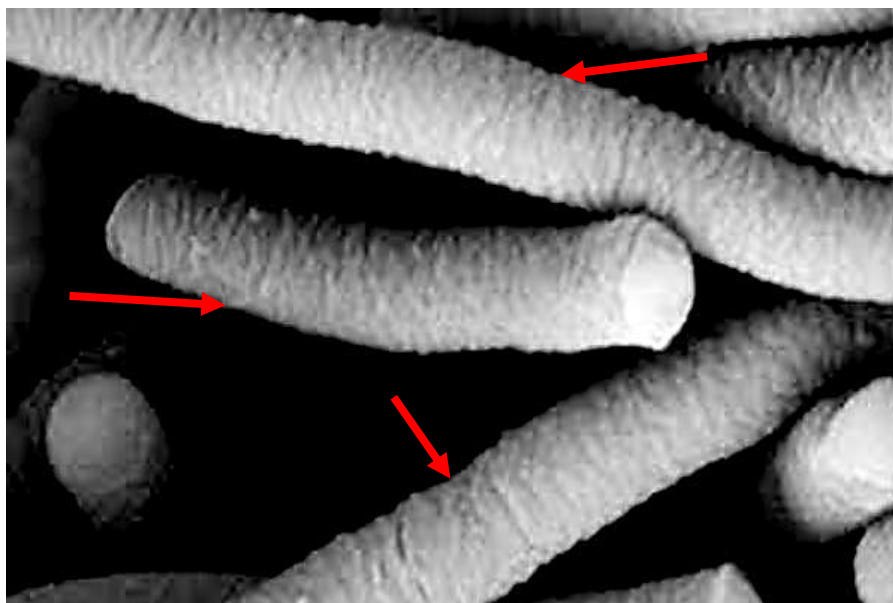


Figura 8. Fotomicrografia de probióticos da espécie *Lactobacillus rhamnosus* GG. Apresenta dimensões de 0,8 a 1,0 μm de largura por 2,0 a 4,0 μm de comprimento. As setas vermelhas indicam os bacilos. GOLDSTEIN *et al.*, 2015.

Os probióticos *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* também produzem ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – *short chain fatty acids*), como acetato e propionato que são ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de carboidratos. Esses probióticos não produzem butirato, obtendo-o de bactérias comensais, como *Faecalibacterium*, levando ao aumento dos níveis desse composto no intestino (SANDERS *et al.*, 2019). O butirato promove a motilidade do cólon, reduz a inflamação, aumenta a irrigação visceral, inibe a progressão das células tumorigênicas e induz o processo de apoptose (RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016). Os SCFAs, além de atuarem como fontes de energia, também reduzem o pH do lúmen intestinal, dificultam o desenvolvimento de agentes patogênicos, influenciam na motilidade intestinal e reduzem o câncer de cólon por estimular a apoptose de células tumorigênicas (TSAI *et al.*, 2019). Os SCFAs também atuam como moléculas sinalizadoras ao reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a população de células T reguladoras (Treg) no intestino grosso (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

As Bifidobactérias são os microrganismos mais abundantes no TGI. Além dos benefícios citados por outras bactérias, *Bifidobacterium spp.* reduz a intolerância à lactose, previne distúrbios gastrointestinais e diminui as concentrações de amônia. A presença de ambiente e nutrientes adequados, conhecidos como “fatores bifidogênicos”, contribui para a viabilidade e atividade das bifidobactérias (SARAO; ARORA, 2017).

Os benefícios diretos dos probióticos no tratamento da DII foram demonstrados quando várias espécies de probióticos foram combinadas (Tabela 2). A combinação de probióticos *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, utilizados em produtos comerciais (YAO *et al.*, 2020), pode ser benéfica para o sistema imunológico, auxiliando pessoas saudáveis e alergênicas, por diminuir reações inflamatórias (GHASEMIAN *et al.*, 2018) como por exemplo no intestino. Quando *Bifidobacterium* mais *Lactobacillus* são combinados com espécies de *Streptococcus* ou com *E. coli* Nissle 1917, observou-se uma remissão de sintomas leves a moderadamente graves de RCU (KRUIS *et al.*, 2004). Outro estudo relatou um procedimento de metanálise para avaliar cinco estudos clínicos envolvendo um total de 319 pacientes com RCU, nos quais a resposta terapêutica a uma mistura composta por uma cepa de *Streptococcus thermophilus*, quatro de *Lactobacillus spp.* e três de *Bifidobacterium spp.* cepas, conhecidas como VSL#3, foram comparadas com placebo. Os sintomas de RCU foram atenuados em cerca de 44,6% dos indivíduos que receberam VSL#3, em comparação com uma redução de 25,1% no grupo placebo (MARDINI; GRIGORIAN, 2014).

Tabela 2. Benefícios do uso de probióticos, isoladamente ou combinados com 5-ASA, no tratamento da DII.

Microorganismos	Benefícios	Referências
<i>Lactobacillus spp.</i> and <i>Bifidobacterium spp.</i>	Redução de inflamações	GHASEMIAN <i>et al.</i> , 2018
<i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> plus <i>Streptococcus</i> or <i>E. coli</i> Nissle 1917	Remissão de sintomas da doença	KRUIS <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	Atenuação de sintomas da doença	MARDINI; GRIGORIAN, 2014
<i>Saccharomyces boulardii</i> and <i>Bacillus spp.</i>	Bloqueio da angiogênese Sobrevivência em condições ácidas	CHEN <i>et al.</i> , 2013 MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018
<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i> and <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Reforça a estrutura de barreira intestinal; Redução de infamação colônica	WIEËRS <i>et al.</i> , 2020
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 and <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	Redução de inflamação e ulceração; Aumento populacional de <i>Lactobacillus spp.</i> e <i>Bifidobacterium spp.</i> no cólon de ratos	CELIBERTO <i>et al.</i> , 2017
5-ASA plus <i>L. salivarius</i> , <i>L. acidophilus</i> , and <i>B. bifidum</i> BGN4	Redução no tempo de recuperação; atenuação de sintomas	PALUMBO <i>et al.</i> , 2016

Os probióticos também foram comparados ao uso tradicional de 5-ASA. Em um ensaio clínico randomizado, a cepa de *E. coli* Nissle 1917 foi comparada com 5-ASA para tratar RCU. O estudo incluiu 327 pacientes que receberam uma dose diária do probiótico ou 500 mg de 5-ASA três vezes ao dia. Após um período de doze meses, os pacientes foram avaliados clínica, endoscopicamente e histologicamente. A cepa de *E. coli* Nissle 1917 foi tão eficaz quanto a administração de 5-ASA. Foi verificada uma taxa de recorrência de 36,4% no grupo *E. coli* Nissle 1917, contra uma taxa de 33,9% no grupo 5-ASA (KRUIS *et al.*, 2004). Embora o uso de probióticos possa ser tão eficaz quanto o 5-ASA tradicional, o benefício dos probióticos pode ser ainda maior quando associados aos anti-inflamatórios comumente prescritos (JAKUBCZYK *et al.*, 2020). A associação do 5-ASA com uma combinação dos probióticos *L. salivarius*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* BGN4 resultou em menor tempo de recuperação dos sintomas das DII e uma forma mais atenuada da doença. Após mais de 2 anos de estudo, os resultados sugerem que a suplementação de probióticos aos medicamentos convencionais deve ser realizada sem interrupção e administrada por um longo período, permitindo um tratamento viável (PALUMBO *et al.*, 2016).

Existem evidências crescentes de modelos experimentais de camundongos e de observações clínicas de que a angiogênese é um componente importante da patogênese das DII (DANESE, 2008; PAPA *et al.*, 2008), e a levedura *Saccharomyces boulardii* foi associada a esse processo (CHEN *et al.*, 2013). Os tecidos intestinais cronicamente inflamados exibem alterações na fisiologia e nas funções microvasculares em comparação com os tecidos intestinais não afetados pelas DII. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a família tirosina quinase do receptor VEGF (VEGFRs) são proteínas que modulam o processo de angiogênese. Os receptores transmembrana VEGFR tipos 1 e 2 estão presentes nas células endoteliais e possuem alta afinidade pelo VEGF. A ligação do VEGF a esses receptores leva à fosforilação do receptor intracelular, que ativa várias vias de sinalização intracelular, levando à proliferação de células endoteliais e à formação de vasos sanguíneos (CHEN *et al.*, 2013). O VEGF mostrou-se mais concentrado no tecido do cólon distal no modelo de colite (CHIDLOW *et al.*, 2007), bem como em tecidos e soros de pacientes com DC e RCU (KANAZAWA *et al.*, 2001; KAPSORITAKIS *et al.*, 2003; TSIOLAKIDOU *et al.*, 2008). Estudos conduzidos em um modelo experimental de colite sugerem que o VEGF é um importante mediador da DII ao promover a angiogênese intestinal e a inflamação (SCALDAFERRI *et al.*, 2009).

Portanto, agentes que inibem a sinalização de VEGF/VEGFR podem ser úteis na redução da inflamação intestinal em pacientes com DII, e foi descoberto que *Saccharomyces boulardii* bloqueia a angiogênese da sinalização de VEGFR e regula a inflamação aguda e crônica da mucosa intestinal associada à progressão da DII (CHEN *et al.*, 2013).

Existem vários outros relatos sobre os benefícios dos probióticos para tratar a DII. Por exemplo, probióticos do gênero *Bacillus* são capazes de sobreviver ao ambiente hostil e baixo pH no TGI superior para atingir o intestino delgado e secretar substâncias antimicrobianas (MINGMONGKOLCHAI; PANBANGRED, 2018). A levedura *Saccharomyces boulardii* e as bactérias *Akkermansia muciniphila* e *Faecalibacterium prausnitzii* induziram o reforço da barreira intestinal e reduziram a inflamação colônica (WIEËRS *et al.*, 2020). A população da espécie *Akkermansia muciniphila*, embora classificada como microrganismo de “próxima geração” (YAO *et al.*, 2020), diminuiu em indivíduos afetados por DII (HAJELA *et al.*, 2015) e parece não resistir ao armazenamento e às condições do TGI (YAO *et al.*, 2020). As bactérias *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, quando administradas na forma de bebidas à base de soja, apresentaram excelentes resultados no tratamento da colite intestinal. Houve menor grau de inflamação e ulceração no cólon dos ratos submetidos à colite induzida, em relação aos grupos controle, bem como aumento da população de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (CELIBERTO *et al.*, 2017).

Nesse contexto, uma das estratégias para contornar esses problemas é através da administração de microrganismos probióticos como recurso para controlar o reequilíbrio da microbiota intestinal, contribuindo para a indução/manutenção da remissão da doença, bem como impedir sua progressão. Entre os mecanismos envolvidos nesse processo, os probióticos têm a propriedade de reduzir a população de microrganismos patogênicos, modular o sistema imunológico e promover a produção de ácidos graxos de cadeias curtas, essenciais para proliferação celular.

2.10 Sistemas cólon-específicos

A eficácia no tratamento das DII reside, em grande parte, na capacidade de liberar fármacos e probióticos de maneira estável e viável, respectivamente, no cólon, onde a inflamação característica dessa condição se concentra. A complexidade do TGI e a rápida degradação de substâncias terapêuticas ao longo do percurso intestinal destacam a necessidade crucial de formulações que garantam a chegada segura e eficiente dessas terapias à região afetada. A busca por métodos de liberação controlada, como

revestimentos específicos ou sistemas de liberação cólon-específica, é imperativa para assegurar a proteção dos princípios ativos durante o trânsito pelo sistema digestivo, permitindo que alcancem o cólon de maneira íntegra. A otimização dessas estratégias não apenas maximiza a eficácia terapêutica, minimizando efeitos colaterais sistêmicos, mas também representa um avanço significativo na melhoria da qualidade de vida dos pacientes que sofrem com a DII.

A liberação cólon-específica tem sido considerada uma importante estratégia para otimização da atividade terapêutica do 5-ASA, aliada a menor incidência de efeitos adversos (SARDO *et al.*, 2019). Três estratégias principais são comumente exploradas para a vetorização de fármacos ao cólon, como o desenvolvimento de sistemas com solubilidade dependente do pH, solubilidade dependente do tempo de trânsito, bem como aqueles que exploram o metabolismo da microbiota colônica (VASS *et al.*, 2019). Além dessas, vale destacar o desenvolvimento de pró-fármacos, desenvolvimento de sistemas bio/mucoadesivos e osmoticamente controlados (ARÉVALO-PÉREZ *et al.*, 2020; KULKARNI *et al.*, 2022). Porém, devido à grande variação das condições fisiopatológicas, principalmente do tempo de esvaziamento gastrointestinal e pH luminal no TGI, a abordagem que explora a biodegradabilidade enzimática colônica parece ser a mais confiável (SINGH *et al.*, 2021).

Os sistemas de liberação colônicos disponíveis para o 5-ASA, e comercializadas atualmente, enfrentam dificuldades e não atingem a eficácia esperada no tratamento de alguns casos de DII. Na atual terapia das DII aprovada pela US Food and Drug Administration, a mesalazina é incorporada em formas farmacêuticas baseadas em polímeros específicos e que apresentam diferentes estratégias de liberação. Como exemplo, cita-se o Asacol[®] (pH-dependente), Colazal[®] (um pró-fármaco com redução enzimática), Mezavant[®] (pH-dependente e de liberação controlada) e Pentasa[®] (tempo-dependente) (ZHANG; MERLIN, 2018), conforme apresentado na Tabela 3. Dentre as alternativas, os pró-fármacos foram propostos através de estratégias de conjugações de fármaco com um transportador inerte, geralmente através de ligações azo (nitrogênio com ligação tripla), em que bactérias específicas do cólon (azoredutases) conseguem realizar a clivagem e liberar o fármaco, sendo este ativado pela microbiota colônica. Mesmo extensamente pesquisados e apresentando resultados favoráveis, os pró-fármacos enfrentam dificuldades nos frequentes casos de diarreia devido à falta de tempo hábil para clivagem de ligações azo.

Tabela 3. Estratégias abordadas na liberação cólon-específica de fármacos.

Estratégia	Liberação de fármaco	Observação	Medicamentos
Sistemas pH-dependentes	Combinação de polímeros com solubilidade dependente do pH	Sítio-especificidade imprecisa devido às variações inter-intra individual e similaridade de pH entre intestino delgado e cólon	Asacol, Mezavant
Sistemas tempo-dependentes	Solubilidade dos polímeros são dependentes do tempo de esvaziamento gástrico	Sítio-especificidade imprecisa devido à elevada variação dos tempos de retenção gástrica	Mezavant, Pentasa
Pró-fármacos	Clivagem das ligações entre fármaco e transportador via redução e hidrólise através das enzimas colônicas	Apresenta sítio-especificidade, porém pode não haver tempo para ativação em casos de diarreia	Colazal, Dipentum
Sistemas ativados pela microbiota colônica	Fermentação de polissacarídeos pelas enzimas de bactérias do cólon	Estratégia promissora devido à habilidade de alguns polissacarídeos serem somente degradados no cólon.	Não encontrado na literatura

Fonte: próprio autor.

Nesse contexto, novos sistemas de liberação cólon-específicos para o 5-ASA e probióticos devem ser investigados (SARDO *et al.*, 2019). Nesse contexto, os polissacarídeos emergem como candidatos promissores para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos direcionados ao cólon. A complexidade estrutural e a capacidade de modificar as propriedades físicas e químicas desses polímeros oferecem oportunidades únicas para a formulação de sistemas de liberação orais colônicos (SLOCs).

2.10.1 Sistemas cólon-específicos baseados em polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos de um único ou de diferentes tipos de monossacarídeos. Celulose, alginato, goma arábica, pectina (STEPHEN *et al.*, 2006) e amido (MENEGUIN *et al.*, 2021) são exemplos de polissacarídeos. Apresentam vantagens como serem comuns no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, como os comprimidos e cápsulas, além de serem bem conhecidos por possuírem baixa toxicidade e baixo custo, o que os tornam candidatos promissores. Além disso, podem ser facilmente modificados a fim de se obter

propriedades físico-químicas melhoradas que adicionem maior especificidade a esses compostos (ARÉVALO-PÉREZ *et al.*, 2020).

Alguns desses compostos (como goma guar, pectina, inulina, alginato, quitosana ou dextrano) são degradados especificamente pelas enzimas de bactérias anaeróbicas (polissacaridases) presentes no cólon, o que permite a liberação do fármaco neste local, favorecendo o tratamento localizado das DII. Além disso, os SLOCs apresentam também propriedades de aderência nesse meio, são estáveis no meio ácido do estômago, biodegradáveis e atóxicos (KOTLA *et al.*, 2014).

Embora apresentem vantagens tecnológicas do ponto de vista da biodegradação no cólon, a alta hidrossolubilidade da maioria dos polissacarídeos muitas vezes limita seu uso como excipiente em SLOCs, sendo necessário a adição de outros componente à formulação, ou ainda, a modificação estrutural do polissacarídeo que limite a dissolução do fármaco (ZAVAREZE *et al.*, 2011). Alguns polissacarídeos que vem sendo bastante explorados para a construção de SLOCs são a quitosana (SAADATZADEH *et al.*, 2012; TAHARA *et al.*, 2011), goma guar (SAWARKAR *et al.*, 2015), pectinas (PERERA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014), dextranas (BRØNDSTED *et al.*, 1998), ácido hialurônico (ZHANG *et al.*, 2016), alginato (AGUERO *et al.*, 2017; SAMAK *et al.*, 2017), goma gelana (MENEGUIN *et al.*, 2017) e amido (ARÉVALO-PÉREZ *et al.*, 2020) (CURY *et al.*, 2009).

Outra importante vantagem agregada ao emprego de polissacarídeos no desenvolvimento de SLOCs para tratamento das DII consiste no fato de alguns desses compostos atuarem no cólon como importantes prebióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Prebióticos são definidos como substratos de crescimento dos microrganismos presentes no intestino. Os prebióticos não são digeridos no intestino delgado e, ao atingir o intestino grosso, são metabolizados seletivamente por bactérias benéficas, principalmente os lactobacilos e as bifidobactérias, as quais alteram a microbiota do cólon. Essa alteração resulta em uma microbiota saudável, permitindo uma melhoria na saúde do organismo. São constituídos essencialmente por carboidratos de tamanhos diferentes, desde mono-, di- e oligossacarídeos, até polissacarídeos (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Dessa forma, os polissacarídeos que atuam como prebióticos podem minimizar os efeitos da disbiose comumente presente nos pacientes acometidos por DII (LAUTENSCHLÄGER *et al.*, 2014), graças a uma alteração da microbiota colônica.

2.10.2 Amido retrogradado

O amido retrogradado (AR), também denominado amido resistente tipo III, é um amido modificado obtido por tratamento hidrotérmico através do processo de retrogradação (MENEGUIN *et al.*, 2018, 2017, 2014). Englyst e colaboradores mostraram que este tipo de amido representa uma fração do amido a qual pode resistir à digestão no intestino delgado. A Figura 9 mostra a estrutura de um amido retrogradado.

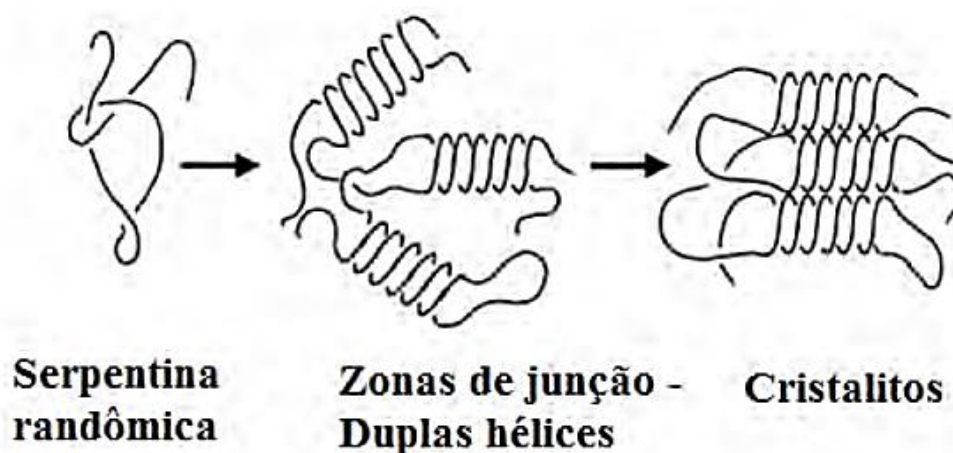


Figura 9. Esquema mostrando a formação de amido retrogradado. Adaptado de HARALAMPU, 2000.

O processo de retrogradação do amido consiste em uma modificação de sua estrutura espacial. Inicialmente, o amido é gelatinizado através de seu aquecimento com excesso de água, o que leva ao seu intumescimento, seguido do rompimento de sua estrutura granular (HARALAMPU, 2000; KAWAI *et al.*, 2012). Através de ciclos alternados de armazenamento e resfriamento, o amido sofre uma reassociação e recristalização lenta de suas estruturas, processo conhecido como retrogradação (DONA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). Esse processo promove a estruturação de uma rede tridimensional em que as cadeias poliméricas se encontram mais empacotadas e rígidas, dificultando o acesso de enzimas às ligações glicosídicas.

Durante a retrogradação, as moléculas de amido se reorganizam e podem formar estruturas compactas e estáveis, graças à formação de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals com formação de uma estrutura metaestável de menor energia livre (CHUNG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007) ao formar cadeias poliméricas em dupla hélice, através de zonas de junção. Posteriormente à retrogradação, as duplas hélices se agrupam em uma célula unitária hexagonal. Esse processo de acomodação molecular pode ser

impulsionado pela desidratação, sendo que são estruturas termicamente muito estáveis (HARALAMPU, 2000). Essa propriedade de estabilidade é importante para a estruturação de SLOCs, em razão da maior estabilidade térmica e baixa solubilidade em água desse excipiente (MENEGUIN *et al.*, 2018).

Por não ser rapidamente digerido como o amido comum, o AR apresenta benefícios biológicos (HARALAMPU, 2000) como ser metabolizado apenas no cólon e promover a liberação de fármacos e probióticos neste órgão-alvo. Além disso, ao atingir o intestino grosso, o AR torna-se um substrato para fermentação por bactérias benéficas. Os produtos finais são H₂, e CO₂, CH₄ e ácidos graxos de cadeia curta (ENGLYST *et al.*, 1996; HTOON *et al.*, 2010; TOPPING; CLIFTON, 2001), que são absorvidos e utilizados. As altas concentrações de butirato produzidos a partir da fermentação do amido podem ser benéficas para a saúde. Dessa forma, o AR pode ser considerado um forte candidato a desempenhar a função de liberação cólon-específica devido a sua especificidade em ser degradado por enzimas apenas na região colônica (MENEGUIN *et al.*, 2018, 2017, 2014).

2.10.3 Pectina

A pectina (P) é um heteropolissacarídeo (SRIAMORNSAK, 2011) aniônico, extraído de paredes celulares de plantas (ARÉVALO-PÉREZ *et al.*, 2020), principalmente de frutos cítricos (MOHNEN, 2008). Apresenta estrutura química complexa e é comercialmente importante para as indústrias alimentícias e farmacêuticas. Sua estrutura varia de acordo com as espécies, estágio metabólico e condições de extração (FRAEYE *et al.*, 2010; ROUND *et al.*, 2010). Dessa forma, é importante destacar que, para o tratamento das DII, o uso de polímeros aniônicos, como por exemplo a pectina, pode ser benéfico, ao promover aderência às proteínas carregadas positivamente nos tecidos inflamados. A Figura 10 mostra uma ilustração da pectina.

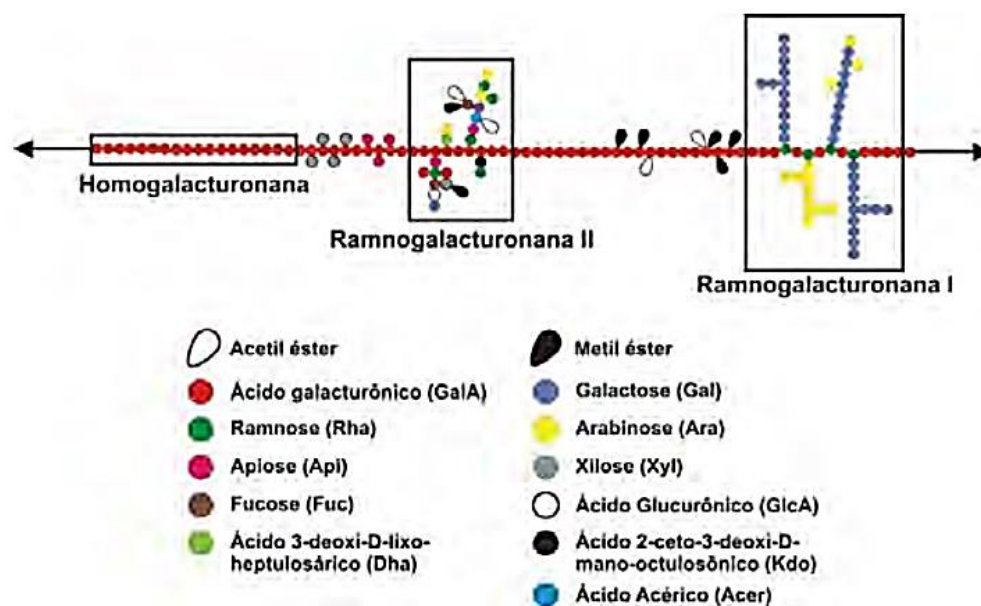


Figura 10. Ilustração mostrando a estrutura e a composição da pectina. MENEGUIN, 2012.

Meneguín e colaboradores avaliaram a influência do uso da P no processo de retrogradação do amido. Os resultados indicam que seu uso em igual proporção à da alta amilose (amido com maior porcentagem de amilose (70%) do que amilopectina (30%)) pode promover um rendimento de até 96% na retrogradação (MENEGUIN *et al.*, 2014). Como outra vantagem, a adição de P originou um material com propriedades adequadas para formação de filmes de revestimento, de modo que nas dispersões contendo apenas AR essas propriedades não foram visualizadas devido à friabilidade do amido.

Assim, para comprovar o desempenho da dispersão formadora de filme AR/P, micropartículas de goma gelana carregadas com insulina foram revestidas com AR/P, demonstrando a capacidade efetiva em controlar a glicemia de ratos diabéticos após administração oral, com redução de até 51% no sangue níveis de glicose (MENEGUIN *et al.*, 2018). Apesar dos resultados favoráveis do ponto de vista terapêutico, estudos de liberação *in vitro* desses sistemas revelaram a liberação prematura de insulina no fluido gástrico simulado (SGF), o qual variou entre 18 e 32%. Tal comportamento foi atribuído à elevada hidrofília da P, a qual é aumentada principalmente em razão de seu baixo grau de metoxilação (LIU *et al.*, 2007). Sabe-se que os sistemas gastrorresistentes caracterizam-se por liberar não mais que 10% do fármaco em meio gástrico simulado dentro de 2 h (USP 30, 2007). Nesse sentido, o avanço das propriedades dos SLOCs

baseados em AR/P pode ser alcançado através da incorporação de nanofibras de celulose (NFC) como reforço.

2.10.4 Nanofibras de celulose

As NFC apresentam-se na forma de feixes de nanofibrilas longas e flexíveis (20-50 nm de diâmetro x 100 µm de comprimento) com domínios cristalinos e amorfos (MÜLLER *et al.*, 2013). Estes domínios permitem alto grau de interação NFC-polímeros e NFC-fármaco, possibilitando aumentar consideravelmente as propriedades mecânicas e de barreira contra a liberação prematura dos fármacos. Assim, com pequenas proporções de NFC na preparação é possível modular a velocidade de liberação do fármaco no local de ação (MANDAL; CHAKRABARTY, 2015). Além disso, as NFC foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas, térmicas, mecânicas e de barreira de fármacos de baixa biodisponibilidade, como por exemplo o metotrexato (MENEGUIN *et al.*, 2017)

Tendo em vista os SLOCs, as NFC apresentam uma característica inerente adicional. Com relação à blenda AR/P (amido retrogrado/pectina), a adição de NFC levou a um aumento na estabilidade térmica, graças à sua interação com as duplas hélices cristalinas de AR (MENEGUIN *et al.*, 2017). Os resultados também mostraram uma melhoria na resistência à perfuração, enquanto as propriedades de barreira indicaram baixa permeabilidade a vapores de água. Após o processo de secagem, as fibras são atraídas através de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila presentes na superfície da celulose, levando ao colapso dessas estruturas. Esse comportamento dificulta a reidratação das NFC nos fluídos gastrointestinais, o que favorece o prolongamento das taxas de liberação (MENEGUIN *et al.*, 2021). Segundo Meneguín e colaboradores, a presença de NFC nas micropartículas de AR/P obtidas pelo processo de *spray-drying* foi fundamental na diminuição do *burst* de liberação do 5-ASA em meio gástrico e duodenal simulado, o que contribuiu para a liberação cólon-específica do 5-ASA (MENEGUIN *et al.*, 2021).

Em estudo conduzido por Kolakovic e colaboradores, as NFC também mostraram benefícios. Os autores avaliaram a aplicabilidade das NFC na formação de sistemas matriciais para liberação sustentada de fármacos. As micropartículas do estudo foram produzidas através do processo de *spray-drying*, carregadas com fármaco. Através dos resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que micropartículas contendo NFC podem sustentar a liberação de um fármaco, por meio de formação de uma rede estreita

de fibras, o que limita a difusão do fármaco a partir do sistema (KOLAKOVIC *et al.*, 2012).

A Figura 11 mostra a estrutura das nanofibras de celulose.

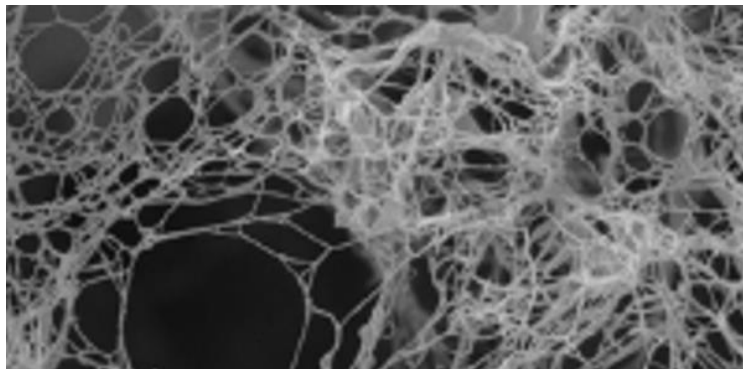


Figura 11. Nanofibras de celulose. <https://nanografi.com/>. c2024 Imagem adaptada e disponível em: <<https://nanografi.com/blog/cellulose-nanofibers/>>. Acesso em 15 de dezembro de 2022.

2.10.5 Micropartículas obtidas por *spray drying*

Micropartículas são sistemas sólidos com dimensões na faixa micrométrica (1-1000 μm), frequentemente utilizadas como carreadores para a liberação controlada de substâncias ativas. De acordo com a organização estrutural, as micropartículas têm sido classificadas em microesferas e microcápsulas. As microesferas são sistemas matriciais esféricos, enquanto as microcápsulas são sistemas do tipo reservatório. Isso porque as microcápsulas contêm um núcleo central contendo a substância ativa, que por sua vez é revestido por uma camada externa (SUAVE *et al.*, 2006). Tal revestimento proporciona uma proteção adicional à substância ativa, permitindo a liberação controlada ao longo do tempo. Ambas as formas oferecem vantagens distintas em termos de estabilidade, controle de liberação e aplicabilidade em diversas áreas, podendo ser sintetizadas através de diferentes métodos físicos e químicos, entre eles, a técnica de aspersão por *spray drying*. Na sequência, a Figura 12 ilustra a diferença entre uma microesfera e uma microcápsula.

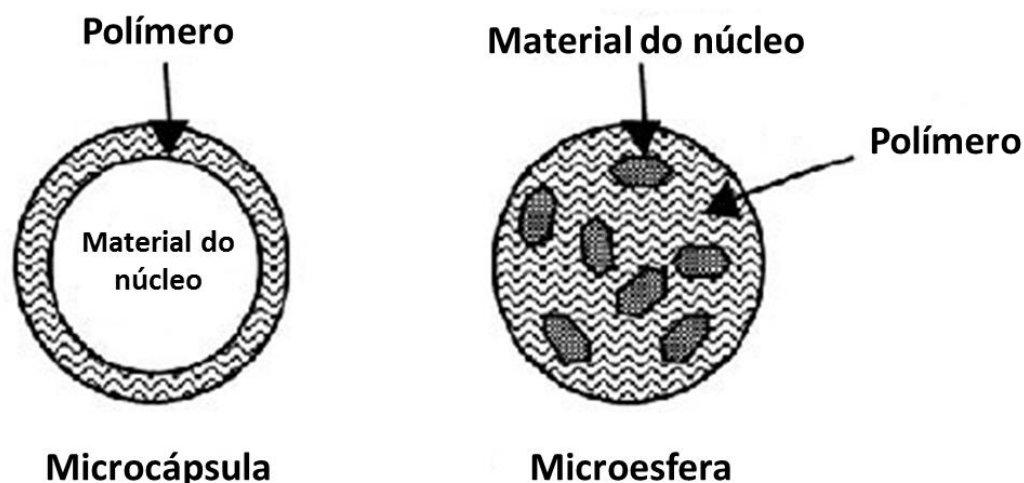


Figura 12. Ilustração esquemática mostrando as diferenças entre uma microcápsula e uma microesfera. Adaptado de TORRADO *et al.*, 1992.

A técnica de *spray-drying* apresenta inúmeras vantagens, razão pela qual é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias, química e farmacêutica. É uma técnica que permite a secagem contínua de grandes volumes de líquido (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007), em que a taxa de alimentação pode variar entre algumas libras por hora até 100 toneladas por hora. Assim, é considerada um processo relativamente rápido e de custo relativamente baixo (BURGAIN *et al.*, 2011) devido ao baixo consumo de energia (SAMBORSKA *et al.*, 2021). O custo da secagem por pulverização pode chegar a ser seis vezes menor a cada quilo de água removida do que o custo da liofilização (KNORR, 1998), por exemplo. Além disso, a técnica é adaptável à amostra (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007), escalonável, *one-step* e consistente para formular partículas pequenas de baixa solubilidade por meio da preparação de dispersões sólidas amorfas.

O processo de *spray-drying* é uma técnica de secagem e microencapsulação contínuo e em etapa única (*one-step*) que consiste na evaporação do solvente presente em uma amostra líquida, dividida em finas gotículas, para a obtenção de um pó seco (ZIAEE *et al.*, 2019). Para o processo de microencapsulação, as formulações de partida, seja na forma de solução, emulsão ou suspensão, devem conter um agente encapsulante, também denominado formador de parede. (SAMBORSKA *et al.*, 2021).

Uma figura esquemática do processo de *spray drying* pode ser observada na Figura 13.

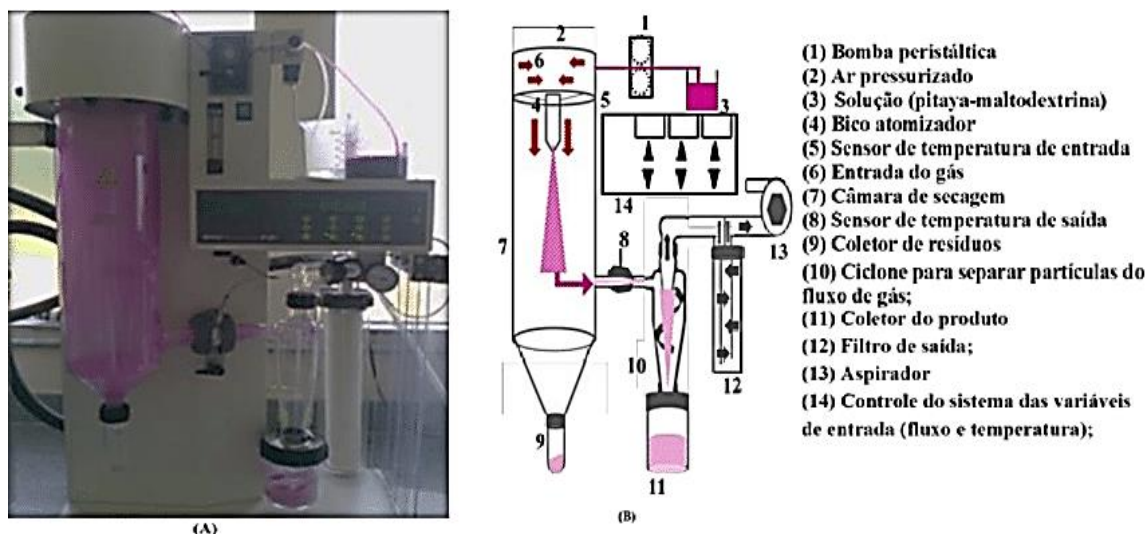


Figura 13. Imagem (A) e ilustração esquemática (B) do equipamento *spray-dryer*, contendo fluxo de ar de secagem. <https://www.researchgate.net/>. c2008-2024. Disponível em < https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Imagem-real-A-e-o-esquema-B-do-spray-dryer_fig3_361226391>. Acesso em 27 de outubro de 2023.

Esquemáticamente, o processo de *spray drying* envolve quatro passos sequenciais, os quais são apresentados abaixo:

1. Formulação da amostra de partida: A substância a ser transformada em pó é dissolvida, emulsificada ou suspensa em um solvente, com auxílio de excipientes do tipo estabilizantes e polímeros encapsulantes;

2. Atomização: A amostra líquida de partida é atomizada, ou seja, dividida em pequenas gotículas, o que pode ser alcançado por meio de um atomizador conectado a ar comprimido, que dispersa o líquido em gotas finas.

3. Secagem: As gotículas formadas são introduzidas em uma câmara de secagem aquecida. Devido à elevada área superficial delas, o contato com o ar quente faz com que o solvente evapore rapidamente, transformando as gotículas em partículas sólidas.

4. Coleta: As partículas secas são separadas, geralmente por um ciclone, e coletadas ao final do processo.

O tamanho das partículas pode ser controlado ajustando-se vários parâmetros, como a taxa de alimentação da solução, a temperatura da câmara de secagem e a taxa de fluxo de ar. Um ponto importante a ser destacado é que a secagem por pulverização oferece qualidade consistente do pó durante todo o processo.

No processo de *spray drying*, a pulverização das gotículas ocorre dentro de uma câmara contendo gás aquecido, as quais apresentam áreas de superfície muito elevadas (1 m³ de líquido atomizado em gotas de tamanho médio de 100 µm origina 60.000 m² de superfície) que estão expostas ao gás de secagem. Esta grande área de superfície facilita a transferência de calor do gás de secagem aquecido para as partículas fluidas atomizadas que resultam na evaporação do solvente em segundos e transferência de massa de volta à fase gasosa. Como resultado, a secagem do material nunca atinge a temperatura de entrada do gás de secagem, sendo a temperatura de saída o valor máximo experimentado pelas partículas, razão pela qual substâncias termolábeis podem ser processadas por *spray drying* (CAL; SOLLOHUB, 2010). De acordo com Wan e colaboradores (1992), o tempo de exposição da amostra ao calor é minimizado, permitindo que o produto seja recuperado cerca de 15°C abaixo da temperatura de saída. Esse fato pode ser aplicado ao processo de microencapsulação de diferentes produtos como antibióticos, vacinas, peptídeos e proteínas, o que possibilita a fabricação de sistemas de liberação controlada, através da criação de estruturas protetoras em torno do fármaco encapsulado (PATEL *et al.*, 2009).

Para o adequado processamento dos materiais, vários são os parâmetros que devem ser avaliados antes de se realizar o *spray-drying*, estando entre os principais a temperatura de entrada (*inlet temperature*) e a temperatura de saída (*outlet temperature*) do ar. A temperatura de entrada corresponde à temperatura do meio de secagem no momento do primeiro contato com a dispersão, sendo medida na frente da entrada de ar de secagem na câmara de secagem. O calor desse ar determina sua capacidade de secar a mistura líquida e essa temperatura influencia a quantidade de solvente que pode ser removida por unidade de tempo (CAL; SOLLOHUB, 2010). Dessa maneira, quanto maior a temperatura do ar de entrada, mais rápida é a evaporação do solvente. Dessa forma, o pó é submetido a temperaturas mais elevadas, podendo alterar as propriedades físicas e químicas de um produto sensível ao calor (MICHAEL, 1993).

Já a temperatura de saída do ar de secagem é derivada da temperatura de entrada, da taxa de fluxo do gás de secagem, da entalpia de evaporação do solvente e da concentração de sólidos na amostra líquida. Considerada como uma consequência da troca de calor em um sistema de secagem com base em fluxo de alimentação de ar (CAL; SOLLOHUB, 2010), a temperatura de saída é responsável por controlar o teor final de umidade do pó obtido (PATEL *et al.*, 2009). Contudo, persistem ainda hoje, antigos desafios no uso da secagem por pulverização na manutenção da viabilidade de probióticos (DAEMEN; VAN DER STEGE, 1982).

2.10.6 Viabilidade de probióticos pós-secagem por *spray drying*

A viabilidade dos probióticos é um parâmetro fundamental a ser determinado, pois esses microrganismos devem estar viáveis no sítio de ação para proporcionar benefícios à saúde (CHAMPAGNE *et al.*, 2011). Dessa forma, além de serem capazes de sobreviver às condições severas do ambiente gastrointestinal, é necessário que os probióticos se mantenham viáveis durante o processamento e período de validade comercial do produto até seu consumo (SARKAR, 2013). Sendo assim, a técnica de microencapsulação tem sido utilizada com sucesso para aumentar a taxa de sobrevivência de probióticos (KIM *et al.*, 2016), sendo uma tecnologia eficiente em manter e proteger a viabilidade dos probióticos (BI *et al.*, 2022). Em função da composição das micropartículas, essas ainda podem agregar sítio-especificidade à liberação dos probióticos, como por exemplo para regiões intestinais de interesse (VIANA *et al.*, 2021).

Em relação ao tratamento das DII, uma alternativa inovadora consiste na co-encapsulação de fármacos usados na terapêutica, a exemplo do 5-ASA, e probióticos. Khazim e colaboradores conduziram um estudo combinando 5-ASA com probióticos e polissacarídeos em grânulos. Como objetivo, o trabalho buscou facilitar a liberação direcionada desses grânulos no cólon. Os autores concluíram que os probióticos *Lactobacillus fermentum* podem ser incorporados diretamente na preparação de grânulos de 5-ASA. O revestimento desses grânulos com 10% de solução de goma-laca como polímero entérico protegeu *L. fermentum* do ambiente ácido e melhorou a taxa de sobrevivência do microrganismo no intestino humano. Portanto, esses grânulos podem ser usados na liberação cólon-específica, promovendo a máxima liberação do fármaco na região (KHAZIM *et al.*, 2020). Em outro estudo, Thakur e colaboradores usaram o probiótico *L. acidophilus* na produção de micropartículas de Eudragit S-100 por *spray-drying* contendo mesalazina, numa abordagem anti-inflamatória direcionada ao tratamento de RCU. O produto apresentou liberação controlada da mesalazina e demonstrou atividade anti-inflamatória (uma das propriedades do *L. acidophilus*), através da diminuição da concentração de IL-8. Além disso, os efeitos colaterais associados ao tratamento convencional da RCU também foram reduzidos, mostrando como a liberação direcionada da mesalazina em conjunto com probióticos pode diminuir os sintomas de RCU (THAKUR *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diversos protocolos de microencapsulação pelo método de *spray drying*, a fim de se identificar e desenvolver condições adequadas à co-encapsulação do insumo farmacêutico ativo 5-ASA e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em micropartículas cólon-específicas, a serem aplicadas, com potencial aplicação, ao tratamento *in situ* da retocolite ulcerativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais estão descritos ao longo deste item e do item 5, conforme são apresentados os métodos, os resultados e as discussões.

4.1 Retrogradação do amido para microencapsulação

O amido foi retrogradado de acordo com metodologia proposta por Meneguín e colaboradores (2021). Alta amilose (AA) (HYLON VII, amido de milho contendo 70% amilose e 30% amilopectina, gentilmente doado por National Starch and Chemical Co. Bridgewater, NJ, USA) foi dispersa em água destilada na concentração de 5% (m/v), sob agitação magnética por 30 min, com acréscimo de 0,02 % de Nipagin® e 0,018 % de Nipazol® como conservantes. Em seguida, a dispersão foi autoclavada para pré-gelatinização a 121°C por 120 min. Ao final do processo, a AA gelatinizada e resfriada à 30°C foi misturada com pectina (CPKelco, baixo grau de esterificação), à 5% m/v, na proporção 1:4. Para o processo de retrogradação, as dispersões foram submetidas a ciclos térmicos alternados de 4°C e 30°C por 16 dias, sendo 2 dias em cada temperatura.

4.2 Obtenção das micropartículas por *spray drying*

As dispersões de AR/P (1:4) obtidas no item 4.1 previamente numa concentração de 5% (m/v) foram diluídas para 2,5% (m/v) de água. Na sequência, foram acrescentadas de: i) 0,5 % (m/v) do fármaco 5-ASA, ii) 10% (m/m) de NFC (Suzano Cellulose & Papel, Limeira, Brasil 3,8% m/v) em relação à massa de AR/P e iii) 400 mg do probiótico comercial Culturelle® (composto pelo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 33156), inulina, sacarose, maltodextrina, antioxidante ascorbato de sódio (INS 301), antieméticos estearato de magnésio (470 i) e dióxido de silício (INS 551), revestido por hidroxipropilmetilcelulose (INS 464) e com corante dióxido de titânio (INS 171), comercializado em cápsulas de 400 mg contendo 10¹⁰ unidades formadoras de colônia (UFC) do probiótico).

O conjunto foi mantido em agitação magnética à 1000 rpm, durante 30 min para completa homogeneização da suspensão. As formulações foram secas em mini *spray-dryer* modelo B191 (Buchi), em regime de fluxo co-corrente, equipado com bomba peristáltica e bico de aspersão pneumática e ciclone para separação de sólidos. Diferentes condições de secagem, como temperatura de entrada, temperatura de saída, taxa de aspiração e fluxo de alimentação, foram testados a fim de obter rendimento e eficiência de encapsulação com alto desempenho, além de manter a viabilidade dos microorganismos. As variáveis de processo e formulação testados encontram-se apresentados na Tabela 4. Também foram obtidas amostras somente com o 5-ASA ou com o probiótico como controles.

Tabela 4. Variáveis aplicadas ao processo de microencapsulação do 5-ASA e probióticos pela técnica de *spray drying*, usando a blenda AR/P, otimizada com NFC.

Nome da amostra (formulação)	Temp. entrada (°C)	Temp. saída (°C)	Taxa de aspiração (%)	Fluxo de Alimentação (%)	Fluxo de alimentação (mL/min)	Eficiência de encapsulação (%) ± desvio padrão
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	120	49 a 56	90	0,08	2,0	56,111 ± 7,03
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	130	58 a 62	90	0,08	2,0	66,997 ± 4,02
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	135	53 a 62	80	0,10	2,5	35,237 ± 0,68
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	140	62 a 68	90	0,08	2,0	69,558 ± 7,73
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	150	59 a 63	80	0,10	2,5	22,471 ± 2,61
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	150	65 a 74	90	0,08	2,0	42,705 ± 2,62
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	160	68 a 79	90	0,08	2,0	80,395 ± 7,28
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	170	60 a 74	80	0,10	2,5	40,219 ± 6,99
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	170	73 a 82	90	0,08	2,0	41,650 ± 5,33
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	180	79 a 84	90	0,08	2,0	81,533 ± 2,66
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	190	81 a 89	90	0,08	2,0	62,529 ± 10,42
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	200	86 a 97	90	0,08	2,0	56,287 ± 5,38
AR/P/NFC/5-ASA/PROB	210	98 a 110	70	0,05	1,25	66,284 ± 4,85
AR/P/NFC/5-ASA	210	90 a 105	70	0,05	1,25	54,960 ± 7,19
AR/P/NFC/5-ASA	210	85 a 99	70	0,07	1,75	52,503 ± 5,97
AR/P/NFC/PROB	150	65 a 73	80	0,10	2,5	Não se aplica
AR/P/NFC/PROB	170	66 a 84	80	0,10	2,5	Não se aplica
AR/P/NFC/PROB	210	91 a 98	70	0,05	1,25	Não se aplica

4.3 Rendimento das micropartículas

O rendimento das micropartículas obtidas por *spray drying* foi determinado através de gravimetria, relacionando-se o peso final das micropartículas (g) com a quantidade inicial de sólidos (g) adicionados à formulação líquida. Assim, foram sintetizados 3 tipos de amostra, a saber: (i) amostra-teste contendo todos os componentes, ou seja, AR/P, NFC, 5-ASA e PROB, (ii) amostra controle positivo para o fármaco, ou seja, contendo todos os componentes com exceção do probiótico (AR/P/5-ASA/NFC) e (iii) amostra controle positivo para o probiótico contendo todos os componentes menos o fármaco (AR/P/NFC/PROB). Dessa maneira, a massa inicial de sólidos da amostra (i) era de 2,025 g (1,25 g de AR/P; 0,125 g de NFC; 0,250 g de 5-ASA e 0,4 g de PROB), da

amostra (ii) de 1,625 g (amostra (i) – 0,4 g de PROB), e da amostra (iii) de 1,775 g (amostra (i) – 0,250 g de 5-ASA). Assim, um rendimento de 100 % significaria que, após a secagem, a massa final obtida deveria ser igual à massa inicial.

4.4 Viabilidade dos microrganismos após processo de *spray drying*

A massa precisamente pesada de 200 mg de micropartículas obtidas no item 4.2 foi incubada em tampão fosfato (pH 7,4) e submetida à agitação magnética (150 rpm, 37 °C) por 2h. Verificou-se, na prática, que no tempo de 2h a micropartícula se desintegrou, o que pôde acarretar a liberação do PROB. Os microrganismos liberados das micropartículas foram enumerados pela técnica de *pour plate* em ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe), a 37 °C, em anaerobiose. As contagens dos PROB ocorreram após 1 e 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente para avaliar sua estabilidade.

Inicialmente, preparou-se o meio de cultura MRS, mantendo a proporção do rótulo do fabricante (70 g do meio em 1 litro de água ultrapura). Dessa forma, dissolveu-se 16,8g do meio em pó em 240 mL para realizar 18 plaqueamentos. Além disso, foi preparado uma quantidade suficiente de PBS em concentração fisiológica de 0,9% (m/v) para as diluições de cada amostra. Tanto o meio de cultura MRS como PBS foram esterilizados. O meio MRS foi autoclavado na temperatura de 121°C, por 15 minutos, para esterilização, enquanto o PBS foi esterilizado por meio de filtro de seringa com poros de 0,22 µm. Em cada placa de Pétri foi adicionado 20 mL de meio MRS esterilizado.

Para realizar o experimento foram usadas amostras suspensas em PBS: i) uma cápsula do probiótico Culturelle[®], contendo 400 mg do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (correspondente à 1×10^{10} UFC) e seus excipientes; ii) a amostra AR/P/NFC/PROB sendo usada a massa total obtida em spray dryer (0,977g); e iii) a amostra AR/P/NFC/PROB/5-ASA, em que se utilizou a massa total obtida de 1,02g.

Após esse processo, foi realizado o método de diluição seriada das amostras a partir da solução-mãe. De cada amostra ressuspensa com as quantidades de solução PBS foi retirado um volume de 100 µL e adicionados em 900 µL de solução PBS no primeiro tubo de diluição. A diluição seriada foi realizada numa escada de 1:10, conforme a Figura 14.

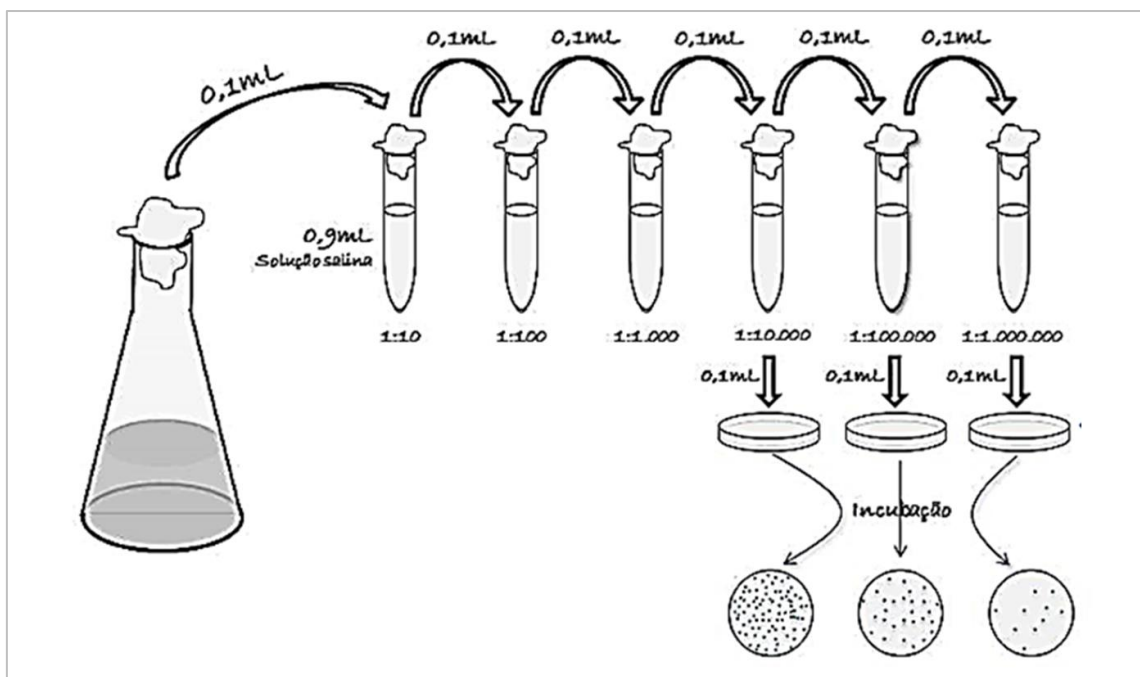


Figura 14. Representação esquemática da diluição seriada das amostras em solução PBS.

Das diluições 4, 5 e 6 foram retirados 100 μ L e inoculados diretamente na placa de Pétri. Na sequência, foram acrescentados 20 mL do meio MRS às placas contendo cada amostra diluída, totalizando 9 placas. Realizou-se a homogeneização de cada placa e a mistura meio MRS e amostra se solidificou em cada placa. As 9 placas foram então incubadas na estufa à 37°C por 48h. Realizou-se a contagem e os resultados foram expressos em log UFC/g.

4.5 Determinação da eficiência de encapsulação (EE)

As micropartículas secas por *spray-drying* foram precisamente pesadas (20 mg) e mantidas sob agitação magnética constante por 2 h em 2,0 mL de tampão fosfato (pH 7,0). As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, durante 10 min, filtradas e o fármaco quantificado em espectrofotômetro UV-VIS (Cary 60-UV-Vis, Agilent) no comprimento de onda de 331 nm, a partir de uma curva analítica previamente validada, com equação da reta $y = 0,0221x + 0,0049$, com R^2 de 0,9999 (MENEGUIN *et al.*, 2021). O mesmo procedimento foi realizado com micropartículas controle (sem fármaco), usadas como branco. A EE foi calculada em triplicata de acordo com a Equação 1:

$$EE\% = \frac{\text{Massa fármaco quantificada}}{\text{Massa total de fármaco adicionada}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

4.6 Difração de Raios-X (DRX)

No presente trabalho, a DRX foi usada para a identificação da estrutura cristalina e/ou amorfa dos polímeros isolados, das amostras retrogradadas e das micropartículas obtidas. Os difractogramas foram obtidos no aparelho automatizado de Difração de raios X D5000-DIFFRAC PLUS XRD Commander (Siemens Instruments, Inc., Alemanha) utilizando radiação monocromática $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$) a 30 mA e 40 kV, com varredura de raios-X de ângulo aberto 2θ entre 2 e 60 ° e velocidade do goniômetro de 0.05 °/s. As amostras foram trituradas em almofariz com pistilo de porcelana e colocadas nos porta amostras de vidro. O excesso de pó foi eliminado e a superfície nivelada com ajuda de uma lâmina de vidro. Os difratogramas dos materiais individuais, misturas e micropartículas foram comparados em função da posição dos picos, presença ou perda de picos, avaliados por análise comparativa.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV)

Para análise da forma e superfície, as micropartículas foram colocadas em porta amostras com fita dupla-face, revestidas com carbono e observadas sob microscópio eletrônico com emissão de campo (JEOL JSM-7500F, Japão) com aceleração da voltagem de 2,00 kV e magnitude de 2500 a 8000 vezes.

4.8 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas em aparelho TA Instruments DSC 4000 (Perkin Elmer), com razão de aquecimento de 10°C min^{-1} , em intervalo de temperatura de 20 a 400 °C, atmosfera de ar sintético e vazão de gás de 100 mL min^{-1} .

4.9 Ensaio de mucoadesão *in vitro*

O ensaio de mucoadesão foi conduzido como descrito por MENEGUIN *et al.*, (2017) com a força e trabalho de mucoadesão quantificados em um Analisador Universal de Textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems). Comprimidos de mucina obtidos através da compressão de 200 mg de mucina tipo II (Sigma-Aldrich) foram posicionados sobre um suporte metálico do equipamento, enquanto as amostras foram cuidadosamente aderidas por meio de fita dupla-face a uma sonda cilíndrica de 10 mm. A sonda foi movida verticalmente em direção ao comprimido de mucina, previamente umedecido à 37°C com 60 μL de PBS pH 6,8, a velocidade constante de 10 mm/ min, até

atingir força de compressão previamente determinada a 0,5N. As amostras foram introduzidas na superfície do comprimido até atingir 1 mm de profundidade, e mantidas nesta posição por 60 s, sem aplicação de força adicional. Em seguida, a sonda foi removida à velocidade de 20 mm/min. Durante a remoção foram então determinadas a força (FMA) e o trabalho (TMA) de mucoadesão para cada amostra. A FMA corresponde à força de destacamento máximo (N) e o TMA, dado em N.seg, que corresponde a área sob a curva da força ao longo do tempo (energia de destacamento).

4.10 Ensaio de liberação do 5-ASA *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* do fármaco 5-ASA foi conduzido em incubadora shaker com agitação orbital de 50 rpm, à 37°C. 20 mg de micropartículas de CS2, CS3 e CS4 (contendo, respectivamente em cada CS, 39,15; 24,90 e; 44,71 µg/mL de fármaco 5-ASA) foram adicionados em diferentes meios de dissolução (2 mL contidos em tubo do tipo Eppendorf) que mimetizam os diferentes valores de pH das principais regiões do TGI: estômago (solução de HCl 0,1 M, pH 1,2, por 120 min), intestino delgado (tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por 240 min) e cólon (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8, por 240 min). O ensaio foi conduzido em triplicata e a amostragem realizada após períodos de 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min. As amostras foram filtradas em filtro de seringa de nylon com poro de 0,45 µm e a quantidade de fármaco liberado quantificada em espectrofotômetro UV-Visível em comprimento de onda de 331 nm (MENEGUIN *et al.*, 2021).

4.11 Aplicação dos modelos matemáticos

Foram empregados, neste trabalho, seis modelos matemáticos com o objetivo de analisar os mecanismos envolvidos nos processos de liberação *in vitro* do fármaco 5-ASA. Os modelos matemáticos foram os de Baker-Lonsdale, de Higuchi, de Korsmeyer-Peppas, de primeira ordem, de Hixson-Crowell e de Weibull.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese das micropartículas, rendimento e viabilidade do probiótico

Diferentes protocolos de secagem em *spray dryer* foram realizados a fim de se identificar aquele que permitisse a co-encapsulação do fármaco 5-ASA e probiótico com elevados rendimento de processos e eficiência de encapsulação, além de estabilidade probiótica. As variáveis de processo (temperatura de saída, aspirador e fluxo de alimentação) e formulação (presença ou ausência de 5-ASA e probióticos) testadas foram apresentadas na Tabela 4, seção 4.2.

Inicialmente, avaliou-se a temperatura de entrada de 210°C, considerando que esta havia sido empregada com sucesso em trabalho anterior do grupo, utilizando AR/P/NFC, porém utilizando somente o fármaco 5-ASA (Meneguín *et al.*, 2021). Assim, formulações contendo somente o fármaco (AR/P/NFC/5-ASA, (F1)), somente o probiótico (AR/P/NFC/PROB, (F2)) ou ambos (AR/P/NFC/5-ASA/PROB, (F3)) foram submetidas às seguintes condições de secagem: 210°C como temperatura de entrada, 70% como taxa de aspiração e 0,05% como taxa de alimentação, conforme padronizado por Meneguín e colaboradores (2021). Esta condição de secagem e todas as demais testadas neste trabalho foram denominadas de ‘CS’. Portanto, esta primeira CS testada foi denominada de CS1.

Para verificar se houve prejuízos ao probiótico, 24 h após o processo de secagem, as amostras contendo PROB foram submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em meio MRS para avaliação da viabilidade probiótica pela técnica de *pour plate* (item 4.4). Os resultados obtidos foram comparados com os do controle Culturelle®, não submetido ao processo de *spray-drying*. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela blenda AR/P e NFC, acrescidas ou não do fármaco 5-ASA e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (PROB), após secagem em *spray-dryer* à 210°C e taxas de aspiração de 70 % e fluxo de 0,05 % de alimentação (CS1). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão).

Formulação	Identificação	Temperatura de saída (°C)	Massa inicial de sólidos (mg)	Massa final de micropartículas (mg) ± desvio padrão	Rendimento (%)	Viabilidade (log UFC/g)
AR/P/NFC+5-ASA	F1	90 a 105	1625	738,3 ± 56,2	45,44 ± 3,45 a	0
AR/P/NFC+PROB	F2	91 a 98	1775	911,0 ± 61,6	51,32 ± 3,47 a	0
AR/P/NFC+5-ASA+PROB	F3	98 a 110	2025	762,5 ± 174,5	37,65 ± 8,62 a	0

Médias de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$). Teste de Tukey.

O rendimento do processo de microencapsulação variou em média de 37,7 a 51,3% entre as formulações, sendo maior naquelas que continham somente o fármaco 5-ASA (51,3%) ou o probiótico (45,4%) do que naquela que continha ambos (37,7%), porém sem diferenças estatísticas entre as formulações ($p>0,05$).

Com relação à viabilidade, não foi observado crescimento de colônias a partir das amostras obtidas com a CS1, indicando que as variáveis de processo aplicadas, principalmente a temperatura de entrada de 210 °C, foram letais para os probióticos. Sabe-se que o processo de secagem em *spray-dryer* é um processo dinâmico que ocorre por transferência de calor e massa após a aspersão da amostra líquida, dividida em milhares de pequenas gotículas em uma corrente de ar quente, o que possibilita uma secagem praticamente instantânea devido à elevada área superficial delas, com prejuízos mínimos à particulada formada. No entanto, vale ressaltar que a temperatura de saída registrada para a CS1 variou entre 90 e 110 °C (Tabela 5), temperatura essa letal para os probióticos.

Por outro lado, foi observado crescimento bacteriano a partir do controle Culturelle® que não passou pelo processo de secagem (valor referencial de $\log 10,00 \pm 0,012$ UFC/400 mg do produto comercial). A partir da enumeração de colônias pela técnica de *pour plate*, concluiu-se que o produto comercial possui $\log 9,61 \pm 0,025$ UFC por cápsula de 400 mg (ou $\log 10,003 \pm 0,021$ UFC por 1 grama de probiótico), portanto, apenas 0,39 log abaixo do valor descrito na bula do produto comercial. Imagens das placas contendo as colônias da bactéria presente nas amostras do Culturelle® são mostradas na Figura 15.

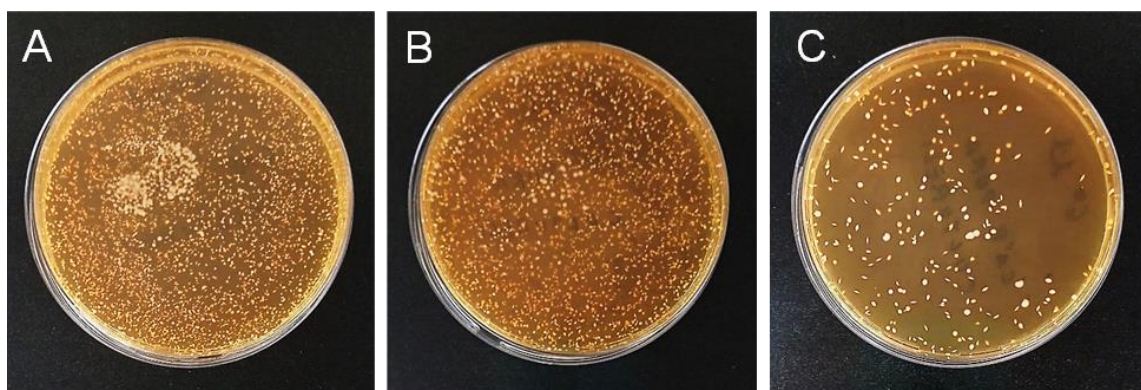


Figura 15. Imagens das colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG presentes no produto comercial Culturelle®, obtidas 72 horas após plaqueamento em meio de cultura MRS após diluição em série da suspensão original. A=diluição 10^4 , B=diluição 10^5 , e C=diluição 10^6 .

A não observação de colônias nas amostras testadas (*spray-dried*) sugeriu que a temperatura de entrada e/ou outro componente do protocolo de secagem poderia ter sido deletéria ao probiótico. Como consequência, com o objetivo de manter a viabilidade, foram testados outros protocolos descritos na literatura (AVILA-REYES *et al.*, 2014; BROECKX *et al.*, 2017; FARAHMANDI *et al.*, 2021; KIEKENS *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2022; ZAVALETA *et al.*, 2022).

Nos novos protocolos, as temperaturas de entrada avaliadas foram de 135°C (CS2), 150°C (CS3) e 170°C (CS4), com taxa de aspiração de 80 % e controle de fluxo de ar de 500 a 600 kPa. No entanto, para a temperatura de entrada de 135°C, a taxa de alimentação precisou ser ajustada para 0,10 %, pois quando as taxas de alimentação descritas nos protocolos originais (0,15 % no protocolo de SUNNY-ROBERTS e KNORR, 2009; 0,25% nos de FARAHMANDI *et al.*, 2021, AVILA-REYES *et al.*, 2014, KIEKENS *et al.*, 2019, e BROECKX *et al.*, 2017; e 0,30% no de AVILA-REYES *et al.*, 2014) foram testadas, a evaporação do solvente da formulação foi deficiente, com perda considerável do material que ficou aderido na parede interna da câmara de secagem, afetando drasticamente o rendimento.

Dessa forma, a formulação AR/P/NFC/5-ASA/PROB foi novamente preparada e submetida às novas condições de secagem. Interessantemente, houve crescimento bacteriano a partir de todas as amostras, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela blenda AR/P e NFC, acrescidas ou não do fármaco 5-ASA e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (PROB), após secagem em *spray-dryer* em temperaturas de entrada de 135 °C (CS2), 150 °C (CS3) e 170 °C (CS4). Os resultados foram obtidos em triplicata (média ± desvio padrão).

Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de saída (°C)	Massa inicial (mg)	Massa final (mg) ± desvio padrão	Rendimento médio (%)	Viabilidade (log UFC/g)
135 (CS2)	56 a 61	2025	749,0 ± 48,0	37,0 ± 2,4 b	4,47 ± 0,08 a
150 (CS3)	60 a 65	2025	698,4 ± 32,9	34,5 ± 1,6 b	4,46 ± 0,18 a
170 (CS4)	71 a 77	2025	973,0 ± 29,6	48,1 ± 1,5 a	4,30 ± 0,13 a

Médias de mesma letra não diferem entre si (p<0,05). Teste de Tukey.

Com estes novos protocolos, o rendimento médio dos processos de secagem foram de 37,0, 34,5 e 48,1% para as temperaturas de entrada de 135, 150 e 170°C, respectivamente. Conforme observado na Tabela 6, houve diferença estatística quando se compara CS4 com CS3 e CS2 em termos de rendimento (p<0,05), mas não em viabilidade probiótica (p>0,05). Interessantemente, e em comparação com a CS1 que levou à

obtenção de micropartículas AR/P/NFC+5-ASA+PROB com 37,7% de rendimento (F3), a CS4 foi mais efetiva, aumentando o rendimento para 48,1%. Apesar de a literatura demonstrar que temperaturas de entrada inferiores (como a aplicada na CS2 em relação à CS1) podem ser responsáveis pela diminuição do rendimento devido à aderência de partículas na câmara de secagem em razão da elevada umidade residual (SALAMA, 2020), a CS4 foi desenvolvida utilizando maior taxa de aspiração (80 % ao invés de 70%). Dessa forma, nesse experimento, supõe-se que valores de aspiração maiores possam ter contribuído para a obtenção de um maior rendimento.

Em relação à viabilidade probiótica, os novos protocolos permitiram crescimento de aproximadamente $\log 4,47 \pm 0,08$, $4,46 \pm 0,18$ e $4,30 \pm 0,13$ UFC por grama de amostra para o protocolo de 135, 150 e 170°C de temperatura de entrada, respectivamente. Imagens de placas com colônias do probiótico a partir das amostras sintetizadas pela CS2 são mostradas na Figura 16.

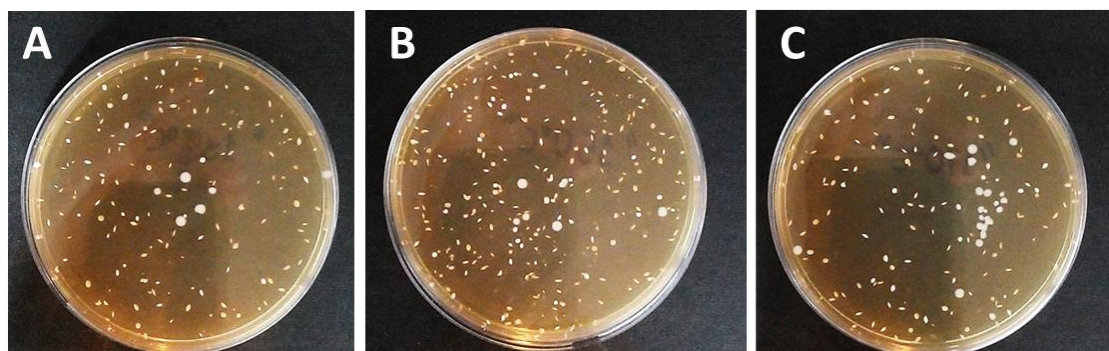


Figura 16. Imagens das colônias de *Lactobacillus rhamnosus* GG presentes nas micropartículas obtidas com temperatura de secagem à 135°C (A), 150°C (B) e 170°C (C), após plaqueamento em meio de cultura MRS, 24 horas após a síntese e observadas após 72 horas de incubação.

As menores temperaturas de entrada foram responsáveis por reduzidas temperaturas de saída, as quais variaram entre 56°C a 77°C, contra 90°C a 110°C para a CS1. Vale ressaltar as importantes diferenças entre temperatura de entrada e saída para uma melhor correlação com a redução do efeito deletério nas partículas formadas. A temperatura de entrada é a mesma que a temperatura do ar que entra na câmara de secagem, o qual é introduzido através do dispersor de ar e que entra em contato com o produto pulverizado na forma de finas gotículas, realizando a evaporação do solvente. No entanto, as partículas finais não experienciam a temperatura de entrada. Isso porque a temperatura máxima que as partículas secas podem atingir é a temperatura de saída,

considerando um processo lento de separação das partículas pelo ciclone. A temperatura de saída, por sua vez, corresponde à temperatura do ar de secagem, acrescida de partículas secas, mais os vapores do solvente, antes de sua entrada no ciclone.

Dessa maneira, a redução das temperaturas de saída em até 56°C impactou positivamente na viabilidade probiótica. Contudo, não se pode afirmar que somente a diferença na temperatura tenha sido a causa da redução da letalidade no probiótico, pois as taxas de alimentação também foram alteradas (de 0,05 para 0,10%). Segundo a literatura, taxas de alimentação maiores também reduzem a temperatura de saída, já que um maior volume de líquido está sendo pulverizado dentro de uma mesma área da câmara de secagem, promovendo o seu resfriamento (SALAMA, 2020).

A fim de buscar um protocolo que permitisse co-encapsular eficientemente o fármaco com uma maior viabilidade do probiótico comparado ao produto comercial utilizado, novos protocolos foram avaliados (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2019; AVILA-REYES *et al.*, 2014; BARAJAS-ALAVAREZ *et al.*, 2022; GUERIN *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2022; ZAVALETA *et al.*, 2022). Além disso, após extensas buscas na literatura, suspeitou-se que a presença dos conservantes antimicrobianos metilparabeno (Nipagin®) e propilparabeno (Nipazol®) (SONI *et al.*, 2005), presentes no processo de retrogradação do amido, poderiam estar interferindo na viabilidade do probiótico. Assim, para testar os novos protocolos, preparou-se uma nova mistura de AR/P, igualmente realizado no item 4.1, porém, excluindo-se os referidos conservantes. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Rendimento (%) e viabilidade probiótica (UFC/g) de amostras compostas pela blenda AR/P e NFC, acrescidas do fármaco 5-ASA e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (PROB), sem a adição dos conservantes antimicrobianos Nipagin® e Nipazol®, após diferentes condições de secagem em *spray-dryer* e faixas de temperaturas de saída. Os resultados foram obtidos em triplicata (média \pm desvio padrão).

Condições de secagem	Temperatura de saída (°C)	Rendimento médio ¹		Viabilidade média (log médio/g de amostra)
		Massa final (mg) \pm desvio padrão	% \pm desvio padrão	
120°C-90A-P0,08 (CS5)	49 a 56	640,0 \pm 114,8 a	31,6 \pm 5,7	0
130°C-90A-P0,08 (CS6)	58 a 62	838,0 \pm 106,4 abcd	41,4 \pm 5,3	0
135°C-80A-P0,1 (CS2)	53 a 62	670,0 \pm 97,6 ab	33,1 \pm 4,8	4,67 \pm 0,025 c
140°C-90A-P0,08 (CS7)	62 a 68	937,7 \pm 80,7 d	46,3 \pm 2,3	0
150°C-80A-P0,1 (CS3)	59 a 63	684,0 \pm 41,9 abc	33,8 \pm 2,1	5,74 \pm 0,016 a
150°C-90A-P0,08 (CS8)	65 a 74	765,7 \pm 73,7 abcd	37,8 \pm 3,6	0
160°C-90A-P0,08 (CS9)	68 a 79	883,7 \pm 40,2 bcd	43,7 \pm 2,0	0
170°C-80A-P0,1 (CS4)	60 a 74	900,0 \pm 93,3 cd	44,5 \pm 4,6	5,32 \pm 0,031 b
170°C-90A-P0,08 (CS10)	73 a 82	804,0 \pm 24,6 abcd	39,7 \pm 1,2	0
180°C-90A-P0,08 (CS11)	79 a 84	914,7 \pm 60,1 d	45,2 \pm 3,0	0
190°C-90A-P0,08 (CS12)	81 a 89	880,0 \pm 50,9 bcd	43,5 \pm 2,5	0
200°C-90A-P0,08 (CS13)	86 a 97	902,0 \pm 42,8 cd	44,5 \pm 2,1	0

¹Baseado na relação entre massa final e massa inicial, que foi de 2025 mg da formulação. Médias de mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

Com relação a viabilidade, a maioria dos protocolos foi totalmente deletéria ao probiótico. Porém, houve crescimento bacteriano para as amostras submetidas aos mesmos protocolos aplicados em CS2, CS3 e CS4, porém sem adição de agentes conservantes durante a retrogradação do amido. Sabe-se que os conservantes metilparabeno (Nipagin®) e propilparabeno (Nipazol®) apresentam ação antimicrobiana e antifúngica (Soni *et al.*, 2005), podendo ter afetado direta ou indiretamente (por meio de interação com a temperatura de entrada) a sobrevivência do probiótico. Assim, a remoção dos conservantes foi responsável pelo aumento da viabilidade probiótica de log 4,47 para log 4,67, de log 4,46 para log 5,74 e de log 4,30 para log 5,32, para as amostras obtidas com temperatura de entrada de 135°C, 150°C e 170 °C, respectivamente. Isto é, a alteração de formulação, associada aos protocolos CS2, CS3 e CS4, aumentou em até 1 log a viabilidade probiótica, o que pode ser traduzido para 1000 UFC adicionais. Houve diferenças estatísticas entre as amostras CS2, CS3 e CS4.

A viabilidade do probiótico foi avaliada também após período de 30 dias de estocagem a 4 e 30°C, seguindo-se os mesmos procedimentos empregados na avaliação da viabilidade 24 horas após o processo de secagem. Neste caso foram avaliadas as

condições de secagem CS2, CS3 e CS4, as quais apresentaram viabilidade após 24 horas. Os resultados são apresentados na Figura 17.

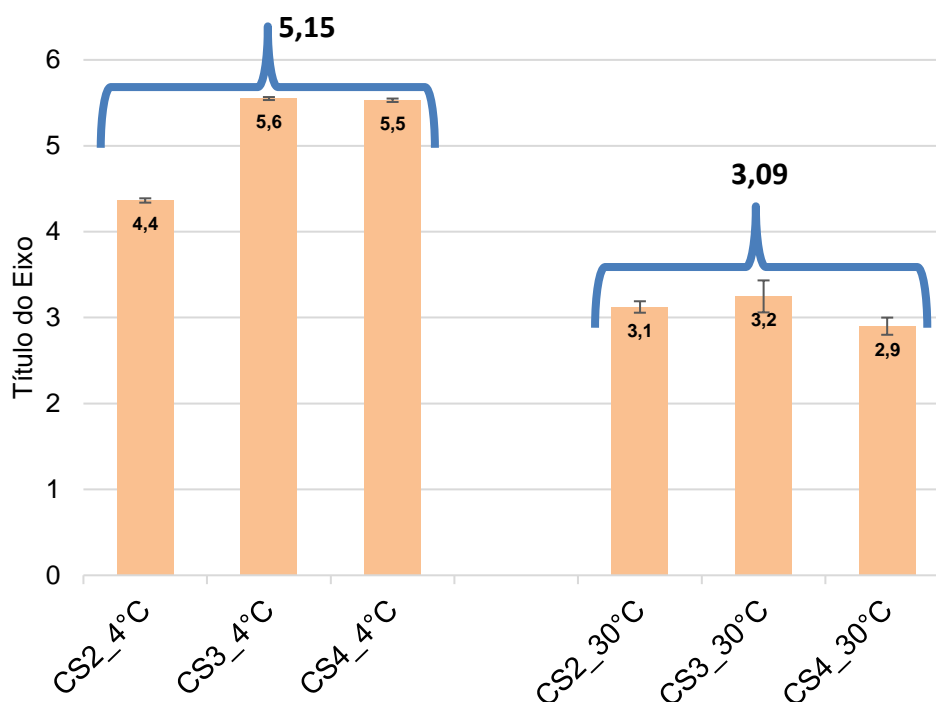


Figura 17. Número de UFC de probióticos enumeradas em placas de Pétri em meio de cultura MRS, a partir de amostras obtidas em CS2, CS3 e CS4 e sem adição dos conservantes Nipagin® e Nipazol®. Após 30 dias de armazenamento à 4 e 30°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A viabilidade probiótica foi significativamente afetada após 30 dias de estocagem à 30 °C. Como pode-se observar na Tabela 12, o log médio entre as UFC entre CS2, CS3 e CS4 em 4°C foi 5,15, enquanto que o log médio entre as três CSs submetidas a temperatura de estocagem de 30°C foi de 3,09. À 4°C houve diferenças entre as amostras, com quantidades maiores de UFC para a CS3 e CS4 (logs $5,55 \pm 0,017$ e $5,53 \pm 0,02$) do que para a CS2 (log $4,36 \pm 0,025$). Esses valores são similares aos obtidos em experimentos anteriores (Tabela 7) após 24 horas de secagem, indicando que a temperatura de 4°C é a mais apropriada para manutenção da viabilidade dos probióticos em micropartículas.

O impacto da temperatura do ar de secagem na sobrevivência de probióticos é controverso. Por exemplo, Burns e colaboradores, em um estudo realizado com duas cepas de *Bifidobacterium lactis*, verificaram que durante o processo de microencapsulação com temperatura média de entrada e saída de 137,5°C ($\pm 3,5$) e 82,5°C

($\pm 7,8$), respectivamente, a taxa de crescimento bacteriano correspondeu à 97 e 98% daquelas observadas antes de serem submetidas ao processo de secagem (BURNS *et al.*, 2017). Resultados positivos também foram obtidos por Gardiner e colaboradores, com bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. expostas a temperaturas de 170°C (entrada) e de 80-85°C (saída) (GARDINER *et al.*, 2000), e por Huang e colaboradores, em 2017, com a viabilidade permanecendo em praticamente 100% após exposição a 127°C (entrada) e 47°C (saída), porém caindo para em torno de 60% quando submetidas a 140°C (entrada) e 60°C (saída) (HUANG *et al.*, 2017). Conforme discutido pelos autores, uma das razões para o reduzido impacto das altas temperaturas sobre os microrganismos podem estar no curtíssimo tempo de exposição, conceito conhecido como tempo de residência (JEANTET, *et al.*, 2008) que, segundo Burgain e colaboradores, chega a ser negligível (BURGAIN *et al.*, 2011). Uma segunda razão pode estar relacionada a um papel protetivo dos polímeros utilizados na encapsulação, como é o caso do amido retrogradado. A combinação desse composto à pectina e nanofibras de celulose, previsto no presente estudo, deve ter oferecido efeito protetivo ainda maior do que quando usados isoladamente.

Por outro lado, vários estudos apontam efeito deletério de elevadas temperaturas de secagem sobre probióticos, por exemplo, quando a bactéria *Lactobacillus rhamnosus* GG foi cultivada em leite desnatado reconstituído RSM (*reconstituted skim milk*) e posteriormente submetida a diferentes temperaturas de entrada e de saída (CORCORAN *et al.*, 2004; DE MAN *et al.*, 1960; KIEKENS *et al.*, 2019; SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2009; SU *et al.*, 2019b; VALDEZ; GIORI, 1993; YIN *et al.*, 2022).

Em um outro estudo envolvendo diferentes cepas de *Lactobacillus*, constatou-se que não só a temperatura de entrada, mas também a de saída afetou a sobrevivência das bactérias. As condições ótimas de secagem foram de 170°C e a de saída de 80 a 85°C. As taxas de sobrevivência de *L. paracasei* NFBC 338 variaram de 97%, quando exposta à temperatura de saída de 70 a 75°C, a 0%, quando exposta à temperatura de saída a 120°C. Houve também variação na resistência entre cepas à temperatura de saída. À faixa de temperatura entre 80 e 85°C, a sobrevivência de *L. paracasei* NFBC 338 foi de 66% ($3,2 \times 10^9$ UFC) enquanto a de *L. salivarius* UCC 118 de apenas 1% ($5,2 \times 10^7$ UFC/g).

Com o objetivo de reduzir as perdas na viabilidade, vários pesquisadores estudaram o efeito da incorporação de substâncias que poderiam atuar protegendo as células bacterianas durante o processo de secagem. Corcoran e colaboradores (CORCORAN *et al.*, 2004) incorporaram no meio RSM inulinas e polidextrose

(prebióticos) e avaliaram essa incorporação sobre uma combinação de três probióticos - *L. rhamnosus* E800, *L. rhamnosus* GG e *L. salivarius* UCC 500. A combinação foi então submetida à secagem nas fases *lag*, *log* e estacionária de crescimento das bactérias. No *spray dryer*, a temperatura de entrada foi de 170 °C, enquanto a temperatura de saída esteve na faixa de 85 a 90°C, o que resultou um produto final com menos de 4% de umidade residual. A viabilidade foi avaliada no dia zero e após 8 semanas de estocagem às temperaturas de 4, 15 e 37°C. Os autores observaram que a perda de viabilidade foi alta, chegando a 570-700 vezes quando estocadas a 37°C por 8 semanas, que a fase estacionária de crescimento e o probiótico *L. rhamnosus* GG foram os que mais resistiram ao processo de secagem, e que a presença da polidextrose não promoveu aumento de viabilidade.

Em outro estudo, Roberts e Knorr (SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2009) testaram a importância da trealose como preservante do probiótico antes do processo de secagem e a incorporação de glutamato monossódico no meio de cultura. No processo de secagem, a temperatura de entrada não foi informada, porém, foi ajustada de tal forma que a temperatura de saída ficasse entre 60 e 75°C, sendo a faixa de 65-70°C considerada ótima para a secagem. A trealose à 20 % aumentou a resistência ao calor, enquanto a incorporação do glutamato monossódico no meio de cultura aumentou a viabilidade dos probióticos *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* E800, com a taxa de sobrevivência permanecendo constante em aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹ quando armazenadas a 25°C em meio contendo trealose-glutamato.

Su e colaboradores (SU *et al.*, 2019b), por sua vez, avaliaram a importância da incorporação do íon cálcio na sobrevivência de *L. rhamnosus* GG. A temperatura de entrada foi de 98°C e a de saída de 65°C. O Ca²⁺ não interferiu significativamente na morfologia das partículas do pó seco e nem influenciou o processo de secagem. A adição de CaCl₂ na solução de reconstituição ou em placas de ágar MRS, em concentrações de 1 e 100 mM, favoreceu a sobrevivência das células do probiótico, aumentando sua sobrevivência de 5 % para 30 %.

Yin e colaboradores (YIN *et al.*, 2022) avaliaram a importância da incorporação do Shellac e da proteína isolada de soja (*Whey Protein Isolate*, WPI) na proteção da bactéria *L. rhamnosus* GG durante secagem. Shellac é um polímero hidrofóbico natural oriundo de substância excretada por *Kerria lacca*, um inseto da ordem Hemiptera oriundo da Tailândia, e considerada segura pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos. A temperatura de entrada empregada foi de 150 °C e a de saída de 75 °C. A

viabilidade foi quantificada por absorvância a OD₆₀₀ do meio líquido e monitorado por 36 h. Antes do processo de secagem, a quantidade de células viáveis das soluções ficaram entre $10,87 \pm 0,06$ log UFC g⁻¹ a $11,12 \pm 0,19$ log UFC g⁻¹. O número de células viáveis diminuiu à medida em que se aumentou a proporção de Shellac:WPI na formulação. Após a secagem, a viabilidade média ficou em $10,36 \pm 0,12$, $10,08 \pm 0,32$, $9,64 \pm 0,21$ e $7,14 \pm 0,18$ log UFC g⁻¹ para as formulações que continham, respectivamente, proporções de WPI:Shellac de 1:0, 2:1, 1:1 e 0:1. A incorporação do Shellac teve, portanto, efeito contrário ao esperado. Ao invés de aumentar, reduziu a viabilidade do probiótico.

Kiekens e colaboradores (KIEKENS *et al.*, 2019) avaliaram o impacto da secagem nas propriedades estruturais da célula de *L. rhamnosus* GG, mais especificamente na estrutura denominada fímbrias (*pili*), importantes na adesão da bactéria às células epiteliais intestinais (LEBEER *et al.*, 2012). Acreditava-se que nessa espécie de probiótico, o processo de secagem poderia causar danos às fímbrias (TRIPATHI *et al.*, 2013) prejudicando suas funções (LEBEER *et al.*, 2012). As fímbrias são frequentemente protegidas por exopolissacarídeos (EPS), os quais podem promover a sobrevivência de *L. rhamnosus* GG durante seu trânsito pelo TGI e em suas interações com o sistema imunológico do organismo (LEBEER *et al.*, 2011). Foi então avaliada a capacidade de adesão da parede das células bacterianas e sua sobrevivência, antes e depois do processo de secagem (135°C de temperatura de entrada e 48-50°C temperatura de saída). De fato, o processo de secagem causou danos às fímbrias e afetou negativamente a sobrevivência do probiótico.

5.2 Rendimento na obtenção das micropartículas

O rendimento variou de 31,6 % para a CS5 a 51,3 % para a CS1 (formulação AR/P/NFC+PROB), valores dentro da faixa de variação obtidos por outros pesquisadores empregando-se os mesmos protocolos de secagem com adição na formulação do mesmo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, acrescentando-se ou não agentes protetores. No estudo Akanny e colaboradores (AKANNY *et al.*, 2020) foram acrescentados nas formulações, de forma isolada, polivinilpirrolidona (PVP), manitol, trealose e Glicidex IT6, resultando em rendimentos respectivos de $30 \pm 6\%$, $59 \pm 3\%$, $50 \pm 3\%$ e $54 \pm 4\%$. Segundo os autores, a redução para 30 % observada com a adição do PVP pode estar associada ao provável caráter viscoso desse agente protetor (AKANNY *et al.*, 2020). Broeckx e colaboradores (BROECKX *et al.*, 2017) também observaram a formação de

um pó úmido com o uso de manitol e dextrano e baixo rendimento do produto final, diferente do que ocorreu quando se empregou lactose ou trealose.

Neste presente trabalho, as causas do maior rendimento às temperaturas mais altas podem estar relacionadas a um menor resíduo de umidade no produto final, visto que sob altas temperaturas, a evaporação do solvente tende a ser mais eficiente. De fato, isso se verifica quando se compara os rendimentos obtidos com as formulações submetidas às condições de secagem CS5, CS6, CS7, CS8, CS9, CS10, CS11, CS12, CS13, onde se varia apenas a temperatura de entrada. Porém, comparações entre as condições de secagem CS7 x CS8; CS9 x CS10; CS11 x CS12; e a CS7 com as demais (exceção de F2) sugerem que não só a temperatura pode ter influência no rendimento, pois existem situações em que o aumento da temperatura de entrada (mantidas todas as outras condições) resultou em queda de rendimento.

No presente trabalho, a temperatura de saída foi menor do que a temperatura de entrada para todas as condições testadas, como esperado, variando na faixa de 49 a 56°C para o tratamento onde temperatura de entrada foi de 120°C, até a faixa de 88 a 110°C para os tratamentos onde a temperatura de entrada foi de 210°C. A explicação para isso vem do fato de que a temperatura de saída resulta da combinação da temperatura de entrada, da taxa de aspiração, da taxa de alimentação, do solvente utilizado na mistura e também da concentração da dispersão a ser seca por pulverização, conforme demonstrado na literatura (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2019; AKANNY *et al.*, 2020; BARAJAS-ALAVAREZ *et al.*, 2022; GUERIN *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2020; MOAYYEDI *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2022; ZAVALETA *et al.*, 2022). Isso ressalta como as variáveis do processo de secagem estão associadas e interligadas entre si, mostrando que pequenas alterações em um parâmetro podem gerar modificações em outros.

O principal objetivo de uma secagem por atomização é remover o solvente por evaporação, ao mesmo tempo que promove a formação de micropartículas pulverizadas no fluxo de ar quente. Estas resultam de um revestimento que protege o interior dessa estrutura 3D (no presente trabalho composta pela mistura AR/P/NFC/5-ASA/PROB) de possíveis estresses térmicos. A temperatura de saída, aquela que corresponde ao fluxo de ar contendo as micropartículas sólidas antes de atingirem o ciclone (porção final do equipamento *spray-dryer*), não são necessariamente idênticas a do produto. Apesar do breve período de passagem através do equipamento, geralmente menor que 2 segundos, o contato das partículas com o ar quente acaba por reduzir sua temperatura resultando, conforme demonstra esse trabalho, corroborando trabalhos já publicados, em

temperaturas de saída mais baixas que as de entrada. Além disso, o trabalho mostrou como as alterações em um parâmetro podem proporcionar diferentes efeitos em outras variáveis tecnológicas como taxa de alimentação e taxa de aspiração.

5.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A Tabela 8 mostra a EE do 5-ASA após diferentes processos de secagem descritos nos vários experimentos conduzidos, empregando-se diferentes condições de secagem. Os valores médios obtidos variaram entre 22,5 e 81,5%. Os dados foram submetidos a análise de variância e a significância das diferenças entre as médias determinada pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Eficiência de encapsulação (%) do fármaco mesalazina (5-ASA) em micropartículas baseadas em AR/P/NFC, contendo 5-ASA e probiótico, após diferentes condições de secagem (CS) em *spray dryer*, apresentados em ordem decrescente (média \pm desvio padrão, n=3).

Condições de secagem (Tratamento)	Eficiência de encapsulação (%) * \pm desvio padrão
180°C-90A-P0,08 (C11)	81,533 \pm 2,66 a
160°C-90A-P0,08 (CS9)	80,395 \pm 7,28 a
140°C-90A-P0,08 (CS7)	69,558 \pm 7,73 b
130°C-90A-P0,08 (CS6)	66,997 \pm 4,02 b
210°C-70A-P0,05 (CS1)	66,284 \pm 4,85 b
190°C-90A-P0,08 (CS12)	62,529 \pm 10,42 bc
200°C-90A-P0,08 (CS13)	56,287 \pm 5,38 cd
120°C-90A-P0,08 (CS5)	56,111 \pm 7,03 cd
210°C-70A-P0,05(CS1) (s/PROB)	54,960 \pm 7,19 cd
210°C-70A-P0,07 (CS14)	52,503 \pm 5,97 de
150°C-90A-P0,08 (CS8)	42,705 \pm 2,62 ef
170°C-90A-P0,08 (CS10)	41,650 \pm 5,33 f
170°C-80A-P0,10 (CS4)	40,219 \pm 6,99 f
135°C-80A-P0,10 (CS2)	35,237 \pm 0,68 f
150°C-80A-P0,10 (CS3)	22,471 \pm 2,61 g

*Médias com mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$).

A EE do 5-ASA em micropartículas baseadas em AR/P/NFC, contendo probióticos, e obtidas em diferentes CS, variou entre 22,47 % e 81,53%. Entre as diferentes amostras, verificou-se que as CS mais eficientes foram a CS11 e CS9, com EE acima dos 80%. Na sequência, CS7, CS6 e CS1, com EE acima de 66%, sem diferenças significativas entre elas, e as menos eficientes foram as condições CS8, CS10, SC4, CS2, e CS3, que resultaram em EE abaixo de 42,7%. As causas das maiores EE verificadas

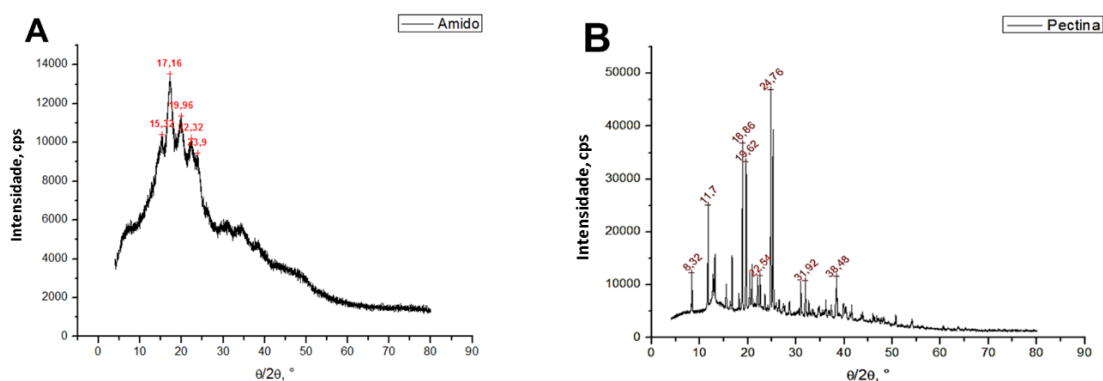
para as CS CS1, CS6, CS7, CS9 e CS11 em relação às CS8, CS10, SC4, CS2 e CS3 não são explicadas nem pela temperatura de entrada e nem pelas taxas de aspiração ou de alimentação, visto que nos protocolos testados esses fatores variaram consideravelmente, ou seja, a temperatura de entrada variou de 120 a 210 °C, a taxa de aspiração de 70 a 90 % e a taxa de alimentação de 0,05 % a 0,10 % (respectivamente, entre 1,25 mL/min e 2,5 mL/min).

A CS1 foi testada com formulação AR/P/NFC com e sem probiótico. Na presença do PROB, a EE do 5-ASA foi maior (66,3 %) do que na formulação sem o mesmo (55,0 %), porém não houve diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p > 0,05$). No entanto, observa-se que as CS que apresentaram menores EE dentre todas (CS2, CS3 e CS4, com respectivamente 35,2, 22,5, e 40,2 %) foram as únicas favoráveis à viabilidade probiótica. Esses resultados sugerem que, dentro do espaço da micropartícula, pode ter ocorrido competição entre o fármaco mesalazina e o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG pela ocupação dessa cavidade.

Considerando que a micropartícula é uma microesfera ou uma microcápsula, o espaço interno é limitado e isso pode ter contribuído para uma maior encapsulação de fármaco em vez do fármaco. Mais estudos nessa área são necessários para confirmar ou refutar essa hipótese de explicação ou, ainda, trazer uma outra proposta de explicação.

5.4 Difração de Raios-X (DRX)

Difratogramas dos polímeros isolados amido, pectina, AR/P e das NFC empregadas nas formulações encontram-se organizados na Figura 18.



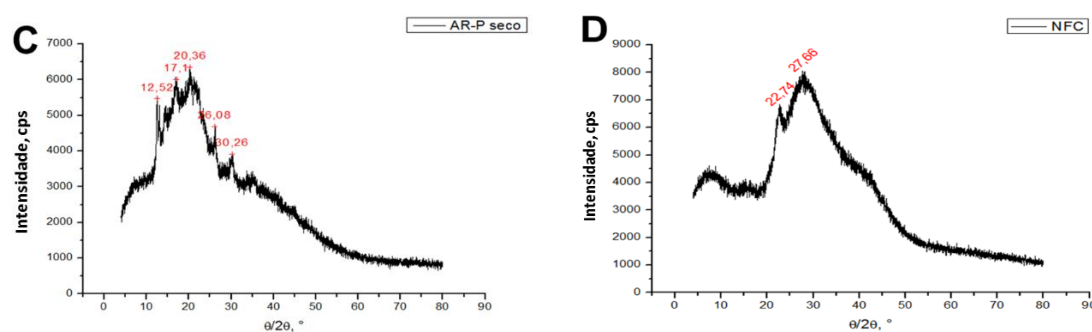


Figura 18. Difratoograma do amido puro (A), pectina pura (B), amido retrogradado + pectina (C) e nanofibras de celulose (D).

O amido puro (Fig. 13 A) exibiu picos em $15,32^\circ$, $17,16^\circ$, $19,96^\circ$, $22,32^\circ$ e $23,9^\circ$ (2θ), característicos de uma estrutura cristalina do tipo-B, com maior intensidade encontrada em $17,16^\circ$ (2θ), sugerindo uma estrutura cristalina altamente ordenada de complexos lipídio-amilose em grânulos de amido (MENEGUIN *et al.*, 2021). A pectina pura (Fig. 13 B) exibiu uma série de picos intensos e bem definidos, em $8,32^\circ$, $11,7^\circ$, $18,86^\circ$, $19,62^\circ$, $22,54^\circ$, $24,76^\circ$, $31,92^\circ$ e $38,48^\circ$ (2θ), atribuídos à sua alta cristalinidade. Na fração da mistura de amido retrogradado + pectina (AR/P) sem fármaco e sem probiótico (Fig. 13 C), observou-se redução de intensidade e quantidade de picos característicos em relação à pectina e ao amido. Isso não indica amorfização dessa amostra, já que novos picos em $12,52^\circ$, $17,1^\circ$, $20,36^\circ$, $26,08^\circ$ e $30,26^\circ$ (2θ) foram apresentados e o pico da pectina em aproximadamente 16° (2θ) foi mantido. Segundo Meneguín e colaboradores (MENEGUIN *et al.*, 2021), embora o padrão de difração de raios-X do AR/P pareça semelhante ao do amido, um pico não muito intenso em $12,52^\circ$ (2θ) (aproximadamente 13°) pode ser atribuído à estrutura cristalina do tipo-V obtida após o processo de retrogradação do amido. Segundo Htoon e colaboradores (HTOON *et al.* 2010), picos em aproximadamente 13° e 21° confirmam esses resultados característicos de estrutura cristalina tipo-V, formada após a gelatinização do amido, seguido de ciclos de resfriamento, na qual a estrutura da alta amilose do amido passa de tipo-B para tipo-V. Segundo Silva *et al.*, 2019 e Meneguín *et al.*, 2021, picos cristalinos de nanofibras de celulose (NFC) são característicos em $16,3^\circ$ e $22,7^\circ$ (2θ). Neste trabalho, os picos de NFC foram evidenciados em $22,74^\circ$ e $27,66^\circ$ (2θ), indicando a fase cristalina dessa estrutura (Fig. 13 D).

Difratoogramas do 5-ASA puro e do probiótico empregados nas formulações encontram-se nas Figuras 19. O difratoograma do fármaco 5-ASA puro mostra picos intensos e bem definidos, indicativo de sua cristalinidade (Fig. 14 A). Para 2θ , os picos

foram em $7,52^\circ$, $15,08^\circ$, $16,52^\circ$, $22,44^\circ$, $24,16^\circ$, $27,14^\circ$, $28,20^\circ$, $30,48^\circ$, $38,40^\circ$, $40,38^\circ$ e $43,54^\circ$. Xu e colaboradores observaram valores próximos para o 5-ASA puro, alguns picos típicos em $2\theta = 7,12^\circ$, $12,92^\circ$, $14,36^\circ$, $16,90^\circ$, $21,28^\circ$ e $26,46^\circ$ (XU *et al.*, 2008), o que confirma que o fármaco apresenta alta cristalinidade. O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG é um sólido amorfo, conforme demonstraram Su e colaboradores (SU *et al.*, 2019b). Neste trabalho, o probiótico Culturelle apresentou halo amorfo (entre 10° e 40° (2θ), com apenas um ruído característico em $21,84^\circ$ (2θ), não muito intenso (Fig. 19 B).

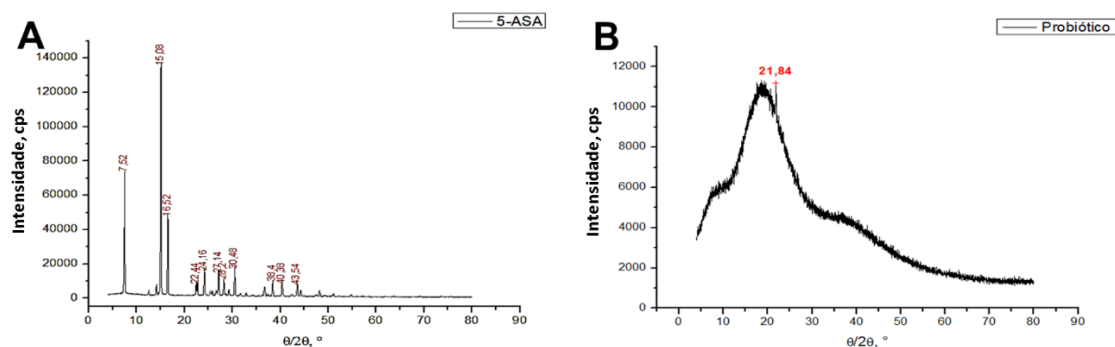


Figura 19. Difratoograma do 5-ASA puro (A) e do probiótico (B).

Neste trabalho, as análises de DRX para as micropartículas só foram realizadas para aquelas obtidas através das condições de secagem CS1, CS6, CS7, CS9, e CS12, considerando seus maiores percentuais de EE, ou seja, massa de fármaco altamente cristalino que pode levar a alterações estruturais na microestrutura. Os difratogramas encontram-se apresentados na Figura 20.

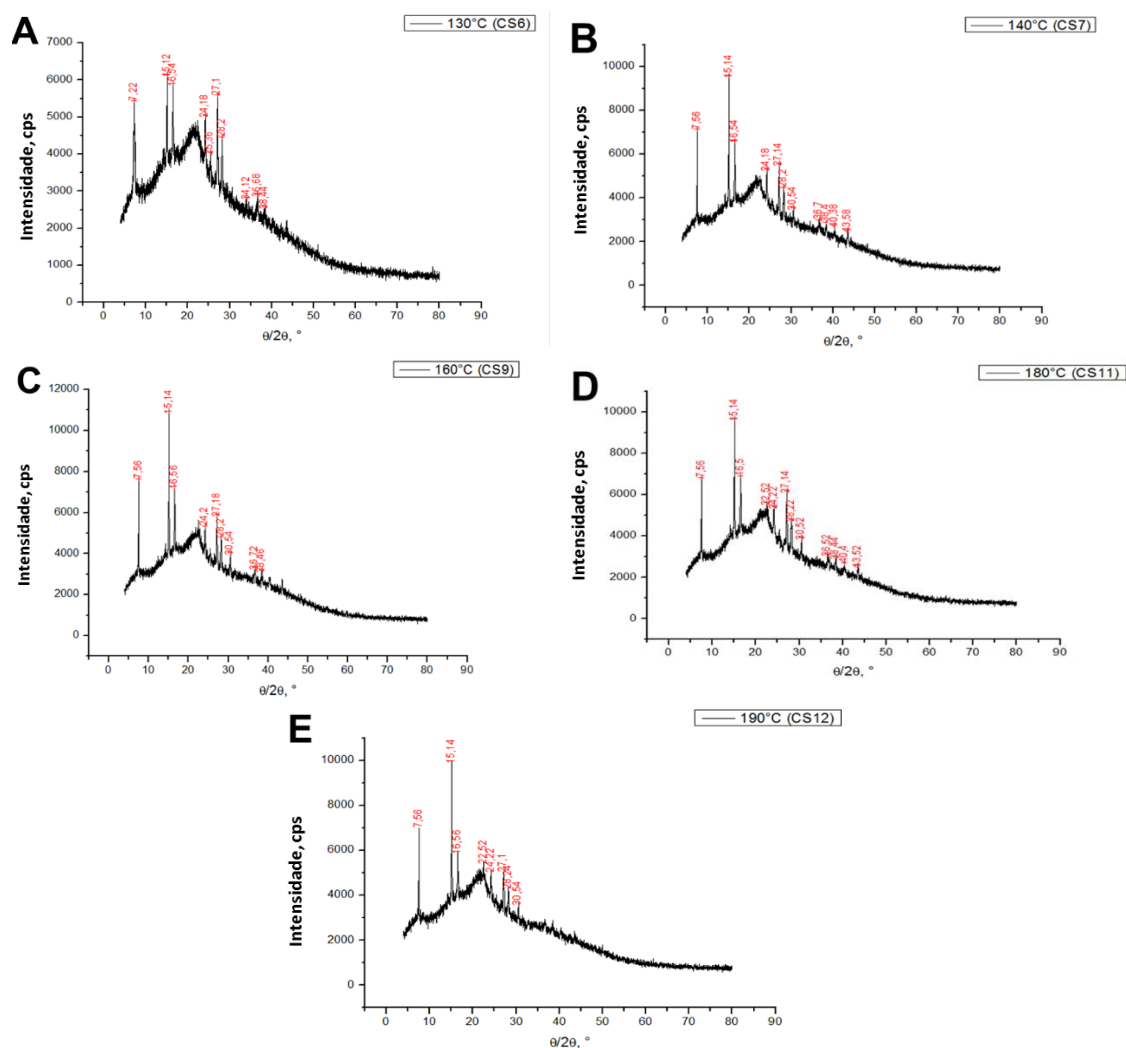


Figura 20. Difratoograma da formulação F3 (AR/P/NFC+5-ASA+PROB) após processo de secagem CS6 (130°C) (A), CS7 (140°C) (B), CS9 (160°) (C), CS11 (180°) (D), CS12 (190°) (E).

Após passar pelas condições de secagem CS6, CS7, CS9, CS11 E CS12, todas as amostras apresentaram perfil semelhante de AR/P, picos coincidentes com o 5-ASA, da pectina e da NFC. Além disso, também apresentam um pico característico perto de 21°, característico do AR, e que indica que manteve a cristalinidade do AR.

No trabalho de Meneguim e colaboradores (2021) com micropartículas de AR/P/NFC contendo 5-ASA, o processo de secagem resultou na diminuição de cristalinidade do AR/P, comportamento relativamente frequente aos materiais submetidos ao *spray drying*. Já no presente trabalho, as micropartículas desenvolvidas conservaram os padrões de difração de interesse, mostrando que as condições de secagem testadas, visando microencapsulação do 5-ASA e do probiótico, foram adequadas. A redução de

crystalinidade, ou alteração no perfil de padrão de curva do amido, provavelmente ocasionaria uma redução da capacidade responsiva às enzimas colônicas do AR.

5.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem como objetivo avaliar qualitativamente a morfologia das micropartículas, uma vez que essa técnica fornece imagens detalhadas da sua superfície (FREIRE *et al.*, 2009). As Figuras 21 a 28 mostram imagens MEV de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB), com tamanho variando entre 1 e 10 μm . Todas as amostras, independentemente da condição de secagem adotada, apresentaram morfologia aproximadamente esférica, característica das amostras obtidas por *spray drying*. O formato esférico deve-se ao fato de a dispersão de polímeros, fármaco e probióticos ser atomizada na forma de pequenas gotículas de alta área superficial, as quais rapidamente se transformam em partículas secas, respeitando o formato das gotas quando condições ideais para secagem do solvente são aplicadas.

As imagens obtidas por MEV da formulação submetida à CS6 (130°C) (Fig. 21 A, B) mostram micropartículas com formato predominantemente esférico, com superfície rugosa e algumas concavidades (irregularidades na superfície), as quais sugerem uma rápida evaporação do solvente que interfere na formação da matriz polimérica da micropartícula. Além disso, as maiores micropartículas apresentaram tamanho entre 9,1 e 9,7 μm . Também é possível observar alguns cristais do fármaco 5-ASA secos na forma livre, indicando que parte do fármaco se encontra não encapsulada, como esperado e demonstrado pelas análises de EE.

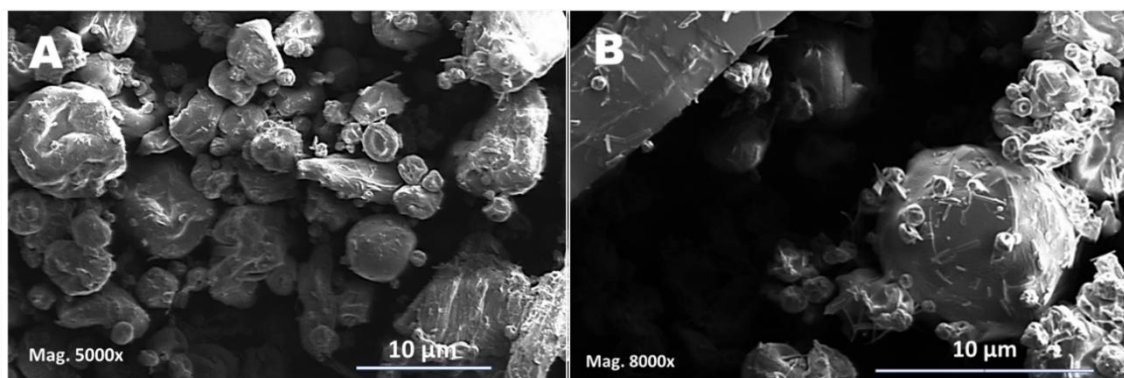


Figura 21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS6 (130°C-90A-P0,08), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.

Nas imagens obtidas da formulação submetida à CS2 (135°C) (Fig. 22 A, B) também se verificam micropartículas esféricas. Algumas micropartículas apresentam irregularidades na superfície, enquanto outras aparentam ser mais maciças, forte evidência de co-encapsulação dos componentes da formulação (AR, P, NFC, PROB, 5-ASA), os quais preenchem os espaços vazios entre as cadeias poliméricas, tornando-as mais túrgidas. Além disso, as micropartículas de menores tamanhos atingiram 4,6 μm , enquanto as de maiores tamanho, 9,7 μm . Como o probiótico é um bacilo e não foi observado nestas fotomicrografias, isso pode ser sugestivo do sucesso de sua microencapsulação. Também se verifica presença de cristais de fármaco 5-ASA.

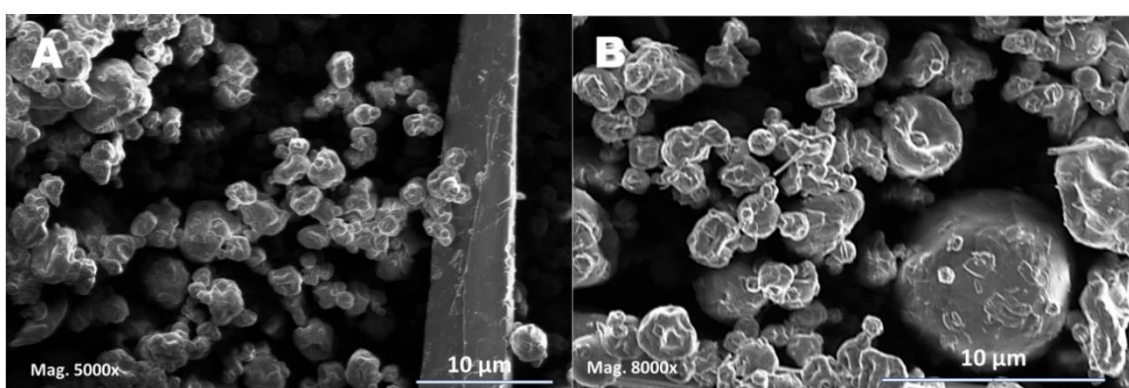


Figura 22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS2 (135°C-80A-P0,10), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.

Na amostra da formulação submetida à CS7 (140°C) (Fig. 23 A, B), as micropartículas de tamanhos mais uniformes, mais aglomeradas e arredondadas. Apesar de ainda apresentar irregularidades na superfície, estas ocorrem em menor incidência nas estruturas. Observa-se ainda a presença de cristais de fármaco 5-ASA, e se verifica evidência de bastonetes, sugestivo da presença dos microrganismos probióticos não encapsulados.

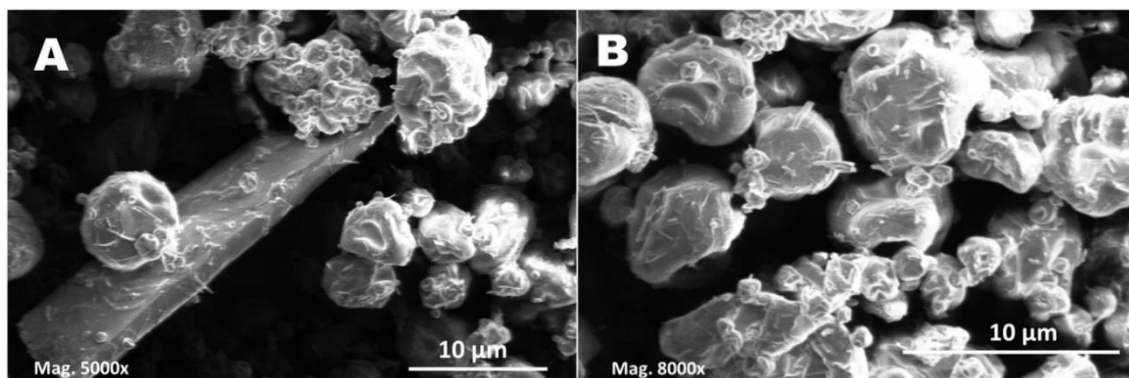


Figura 23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS7 (140°C-90A-P0,08), aumentadas 5000 (A) e 8000 (B) vezes.

Na formulação submetida à CS3 (150°C) (Fig. 24 A, B), que também apresentou viabilidade probiótica, verifica-se presença de cristais de 5-ASA (B), micropartículas de cerca de 10,0 µm de diâmetro (A), as quais foram mais esféricas, arredondadas e maciças, mesmo padrões observados na formulação submetida à CS2, indicando uma suposta co-encapsulação de fármaco com probiótico.

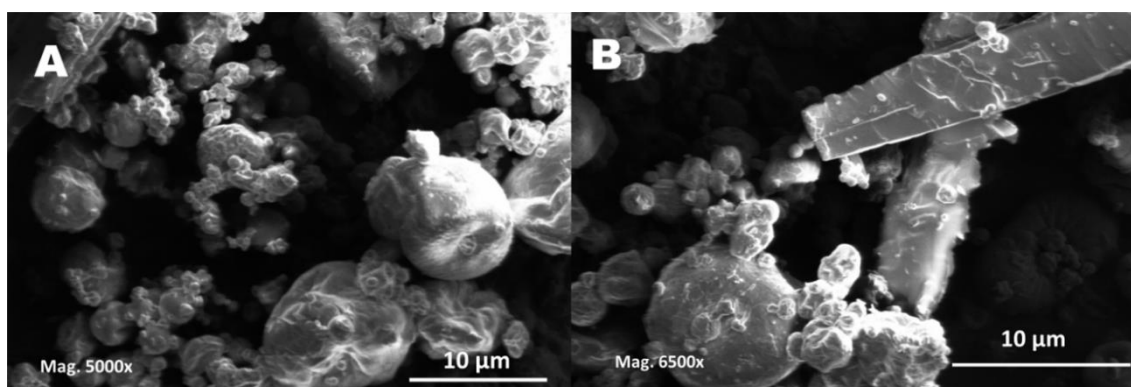


Figura 24. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS3 (150°C-80A-P0,10), aumentadas 5000 (A) e 6500 (B) vezes.

Na amostra da formulação submetida à CS9 (160°C) (Fig. 25 A, B) e que também apresentou viabilidade probiótica, observa-se a presença de micropartículas de diferentes tamanhos (conforme mostrado nas fotomicrografias), de formato predominantemente esférico, com irregularidades na superfície e cristais de 5-ASA.

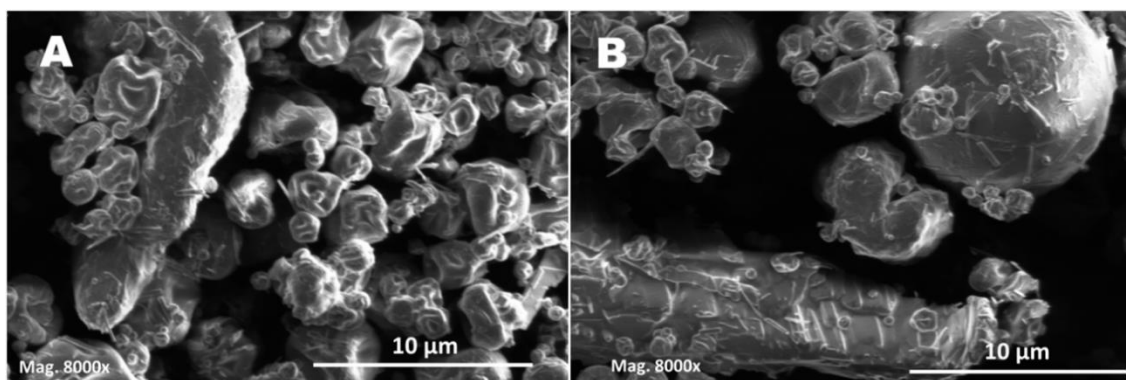


Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS9 (160°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 8000 vezes.

Na formulação submetida à CS4, que foi tratada a 170°C (Fig. 26 A, B), observam-se micropartículas esféricas e maciças, atingindo cerca de 10 µm e as de padrão achatadas e rugosas, apresentando uma característica de aglomeração. Cristais de 5-ASA também são evidentes.

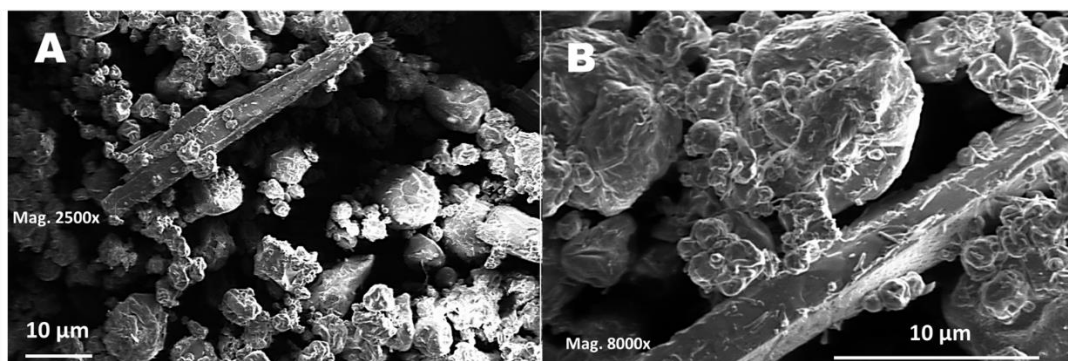


Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS4 (170°C-80A-P0,10), aumentadas 2500 (A) e 8000 (B) vezes.

Na amostra da formulação submetida à CS11 (180°C) (Fig. 27 A, B), ocorrem micropartículas arredondadas, esféricas e grandes, com até 15 µm. Poucas micropartículas pequenas e achatadas são observadas, presença de cristais de 5-ASA e não se verifica a presença de bastonetes.

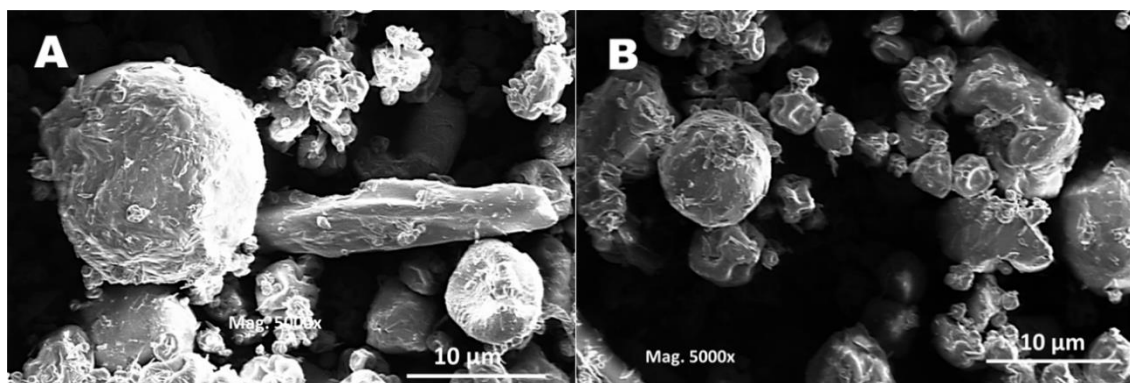


Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS11 (180°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 5000 vezes.

Na amostra da formulação submetida à CS12 (Fig. 28 A, B), que passou pela temperatura de entrada de 190°C, ocorre a presença de micropartículas arredondadas e de formatos irregulares, variando entre 7,5 e 9,4 µm, além da presença de cristais de 5-ASA.

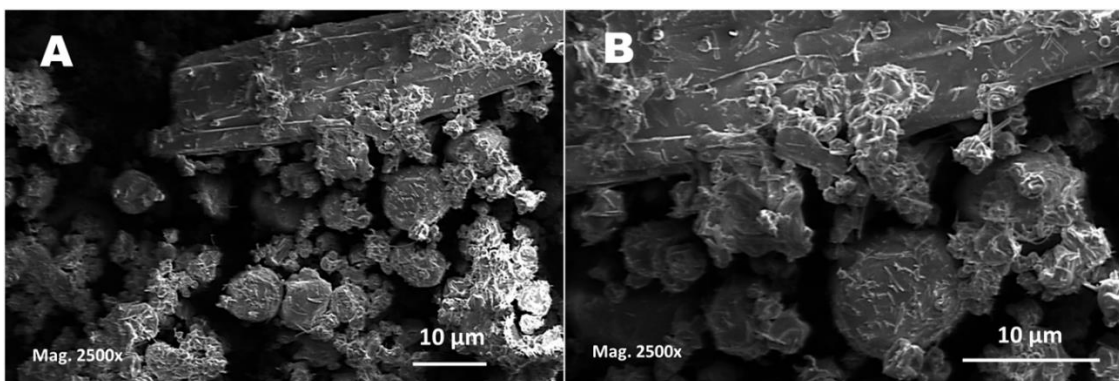


Figura 28. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de amostras da formulação F3 (AR/P/NFC/5-ASA/PROB) após processo de secagem à condição CS12 (190°C-90A-P0,08), ambas (A e B) aumentadas 2500 vezes.

5.6 Análise térmica (DSC)

O teste de análise térmica foi realizado com as amostras que obtiveram maiores valores de eficiência de encapsulação (EE) do fármaco 5-ASA. O objetivo foi observar os efeitos da secagem por *spray dring* nas amostras que tiveram maiores valores de EE e verificar os efeitos da secagem na cristalinidade do fármaco 5-ASA e na blenda AR/P/NFC. As curvas DSC dos polímeros isolados, fármaco e probiótico são apresentadas nas Figuras de 29 a 32. Na amostra do probiótico (Fig. 29), foi observado um evento endotérmico entre as temperaturas de 23,99 °C e 200 °C, com t_{peak} (pico máximo) em torno da temperatura de 100 °C, associado ao processo de evaporação da água. Por outro lado, foram verificados dois eventos exotérmicos entre a faixa de 200 °C e 240 °C com t_{peak} de 221,29 °C, seguido por outro menor à 224,09 °C, podendo estar relacionado ao processo de desnaturação e degradação proteica da bactéria (HOSSEINI *et al.*, 2022).

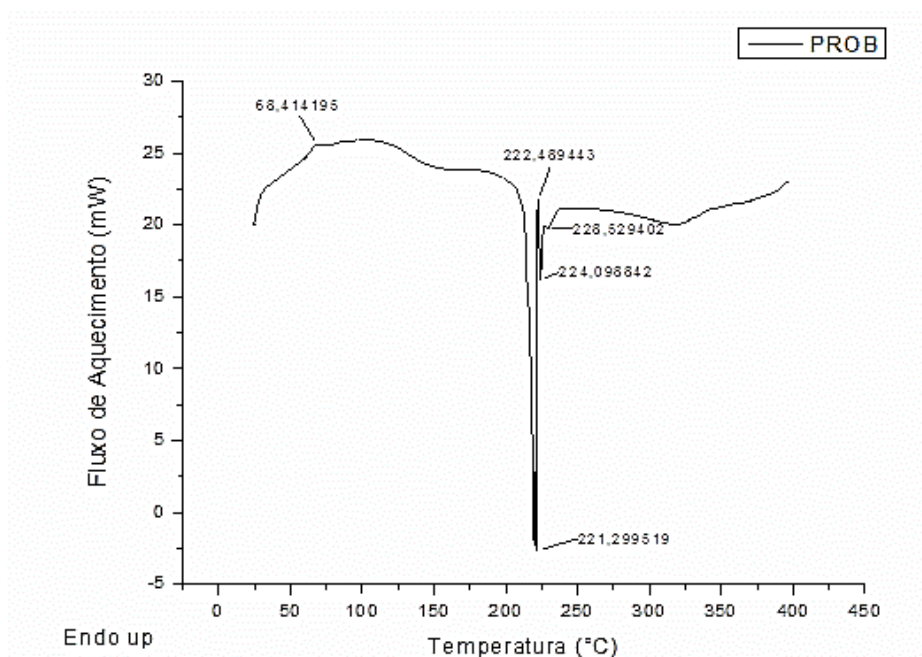


Figura 29. Curva DSC do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Na amostra de AR/P (Fig. 30), foram observados dois eventos endotérmicos, o primeiro ocorrendo na temperatura de 61,42°C e atribuído à gelatinização do amido (CARBINATTO *et al.*, 2012), a qual ocorre mediante seu aquecimento na presença de água, havendo perda de estrutura cristalina e transformação para o estado de pasta. O segundo evento endotérmico ocorreu com t_{peak} de 142,43 °C, relacionado à evaporação da água quimicamente ligada à estrutura (CARBINATTO *et al.*, 2012). Na temperatura de 238,97 °C, houve a presença de um pico exotérmico, o qual pode ser atribuído à despolimerização de cadeias de pectina e à decomposição da amilose do amido. Carbinatto e colaboradores (CARBINATTO *et al.*, 2012) relataram comportamentos semelhantes, de modo que em temperaturas próximas a 210 °C houve a despolimerização das cadeias de pectina e acima de 244 °C, decomposição da amilose do amido. Em todas as amostras testadas, houve a presença de um pico exotérmico semelhante, evidenciando esse possível acontecimento com as amostras.

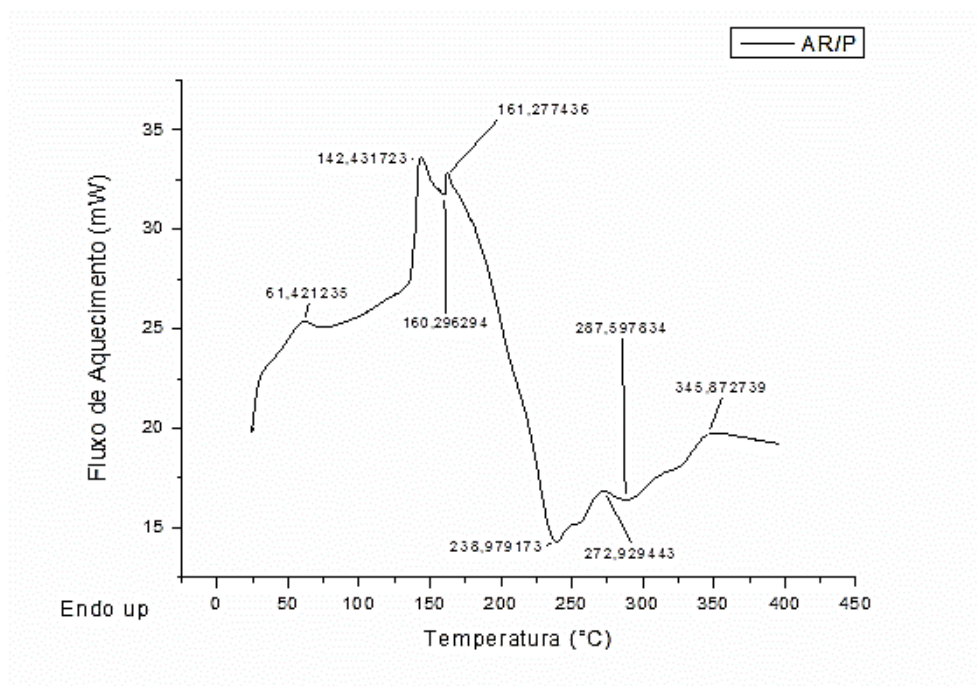


Figura 30. Curva DSC da blenda AR/P.

Na curva DSC do fármaco 5-ASA (Fig. 31) foi observado um pico endotérmico intenso a 288,72 °C, correspondendo ao ponto de fusão do fármaco, com entalpia de fusão de 1360 mJ. Newton e colaboradores relataram que o ponto de fusão do 5-ASA foi a 286,16°C e que não houve diferença entre o termograma do fármaco puro e deste na formulação testada (NEWTON *et al.*, 2012), de modo que o 5-ASA estava presente sem interagir com o restante da composição, ou seja, em seu estado puro.

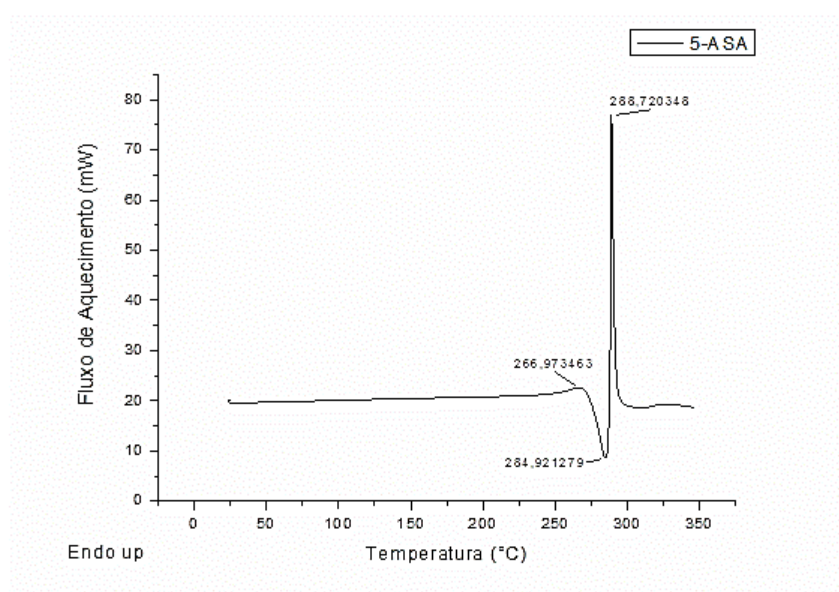


Figura 31. Curva DSC do 5-ASA puro.

Nos termogramas das micropartículas obtidas com diferentes CS (Fig. 32) foram observados três eventos endotérmicos e um evento exotérmico. O primeiro evento ocorreu na faixa de temperatura entre 57-68°C e é relacionado com a gelatinização do amido. O segundo evento, próximo à 188 °C para as micropartículas obtidas em 130 °C, 140 °C, 180 °C e 190 °C de temperatura de entrada e, em 149 °C para a amostra sintetizada à 160 °C, deve-se à evaporação de água quimicamente ligada. O deslocamento desse evento térmico para temperaturas superiores e próximas a faixa de 185-188°C indica que a formação de micropartículas bem estruturadas dificulta a difusão das moléculas de água aprisionadas devido à barreira física das paredes poliméricas. O terceiro evento endotérmico referente à fusão do fármaco 5-ASA foi deslocado para temperaturas inferiores entre 249-257 °C e apresentou-se reduzido em relação ao fármaco puro, sugerindo que apesar de ter havido uma redução de cristalinidade (também revelado pelos menores valores de entalpia, sendo que 1360 mJ corresponde ao fármaco puro), sua dispersão nas matrizes poliméricas ocorreu na forma cristalina e não molecular (EL-BARY *et al.*, 2012). O último evento observado é um pico exotérmico relacionado à despolimerização da pectina, o qual foi deslocado para temperaturas superiores entre 306 e 311 °C. Dessa forma, observa-se que o processo de secagem por *spray-dring* reduziu a cristalinidade do fármaco, mas manteve a cristalinidade da blenda AR/P.

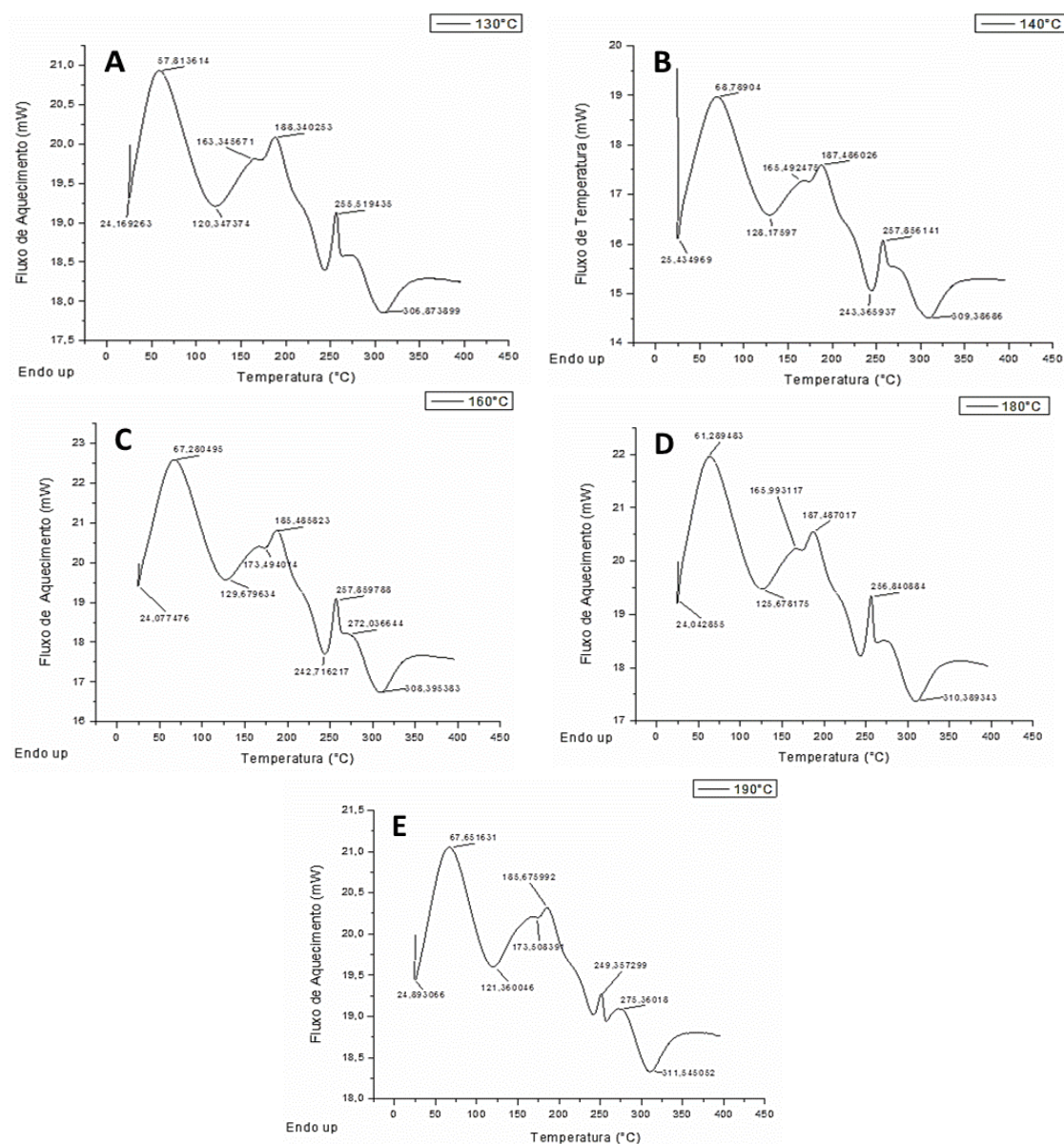


Figura 32. Curva de análise térmica das amostras da formulação F3 (AR/P/NFC+5-ASA+PROB) após processo de secagem CS6 (130°C) (A), CS7 (140°C) (B), CS9 (160°C) (C), CS11 (180°C) (D), CS12 (190°C) (E).

5.7 Ensaio de mucoadesão *in vitro*

O ensaio de mucoadesão *in vitro* foi conduzido com o objetivo de determinar a força de adesão à mucosa da formulação AR/P/NFC/5-ASA/PROB (F3), submetida às condições de secagem CS2 (135°C), CS3 (150°C) e CS4 (170°C) que, em experimentos anteriores, mostraram-se adequadas à co-encapsulação do fármaco 5-ASA e do probiótico *L. rhamnosus* GG. Foi empregado o método de mucoadesão em comprimidos de mucina, que após umidificação, resulta em camada de muco que simula a observada em modelo *in vivo*. Além das formulações citadas compostas de micropartículas de AR/P/NFC/5-

ASA/PROB foram incluídas micropartículas de AR/P/NFC e AR/P seco sem a presença dos conservantes Nipagin® e Nipazol®.

A força de mucoadesão (FMA) corresponde à força máxima de destacamento da amostra aderida à superfície do comprimido de mucina, enquanto o trabalho de mucoadesão (TM) é obtido através da curva força *versus* tempo do gráfico de mucoadesão. Entre as amostras avaliadas (Figura 33), a CS2 foi a que apresentou maior FMA ($2,17 \pm 0,45$ N) (Fig. 28 A), ou seja, a que se aderiu mais fortemente à mucina, com média estatisticamente maior ($p < 0,05$) que as demais amostras ($0,16 \pm 0,01$, $0,22 \pm 0,08$ N, $0,32 \pm 0,09$ e $0,05 \pm 0,02$ para CS3, CS4, AR/P/NFC e AR/P, respectivamente) que, por sua vez, não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

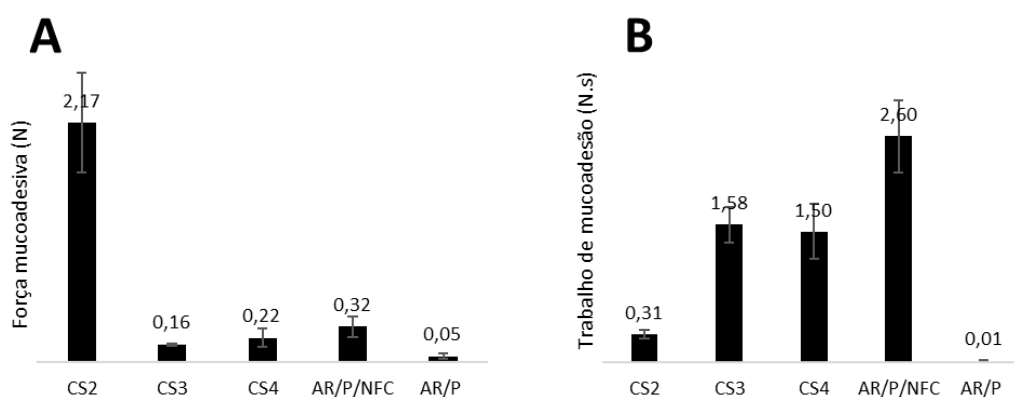


Figura 33. Força (A) e trabalho de mucoadesão (B) de amostras oriundas das condições de secagem CS2, CS3, CS4, AR/P/NFC e AR/P seco.

O trabalho de mucoadesão (TMA) foi o segundo parâmetro usado para medir o nível de aderência das amostras ao comprimido de mucina. A TMA mede a energia necessária para desprendimento das amostras aprisionadas à camada de mucina. Diferente da FMA, a TMA inclui o tempo envolvido no destacamento. Interessante observar que a amostra CS2 foi uma das que apresentaram menor TMA ($0,31 \pm 0,05$ N.s) contra $1,58 \pm 0,20$, $1,50 \pm 0,31$, $2,60 \pm 0,41$ e $0,01 \pm 0,005$ para as amostras CS3, CS4, AR/P/NFC e AR/P, respectivamente (Fig. 28 B). Tal comportamento pode estar relacionado com distintos padrões de deposição das NFC sobre a superfície das micropartículas em função das diferentes CS, gerando diferentes áreas de contato e rugosidade superficial, as quais podem influenciar a adesão entre as amostras e a mucina de maneiras complexas. O papel das NFC pode ser evidenciado ao comparar-se o TMA entre AR/P (o qual sabidamente apresenta baixa mucoadesividade) e AR/P/NFC, em que sua presença aumentou significativamente a rapidez do estabelecimento das interações com a mucina.

Como se observa, neste trabalho não houve relação entre FMA e TMA, contrário ao observado por outros autores (DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2020; MENEGUIN *et al.*, 2017). A razão para a não relação entre os dois parâmetros pode estar na natureza das interações moleculares que ocorreram entre as micropartículas geradas pelo processo de secagem e a camada de mucina, que, por sua vez, podem ter sido influenciadas pela temperatura de entrada durante o processo de secagem. As micropartículas formadas à 135°C (CS2) apresentaram maior aderência, mas exigiram menor energia para destacamento. Por outro lado, as micropartículas formadas a temperaturas mais altas (150 e 170°C), como é o caso da CS3, CS4 e AR/P/NFC, apresentaram menor aderência, mas exigiram maior energia de destacamento. Assim, pode-se concluir que as partículas geradas pela CS2 aderem mais fortemente à mucina, mas são destacadas em tempo mais curto, enquanto as partículas geradas pelas demais CSs aderem-se mais fracamente à mucina, porém requerem mais tempo para destacamento, necessitando, com isso, maior energia para remoção.

5.8 Liberação *in vitro* do 5-ASA

Os sistemas de liberação de fármacos são planejados com o objetivo de aprimorar a eficácia, segurança e qualidade de um produto que, no presente trabalho, é constituído por micropartículas. Essa melhoria pode ocorrer por meio do aumento da biodisponibilidade e do direcionamento do fármaco para o sítio de ação e também do prolongamento do efeito terapêutico (NATARAJAN *et al.*, 2014).

A liberação do fármaco, partindo-se de matrizes constituídas por polímeros hidrofílicos, ocorre através de um conjunto de acontecimentos simultâneos, como o intumescimento, a difusão e a erosão. Dessa maneira, à medida que sistemas de liberação formado por micropartículas e que apresentam polímeros hidrofílicos em sua composição entram em contato com um meio aquoso, a hidratação se dá no sentido superfície-interior. Com isso há a formação de uma camada geleificada que combate a penetração de fluídos na forma farmacêutica minimizando, como isso, a difusão das moléculas do fármaco encapsulado para o meio externo (ARIFIN *et al.*, 2006).

Por ser uma estratégia que permite prever a influência do local ou ambiente e do tempo nas taxas de liberação de fármacos, o teste de dissolução é fundamental na pesquisa e no desenvolvimento de novos sistemas de liberação. Por causa disso, esse teste é largamente usado no aprimoramento de formulações, em estudos de estabilidade, nas etapas envolvidas no registro de um novo produto, e na verificação se as correlações

observadas em ensaios *in vitro* também ocorrem em ensaios *in vivo* (DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2020). Além disso, o teste de dissolução permite detectar potenciais desvios de qualidade em etapas do processo ou no produto final (TAJIRI *et al.*, 2015).

Diversos fatores podem influenciar o perfil de dissolução de uma amostra, que podem estar relacionados ao próprio fármaco, como a sua solubilidade, tamanho da partícula, natureza química e polimorfismo e forma farmacêutica, que pode ser sólida, líquida, semissólida ou revestida. A tecnologia usada na obtenção da amostra também pode interferir consideravelmente no perfil de dissolução. Os resultados do processo de liberação são usualmente analisados por modelos matemáticos específicos. O objetivo é prever, de forma mais assertiva possível, o mecanismo pelo qual um determinado fármaco é liberado de um sistema, levando em consideração os processos físicos e químicos envolvidos (COSTA; LOBO, 2001).

No presente trabalho, foi avaliada a liberação do fármaco 5-ASA presente em três amostras de micropartículas formadas por amido retrogradado, pectina e nanofibra de celulose submetidas às condições de secagem denominadas CS2, CS3 e CS4, que foram submetidas às mesmas taxas de aspiração (80%) e de alimentação (0,10%), variando somente a temperatura de entrada no equipamento de secagem, que foi de 135°C (CS2), 150°C (CS3) e 170°C (CS4). Além disso, as micropartículas continham o probiótico *L. rhamnosus* GG que permaneceu viável após processo de secagem em testes conduzidos após 30 dias de estocagem a 4°C. Os perfis de liberação são apresentados na Figura 34.

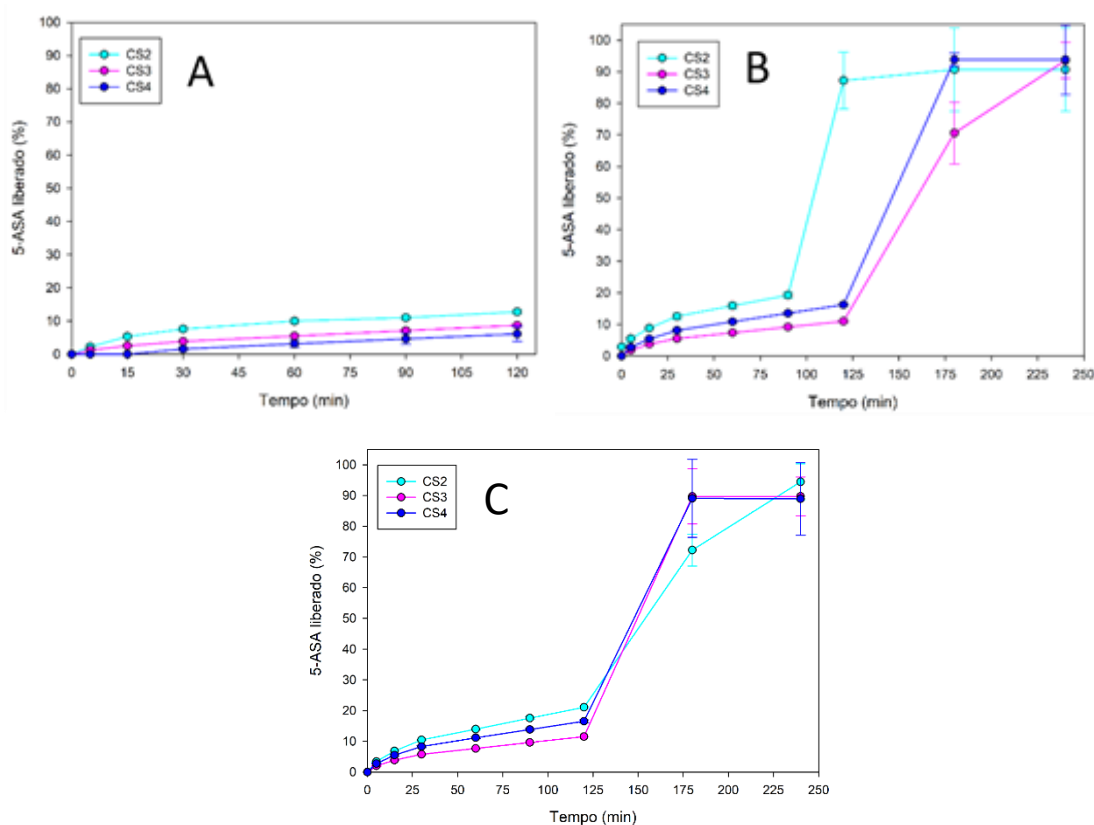


Figura 34. Perfis de liberação do fármaco 5-ASA a partir de micropartículas de AR/P/NFC/PROB/5-ASA em meio ácido (HCl 0,1N, pH 1,2) (A) no intervalo de 0 a 120 min e em meio constituído de tampão fosfato pH 7,4 (B) e pH 6,8 (C), no intervalo de 0 a 240 min.

Em meio ácido (Fig. 29 A), observou-se uma liberação lenta e gradativa do fármaco, a qual permaneceu abaixo de 15% para as três CS, embora as amostras CS3 e CS4 tenham sido as responsáveis pelas menores taxas de liberação, não havendo diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$).

Em tampão fosfato pH 7,4 (Fig. 29 B), as taxas de liberação aumentaram progressivamente atingindo valores abaixo de 20% até os 90 min para a CS2 e 120 min CS3 e CS4. A partir desse intervalo, o padrão de liberação se alterou, havendo um *burst* de liberação da CS2 aos 120 min, quando atingiu valor acima de 85%, aumentando para 90% aos 180 min, que se prolongou até 240 min. Diferentemente da CS2, as taxas de liberação da CS3 e CS4 permaneceram abaixo de 15% até 120 min. O *burst* para essas CSs foi detectado em 180 min, quando a CS3 atingiu 70% e a CS4 acima de 90% de liberação do 5-ASA, permanecendo neste nível até o min 240. A liberação da CS3, por sua vez, continuou a aumentar, atingindo valor acima de 90% em 240 min.

Em meio colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8) (Fig. 29 C), as três CSs apresentaram padrão similar até 120 min, com taxas de liberação não ultrapassando os 20%. O *burst* foi detectado em 180 min com as CS3 e CS4 atingindo um pico máximo de 90% aos 180 min, que se prolongou até 240 min. Por outro lado, o *burst* de liberação da CS2 foi ligeiramente menor que o das outras duas, atingindo 70%, mas aumentando para 95% aos 240 min.

Nesse estudo, a liberação de 5-ASA evidenciou um padrão considerado tempo e pH-dependentes, sendo baixa em todo o tempo de incubação em pH ácido e até 120 min em pHs mais alcalinos, e altas nesses últimos pHs a partir de 120 min. A dependência do pH está relacionada aos componentes da micropartícula, favorecendo o seu intumescimento e erosão com a posterior liberação por difusão do fármaco presente. Isto é, o nível de ação deve-se à natureza química de seus componentes que, neste trabalho incluiu o amido-retrogradado e pectina (AR/P) e a nanofibra de celulose (NFC). Sabe-se que, após processo de retrogradação, o AR resulta em estrutura organizada e compactada que dificulta a difusão da molécula do fármaco, e que a P forma uma camada viscosa que reduz a velocidade de difusão do mesmo (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Sobre o AR/P, a dependência do pH pode estar relacionada com seu grau de ionização, visto que a pectina é um polímero de caráter aniônico (DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2020). Em meio ácido, os grupos carboxílicos da blenda AR/P permanecem na forma protonada, mantendo as cadeias poliméricas unidas e, portanto, dificultando a penetração de líquidos e a consecutiva dissolução e difusão das moléculas do fármaco 5-ASA (DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2020). Isto explica as baixas taxas de liberação do fármaco em pH 1,2.

Com relação à NFC, após a secagem em spray-drying, elas se atraem por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos hidrofílicos na superfície da celulose, causando um colapso molecular, o qual dificulta uma possível reidratação da estrutura nos fluídos gastrointestinais. Esse comportamento favorece o prolongamento das taxas de liberação (LAVOINE *et al.*, 2014). As NFC foram responsáveis por reduzir a taxa de liberação do fármaco 5-ASA em meio gástrico e duodenal simulado e favorecer sua liberação cólon-específica (MENEGUIN *et al.*, 2021).

No presente estudo, foi observada uma ‘explosão’ ou feito *burst* de liberação do fármaco 5-ASA nos pHs 7,4, e 6,8, para as três condições de secagem, resultado da ionização de grupos carboxílicos pertencentes ao AR/P (polímeros aniônicos) presente em toda a extensão da micropartícula. A desprotonação dos grupamentos carboxílicos promove a repulsão das cadeias poliméricas e expansão ou dilatação de sua estrutura, formando um arranjo molecular mais frouxo e móvel (NAYAK *et al.*, 2014), facilitando a entrada de água no sistema (MENEGUIN *et al.*, 2014) com posterior difusão e dissolução das moléculas de fármaco.

Ainda com relação ao tempo de liberação, de acordo com Nayak *et al.*, (2014), a maior ou menor quantidade de fármaco detectado em uma amostra, já nos estágios iniciais de incubação, pode estar associado à quantidade em que este se encontra adsorvido à superfície da micropartícula (NAYAK *et al.*, 2014). A quantidade detectada será maior quanto maior for a quantidade adsorvida. Neste estudo, independentemente do pH, as taxas de liberação permaneceram baixas até 120 min, sugerindo que as micropartículas formadas após o processo de secagem, nas três diferentes condições de temperatura, não apresentaram grandes quantidades de 5-ASA aderidas às suas superfícies. Provavelmente, o 5-ASA deve estar localizado encapsulado, no cerne da matriz polimérica das micropartículas.

A baixa liberação do 5-ASA no TGI superior é um avanço, pois pode indicar redução dos efeitos colaterais atribuídos aos sistemas de liberação convencionais

(LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2018; RASMUSSEN *et al.*, 1982; SHAH *et al.*, 2020; ZHANG; MERLIN, 2018). A menor taxa de liberação no TGI superior resulta em maiores quantidades do fármaco sendo direcionado às porções seguintes do TGI, como o intestino delgado e o cólon (SARDO *et al.*, 2019; Fig. 29), locais em que, este estudo indica, haveria o *burst* de liberação.

A rapidez de liberação de um fármaco no sítio específico também contribui para a efetividade de um sistema de liberação, pois irá determinar a manutenção da concentração plasmática adequada do fármaco dentro da janela terapêutica.

O prolongamento de liberação de um fármaco se constitui em um outro fator que contribui para a maior efetividade de um sistema de liberação, pois sistemas de liberação sustentada podem permitir menor frequência de administração de um medicamento, diminuição de ocorrência de efeitos colaterais e favorecer a adesão do paciente ao tratamento (NATARAJAN *et al.*, 2014). Neste estudo, as taxas de liberação se mantiveram constantes do min 180 até o min 240. Este tempo prolongado de liberação se constitui em mais um avanço nas pesquisas em busca de sistemas mais adequados ao tratamento da RCU.

5.8.1 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* do 5-ASA

Os modelos matemáticos de Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull, primeira ordem e Korsmeyer-Peppas foram aplicados aos dados de liberação do fármaco 5-ASA em micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico *L. rhamnosus* GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), e determinados os coeficientes de correlação ajustados (r^2). Os valores dos coeficientes analisados para os diversos os modelos estão apresentados nas Tabelas de 9 a 11.

Tabela 9. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico *L. rhamnosus* GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 1,2).

Modelos de liberação		Amostras		
		CS2	CS3	CS4
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	$2,56 \times 10^{-5}$	$9,53 \times 10^{-6}$	$3,40 \times 10^{-6}$
	r^2	0,9844	0,9849	0,8202
Higuchi	<i>K</i>	1,2140	0,7454	0,4484
	r^2	0,9823	0,9864	0,8226
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	1,5552	0,4705	0,0309
	r^2	0,9856	0,9983	0,9827
	<i>n</i>	0,4422	0,6065	1,1091
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0014	0,008	0,0005
	r^2	0,7261	0,9148	0,9816
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0004	0,0003	0,0002
	r^2	0,7162	0,9118	0,9819
Weibull	<i>K</i>	10,9895	23,6400	19,8477
	r^2	0,9240	0,9320	0,9613
	<i>b</i>	11,3635	8,6244	6,2302

Tabela 10. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico *L. rhamnosus* GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 7,4).

Modelos de liberação		Amostras		
		CS2	CS3	CS4
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0006	0,0003	0,0004
	<i>r</i> ²	0,6799	0,5245	0,5519
Higuchi	<i>K</i>	5,4011	3,6614	4,2890
	<i>r</i> ²	0,7338	0,5649	0,5995
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	0,6651	-	-
	<i>r</i> ²	0,8133	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	0,9208	-	-
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0076	0,0041	0,0051
	<i>r</i> ²	0,8030	0,7050	0,7099
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0022	0,0013	0,0015
	<i>r</i> ²	0,8295	0,7381	0,7444
Weibull	<i>K</i>	0,0076	0,0183	0,0063
	<i>r</i>²	0,9862	0,9928	0,9889
	<i>b</i>	82,4467	90,3734	89,3057

Tabela 11. Coeficiente de correlação do 5-ASA liberado, a partir de micropartículas contendo amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, fármaco 5-ASA e probiótico *L. rhamnosus* GG, submetidas a três condições de secagem em sua síntese (CS2, CS3 e CS4), obtido através de diferentes modelos matemáticos para o estágio conduzido em meio ácido (pH 6,8).

Modelos de liberação		Amostras		
		CS2	CS3	CS4
Baker-Lonsdale	<i>K</i>	0,0003	0,0003	0,0003
	<i>r</i> ²	0,6299	0,5154	0,5672
Higuchi	<i>K</i>	4,0941	3,9489	4,1153
	<i>r</i> ²	0,6780	0,5574	0,6123
Korsmeyer-Peppas	<i>K</i>	-	-	-
	<i>r</i> ²	0,0000	0,0000	0,0000
	<i>n</i>	-	-	-
Primeira ordem	<i>K</i>	0,0048	0,0046	0,0048
	<i>r</i> ²	0,7922	0,6828	0,7284
Hixson- Crowell	<i>K</i>	0,0014	0,0014	0,0015
	<i>r</i> ²	0,8258	0,7152	0,7608
Weibull	<i>K</i>	0,0190	0,0076	0,0065
	<i>r</i>²	0,9819	0,9930	0,9876
	<i>b</i>	91,7131	86,1634	84,074

Os modelos que melhor se correlacionaram com os dados de liberação dos sistemas estudados neste trabalho foram o de Korsmeyer-Peppas e Weibull, tendo-se em vista os valores de coeficiente de correlação (r^2). Dessa forma, foram os modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas e Weibull que governaram os dados de liberação do fármaco.

O modelo Weibull relaciona exponencialmente a fração do fármaco que é liberada (Mt/M_∞) em função do tempo (t), e deve ser aplicado aos dados dos primeiros 63,2% de liberação do fármaco (COSTA; LOBO, 2001; MANADAS *et al.*, 2002; MENEGUIN, 2016), de acordo com a equação $\frac{Mt}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b)$, onde a é o parâmetro de escala e b é o parâmetro de forma. Conforme o parâmetro de forma (b), as curvas de liberação podem ser classificadas como sigmoidal (quando $b > 1$), exponencial (quando $b = 1$) e parábola (quando $b < 1$) (ARIFIN *et al.*, 2006; COSTA; LOBO, 2001). Além disso, o valor de b também indica o mecanismo de transporte do fármaco por meio da matriz polimérica, sendo que para valores de $b \leq 0,75$ a liberação ocorre através de difusão Fickiana. Quando $0,75 < b < 1$ existe a difusão Fickiana associada ao Caso-II, e para $b > 1$ há um mecanismo de liberação complexo (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas se baseia na Lei das Potências e associa, de forma exponencial, a liberação do fármaco com o tempo, segundo a equação $\frac{Mt}{M_\infty} = Kt^n$. Nesta equação, K é uma constante cinética e n é o expoente de liberação (DOS SANTOS *et al.*, 2021). De acordo com o expoente n para as formas esféricas, o mecanismo de liberação pode ser categorizado como (i) de difusão Fickiana (caso-I) (quando $n = 0,43$), (ii) transporte não Fickiano (anômalo) (quando $0,43 < n < 0,85$), (iii) transporte caso-II ($n = 0,85$), e (iv) transporte super caso-II ($n > 0,85$).

Em meio ácido (pH 1,2) (Tabela 9), o modelo que melhor se correlacionou com os dados de liberação do 5-ASA das micropartículas foi o de Korsmeyer-Peppas, visto que os valores de (r^2) foram os mais altos, indicando que foi este modelo que governou a liberação do fármaco. A amostra do tratamento CS2 foi a que apresentou maior constante cinética de liberação ($K = 1,5552$) e CS4 obteve a menor ($K = 0,0309$), indicando que, em relação à CS3 e a CS4, para CS2 a velocidade de liberação do 5-ASA neste meio foi mais rápida, o que confere com as maiores porcentagens de 5-ASA liberado até os 120 min de ensaio, conforme ilustrado na Fig. 29 A do item 5.9. Além disso, os valores de n foram de 0,4422 e 0,6065 para, respectivamente, CS2 e CS3, o que indica que o

mecanismo de liberação é do tipo transporte não Fickiano (anômalo), enquanto que para CS4, com $n = 1,1091$ ($n > 0,85$) o mecanismo de liberação do fármaco é do tipo transporte super caso-II (MENEGUIN, 2016).

Tanto no meio intestinal simulado (pH 7,4) (Tabela 10), como no meio colônico simulado (pH 6,8) (Tabela 11), o modelo matemático que melhor correlacionou com os dados de liberação do fármaco 5-ASA das micropartículas foi o de Weibull. Em ambos os pHs, para CS2, CS3 e CS4, como os valores de b foram superiores a 1, conclui-se que a liberação foi controlada por um mecanismo complexo. A complexidade desse mecanismo pode ser explicada pela ocorrência simultânea de eventos como a difusão, intumescimento e/ou erosão do polímero, que pode ter ocorrida durante o processo de liberação do fármaco (CURY *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA CARDOSO *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2021; MENEGUIN *et al.*, 2018; SIEPMANN; PEPPAS, 2000). Esse mecanismo se reflete na considerável absorção de líquidos que as micropartículas apresentaram em meios com pH mais elevados, os quais culminam no relaxamento das cadeias poliméricas e na difusão das moléculas de fármaco (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Essa série de resultados obtidos indica que diferentes fatores podem ter interferido no controle de liberação do fármaco 5-ASA. Esses fatores são: i) a formulação usada na composição da micropartícula que, neste estudo, foi constituída por amido retrogradado, pectina, nanofibras de celulose, além da presença do probiótico *L. rhamnosus* GG; (ii) a própria estrutura polimérica presente no sistema de liberação; (iii) as diferentes condições de secagem em que o probiótico se manteve viável, com temperaturas de entrada no equipamento spray dryer de 135°C para a CS2, 150°C para a CS3 e 170°C para a CS4; (iv) a temperatura de armazenamento (4°C) das micropartículas secas; (v) o pH do meio de dissolução; e (vi) o tempo de ensaio. De maneira geral, o pH 6,8 foi a condição que levou ao melhor controle das taxas de liberação do 5-ASA.

6. CONCLUSÕES

Essa investigação teve como objetivo principal avaliar condições de secagem por *spray dryer* que pudessem permitir a co-encapsulação eficiente do fármaco 5-ASA (mesalazina) e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, com alto rendimento de processo e manutenção da viabilidade probiótica. No entanto, as conclusões apontam para uma série de desafios e considerações críticas.

Inicialmente, o estudo explorou diferentes protocolos de secagem, variando a temperatura de entrada, a taxa de aspiração e a taxa de alimentação, além das formulações contendo apenas o fármaco, apenas o probiótico ou ambos. Os resultados mostraram que as temperaturas de entrada mais elevadas, em torno de 210°C, foram letais para os probióticos, resultando na ausência de crescimento bacteriano após o processo de secagem. Isso sugere que as condições utilizadas no *spray dryer*, mesmo que resultem em partículas secas, podem interferir negativamente a viabilidade do probiótico.

Para superar esse desafio, foram testados diferentes protocolos, ajustando as temperaturas de entrada, taxa de aspiração e taxa de alimentação. Descobriu-se que ao reduzir a temperatura de entrada para valores entre 135°C e 170°C, associados a uma taxa de aspiração mais alta, a viabilidade probiótica foi significativamente melhorada. Além disso, modificação da formulação excluindo-se conservantes antimicrobianos também contribuiu para aumentar a viabilidade do probiótico. Após os ajustes mencionados nas condições de secagem, a viabilidade do probiótico permaneceu em níveis similares aos observados logo após o processo de secagem, mesmo após 30 dias de estocagem a 4°C.

No que diz respeito à eficiência de encapsulação (EE) do fármaco 5-ASA, observou-se uma variação considerável entre as diferentes condições de secagem testadas, com valores médios variando de 22,5% a 81,5%. As condições mais eficientes em termos de EE foram aquelas que resultaram em nula viabilidade probiótica, o que sugere uma possível competição entre o fármaco e o probiótico pela ocupação do espaço dentro das micropartículas. Como consequência, isso sugere que a viabilidade probiótica ou a eficiência de encapsulação do fármaco podem ser considerados atributos críticos, visto que, neste estudo, uma variável interferiu na outra.

Em relação à capacidade de mucoadesão e liberação do fármaco em ambientes que mimetizam as características do TGI superior e inferior, as micropartículas geradas para as três condições de secagem apresentaram valores bastantes promissores, tornando-as fortes candidatas a futuras investigações. As possíveis consequências do uso das

micropartículas geradas com este trabalho no intestino de um paciente com retocolite ulcerativa não podem ser avaliadas com exatidão. Os resultados sugerem, no entanto, que as micropartículas que requerem maior energia permanecerão por mais tempo no alvo terapêutico (cólon), liberando fármaco e probiótico, em local que, em decorrência da enfermidade, é acometido por intenso trânsito colônico.

Em resumo, o estudo destacou a complexidade e os desafios envolvidos na co-encapsulação de um fármaco e um probiótico usando o processo de secagem por *spray dryer*. Os resultados obtidos indicam que a escolha das condições de secagem, a formulação da mistura e a viabilidade do probiótico são aspectos interligados e críticos para o sucesso do processo. Tais resultados podem contribuir para o desenvolvimento de um novo medicamento para colite ulcerativa que combine os benefícios do fármaco e do probiótico de maneira eficaz.

7. REFERÊNCIAS

- ABDU-ALLAH, H.H.; ABDEL-MOTY, S.G.; EL-AWADY, R.; EL SHORBAGI, A.N.A.; ABDEL-ALIM, A.A.M. 5-Aminosalicylic acid (5-ASA): a unique anti-inflammatory salicylate. **Med. Chem.** (Los. Angeles) v. 6, p. 306–315, 2016.
- ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inflammatory bowel disease. **T New Engl J Med**, v. 361, p. 2066-2078, 2009.
- AGOSTINI, A.; FILIPPINI, N.; CEVOLANI, D.; AGATI, R.; LEONI, C.; TAMBASCO, R.; CALABRESE, C.; RIZZELLO, F.; GIONCHETTI, P.; ERCOLANI, M.; LEONARDI, M.; CAMPIERI, M. Brain functional changes in patients with ulcerative colitis: A functional magnetic resonance imaging study on emotional processing. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 8, p. 1769–1777, 2011.
- AHNFELT-RONNE, I.; NIELSEN, O.H. The antiinflammatory moiety of sulfasalazine, 5aminosalicylic acid, is a radical scavenger. **Ag Act** v. 21, p. 191-4, 1987.
- ALQAHTANI, M.S.; KAZI, M.; ALSENAIDY, M.A.; AHMAD, M.Z. Advances in Oral Drug Delivery. **Front. Pharmacol.** v. 12, 618411, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.618411.
- ANAL, A. K.; SINGH, K. Recents advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Sci & Technol**, v. 18, p. 240-251, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224407000350>. Acesso em 24 de outubro de 2023.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, p. 205–17, 2015.
- ANDREO-FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, v.9, p.18-21, 1999.
- ARAKI, M.; SHINZAKI, S.; YAMADA, T.; ARIMITSU, S.; KOMORI, M.; ARIMITSU, S.; KOMORI, M.; SHIBUKAWA, N.; MUKAI, A.; NAKAJIMA, S.; KINOSHITA, K.; KITAMURA, S.; MURAYAMA, Y.; OGAWA, H.; YASUNAGA, Y.; OSHITA, M.; FUKUI, H.; MASUDA, E.; TSUJII, M.; KAWAI, S.; HIYAMA, S.; INOUE, T.; TANIMUKAI, H.; IJIMA, H.; TAKEHARA, T. (2020). Psychologic stress and disease activity in patients with inflammatory bowel disease: A multicenter cross-sectional study. **PloS One**, v. 15, n. 5, e0233365, 2020.
- ARÉVALO-PÉREZ, R.; MADERUELO, C.; LANA O, J.M. Recent advances in colon drug delivery systems. **J Contr Rel**, v. 327, p. 703–724, 2020.
- ARIFIN, D.Y.; LEE, L, Y.; WANG, C.H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, p. 1274–1325, 2006.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Sci and Technol**, v. 81, p. 160–169, ago. 2017.
- BANTEL, H.; BERG, C.; VIETH, M.; STOLTE, M.; KRUIS, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappa B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.** V. 95, p. 3452–3457, 2000.

BARBOSA, J.P.C. **Avaliação da anemia dos pacientes com doença inflamatória intestinal**. Trabalho de Conclusão de Residência Médica (Residência Médica em Gastroenterologia) – Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, 2018.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear-factor kappa β : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.** v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BAUMGART, D.C.; VIERZIGER, K.; STURM, A.; WIEDENMANN, B.; DIGNASS, A.U. Mesalamine promotes intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta independent mechanism. **Scandin J of Gastroenterol**, v. 40, p. 958–964, 2005.

BAUMGART, D.; SANDBORN, W. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **The Lancet**. v. 369, n. 9573, p. 1641-1657, 2007.

BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Crohn's disease. **Lancet**. v. 380, p. 1590-1605, 2012.

BECKER, J.M. Surgical management of ulcerative colitis. In: MACDERMOTT, RP.; STENSON, WF. (ed.) **Inflamm bowel dis**. New York: Elsevier; 1992. p. 599.

BERNAL, I.; DOMENECH, E.; GARCIA-PLANELLA, E.; MARÍN, L.; MAÑOSA, M.; NAVARRO, M.; CABRÉ, E.; GASSULL, M.A. Medication-taking behaviour in a cohort of patients with inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci**. v. 51, p. 2165–2169, 2006.

BERNSTEIN, C.N.; SINGH, S.; GRAFF, L.A.; WALKER, J.R.; MILLER, N.; CHEANG, M. A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. **Am J Gastroenterol**, v. 105, n. 9, p. 1994–2002, 2010.

BERNSTEIN, C.N.; ELIAKIM, A.; FEDAIL, S.; FRIED, M.; GEARRY, R.; GOH, K.L.; HAMID, S.; KHAN, A.G.; KHALIF, I.; NG, S.C.; OUYANG, Q.; REY, J-F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; WATERMEYER, G.; LEMAIR, A. World Gastroenterology Organization Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease: Update August 2015. **J Clin Gastroenterol** v. 50, n. 10, p. 803-818, November/December 2016. DOI: 10.1097/MCG.0000000000000660.

BHATT, J.; PATIL, S.; JOSHI, A.; ABRAHAM, P.; DESAI, D. Self-reported treatment adherence in inflammatory bowel disease in Indian patients. **Ind J. Gastroenterol**. 28, p. 143–6, 2009.

BI, H.; XU, Y.; FAN, F.; SUN, X. Effect of drying methods on *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules prepared using the complex coacervation method. **J F Sci**, v. 87, n. 3, p. 1282-1291, 2022.

BOIRIVANT, M.; COSSU, A. Inflammatory bowel disease. **Or Dis**. v. 18, n. 1, p. 115, 2012.

BRENTNALL, T.A. Molecular underpinnings of cancer in ulcerative colitis. **Curr Opin Gastroenterol**. v. 19, v. 64–68, 2003.

BRESSENOT, A.; SALLERON, J.; BASTIEN, C.; DANESE, S.; BOULAGNON-ROMBI, C.; PEYRIN-BIROULET, L. Comparing histological activity indexes in UC. **Gut** v. 64, p. 1412–1418, 2015. DOI: 10.1136/gutjnl2014-307477.

BRITO, R.C.V.; PERES, C.L.; SILVEIRA, K.A.F.; ARRUDA, E.L.; ALMEIDA JR, M.P. Doenças inflamatórias intestinais no Brasil: perfil das internações, entre os anos de 2009 a 2019. **Rev. Educ. Saúde**; v. 8, n. 1, p. 127-135, 2020.

BROECKX, G.; VANDENHEUVEL, D.; HENKENS, T.; KIEKENS, S.; VAN DEN BROEK, M.F.L.; LEBEER, S.; KIEKENS, F. Enhancing the viability of *Lactobacillus*

- rhamnosus GG after spray drying and during storage, **Int J Pharm**, v. 534, n. 1–2, p. 35–41, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.075>.
- BRØNDSTED, H.; ANDERSEN, C.; HOVGAARD, L. Crosslinked dextran - a new capsule material for colon targeting of drugs. **J Contr Rel**, v. 53, p. 7–13, 1998.
- BUCCI, C.; ZINGONE, F.; TAMMARO, S.; IOVINO, P.; SANTONICOLA, A.; CIACCI, C. Factors predicting the adherence to the therapy of Italian IBD patients. **Gastroenterol Res Pract**. v. 2017, 6719345, 2017.
- BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **J Food Engin**, v.104, n.4, p.467–483, 2011.
- BURNS, P.; ALARD, J.; HRDÝ, J.; BOUTILLIER, D.; PÁEZ, R.; REINHEIMER, J.; POT, B.; VINDEROLA, G.; GRANGETTE, C. Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. **Sci. Rep.** v. 7, 43211, 2017. DOI: 10.1038/srep432112017.
- BUTEL, M.J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médec et Mal Infect**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 2014.
- BUTTÓ, L.F.; SCHAUBECK, M.; HALLER, D. Mechanisms of Microbe–Host Interaction in Crohn’s Disease: Dysbiosis vs. Pathobiont Selection. **Front. Immunol**, v. 6, 555, 2015.
- CADER, M.Z.; KASER, A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. **Gut**, v. 62, p. 1653–1664, 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303955.
- CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters, **J Pharm Sci**, v. 99, n. 2, p. 575–586, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.21886>.
- CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R.C. (2012). Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Int J Pharma**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.
- CARBINATTO, F.M.; CASTRO, A.D.; EVANGESLITA, R.C.; CURY, B.S.F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **As J Pharm Sci**, v. 9, p. 27–34, 2014.
- CARDOZO, W.S.; SOBRADO, C.W. **D Inflam Intest**. 2. ed. Barueri-SP: Editora Manole, 2015. 772p.
- CARVALHO, L.C; DA SILVA, E.S.; ROMA, A.L.M.; LAURIANO, J.E.G.; DOS REIS, S.C., SILVA COSTA, F.V., BEZERRA, R.O.C., ROCHA, M.F.Q., MARIANO FILHO, V.Q.; MACHADO, L.C.S. Doenças inflamatórias intestinais: uma abordagem geral. **Rev Eletr Acervo Médico**, v.2, p. e9650, 2022. DOI <https://doi.org/10.25248/reamed.e9650.2022>.
- CELIBERTO, L.S.; BEDANI, R.; DEJANI, N.N.; IVO DE MEDEIROS, A.; SAMPAIO ZUANON, J.A.; SPOLIDORIO, L.C.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B.A.; GALVÃO, F.C.; VALENTINI, S.R.; FONT DE VALDEZ, G.; ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U. (2017) Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. **PLoS ONE** v.12, n. 4, e0175935, 2017.

- CERVENÝ, P.; BORTLÍK, M.; KUBEN, A.; VLCEK, J.; LAKATOS, P.L.; LUKA'S, M. Nonadherence in inflammatory bowel disease: results of factor analysis. **Inflamm Bowel Dis**. v. 13, p. 1244–1249, 2007.
- CHAMPAGNE, C. P. R.; PAUL ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **Int J Food Microbiol**, v. 149, p. 185–193, 2011. Available from: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro>.
- CHEN, X.; YANG, G.; SONG, J-H.; XU, H.; LI, D.; GOLDSMITH, J. *et al.* (2013). Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. **PLoS One**. v. 8, n.5, e64227, 2013.
- CHIDLOW Jr, J.H.; SHUKLA, D.; GRISHAM, M.B.; KEVIL, C.G. Pathogenic Angiogenesis in IBD and Experimental Colitis: New Ideas and Therapeutic Avenues. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** Jul, v. 293, p. G5-G18, 2007.
- CHUNG, H.J.; LIM, H.S.; LIM, S.T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **J Cer Sci**, v. 43, p. 353–359, 2006.
- COENEN, S.; WEYTS, E.; BALLEET, V.; NOMAN, M.; VAN ASSCHE, G.; VERMEIRE, S.; VAN EMELEN, J.; FERRANTE, M. Identifying predictors of low adherence in patients with inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. v. 28, p. 503–507, 2016.
- COLLNOT, E.-M.; ALI, H.; LEHR, C.-M. Nano- and Microparticulate Drug Carriers for Targeting of the Inflamed Intestinal Mucosa. **J. Control. Release** v.161, p. 235–246, 2012.
- COMINELLI, F.; PIZARRO, T. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. **Alim Pharmacol & Therap**. v. 10, Sup.2, p. 49-53, 1996.
- CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. 2004. The Society for Applied Microbiology, **J Appl Microbiol**, v. 96, p. 1024–1039, 2004.
- CORREA-OLIVEIRA, R.; FACHI, J.L.; VIEIRA, A.; SATO, F.T.; VINOLO, M.A.R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clin Transl Immunology**. v. 5, n. 4, e73, 2016.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profile. **European J of Pharma Sci**, v.13, p.123–133, 2001.
- COSTELLO, S.P.; SOO, W.; BRYANT, R.V.; JAIRATH, V.; HART, A.L.; ANDREWS, J.M. Systematic Review with Meta-Analysis: Faecal Microbiota Transplantation for the Induction of Remission for Active Ulcerative Colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.** 2017, v. 46, p. 213-224, 2017.
- CROHN, B.B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G.D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. **J. Am. Med. Assoc.** v. 99, n. 16, p. 1323-9, 1932.
- COTTONE, M.; RENNA, S.; MODESTO, I.; ORLANDO, A. Is 5-ASA Still the Treatment of Choice for Ulcerative Colitis? **Curr. Drug Targets** v.12, 1396–1405, 2011.
- CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T; DE SOUZA, A.W.S.; DA SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

- CURY, B.S.F.; CASTRO, A.D.; KLEIN, S.I.; EVANGELISTA, R.C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **Int J Pharma**, v. 371, p. 8-15, 2009.
- DAEMEN, A. L. H.; VAN DER STEGE, H. J. The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2. The effect of the drying conditions. **Neth. Milk Dairy J.** v.36, p. 211-229, 1982.
- DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, p. 394–400, 2004.
- DANESE, S. Negative regulators of angiogenesis in inflammatory bowel disease: thrombospondin in the spotlight. **Pathobiology**, v. 75, v. 22–24, 2008.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.** v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- DE MELO PEREIRA, G.V.; DE OLIVEIRA COELHO, B.; MAGALHAES JUNIOR, A.I.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C.R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnol Adv**, v. 36, p. 2060-2076, 2018.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, V.M.; EVANGELISTA, R.C.; DAFLON GREMIÃO, M.P.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B. 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. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 55, p. 101445, 2020.
- DE VOS, W.M.; DE VOS, E.A. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. **Nut Rev** v. 70, Suppl 1, p. S45–56, 2012.
- DELVES, P.J.; BURTON, D.R; MARTIN, S.J; ROITT, I.M. **Roitt, fundamentos de imunologia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- DESREUMAUX, P.; GHOSH, S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. p. 24, 2–9, 2006.
- DI MARIO, F.; COMPARATO, G.; FANIGLIULO, L.; ARAGONA, G.; CAVALLARO, L.G.; CAVESTRO, G.M.; FRANZE, A. Use of mesalazine in diverticular disease. **J. Clin. Gastroenterol.** v. 40, p. 155–159, 2006.
- DIMANTOV, A.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Surface characterization and dissolution properties of high amylose corn starch–pectin coatings. **Food Hydrocol**, v. 18, p. 29–37, 2004.
- D'INCÀ, R.; BERTOMORO, P.; MAZZOCCO, K.; VETTORATO, M.G.; RUMIATI, R.; STURNIOLO, G.C. Risk factors for non-adherence to medication in inflammatory bowel disease patients. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 27, p. 166–72, 2008.
- DONA, A.C.; PAGES, G.; GILBERT, R.G.; KUCHEL, P.W. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterize oligosaccharide or glucose release. **Carbohydr Polym**, v. 80, p. 599-617, 2010.
- DOS SANTOS, A. M.; CARVALHO, S. G.; MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. **J Control Rel** v. 334, p. 353–366, 2021.

DOS SANTOS, A.M.; MENEGUIN, A.B.; AKHTER, D.T.; FLETCHER, N.; HOUSTON, Z.H.; BELL, C.; THURECHT, K.J.; GREMIÃO, M.P.D. Understanding the role of colon-specific microparticles based on retrograded starch/pectin in the delivery of chitosan nanoparticles along the gastrointestinal tract. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 158, p. 371–378, 2021.

DU, L.; HA, C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis, **Gastroent Clin N America**, v. 49, n. 4, p. 643-654, 2020.

DVORNIKOVA, K.A.; BYSTROVA, E.Y.; CHURILOV, L.P.; LERNER, A. Pathogenesis of the inflammatory bowel disease in context of SARS-COV-2 infection. **Molec Biol Rep.** v. 48, p. 5745–5758, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06565-w>.

EL-BARY, A.A.; ABOELWAGA, A.A.; AL SHARABI, I.M. Influence of Some Formulation Variables on the Optimization of pH-dependent, Colon-targeted, Sustained-release Mesalamine Microspheres. **AAPS PharmSciTech** v. 13, p. 75–84, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9721-z>.

ELLIS, H. Anatomy of the caecum, appendix and colon. **Surgery**, v. 29, p. 1-4, 2011.

ENGLYST, H.N.; KINGMAN, S.M.; HUDSON, G.J.; CUMMINGS, J.H. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. **British J Nutrition**, v. 75, p. 749–755, 1996.

FERREIRA, I.B.L.; de SOUZA, M.C.T.; de LIMA, R.K.S. Inflammatory bowel disease, social impacts and quality of life: a literature review doença inflamatória intestinal, impactos sociais e qualidade de vida: uma revisão da literatura. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**. João Pessoa-PB. v. 19, n.3, p. 204-210, 2021.

FEUERSTEIN, J.D.; CHEIFETZ, A.S. Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management. **Mayo Clin Proc.** v. 89, n. 11, p. 1553-63, 2014.

FLYNN, S.; EISENSTEIN S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. **Surg Clin N America**. v. 99, n. 6, p. 1051-1062, 2019.

FRAEYE, Y.; COLLE, I.; VANDEVENNE, E.; DUVETTER, T.; VAN BUGGENHOUT, S.; MOLDENAERS, P.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innov Food Sci and Emerg Technol**, v. 11, p. 401-409, 2010.

FREEMAN, H.J. Medical management of ulcerative colitis with a specific focus on 5-aminosalicylates. **Clin. Med. Insights Gastroenterol.** v. 5, p. 77–83.2012.

FRÓES, R.S.B. Tratamento convencional na doença inflamatória intestinal. **Rev Hosp Univ Pedro Ernest**, v. 11, n. 4, p. 1-9, 2012.

FUMERY, M.; SINGH, S.; DULAI, P.S.; GOWER-ROUSSEAU, C.; PEYRIN-BIROULET, L.; SANDBORN, W.J. Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-Based Cohorts: A Systematic Review. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.** v. 16, n. 3, p. 343–356.e3. 2018. DOI:10.1016/j.cgh.2017.06.016.

GARDINER, G.; O’SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.; FITZGERALD, G.; COLLINS, J.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray-drying. **App Environ Microbiol.** v. 66, n. 6, p. 2605-2612, 2000.

- GASPARINI, R.G. **Incidência e prevalência de doenças inflamatórias intestinais no Estado de São Paulo e no Brasil**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018.
- GERHARD, R.; LUC, B.; MICHAEL, S. New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. **Swiss Medical Weekly**. v. 148, p. 1112, 2018.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Res. Intl.** 40, 1107-1121, 2007.
- GHASEMIAN, A.; ESLAMI, M.; SHAFIEI, M.; NAJAFIPOUR, S.; RAJABI, A. Probiotics and Their Increasing Importance in Human Health and Infection Control. **Rev. Med. Microbiol.** v. 29, p. 153–158, 2018.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **J Nutrition**, v. 125, p. 1401–1412, 1995.
- GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; HABAL, F.; MORSELLI, C.; AMADINI, C.; ROMAGNOLI, R.; CAMPIERI, M. Standard treatment of ulcerative colitis. **Dig. Dis.** v. 21, p.157–167, 2003.
- GOEBELL, H.; KLOTZ, U.; NEHLSSEN, B.; LAYER, P. Oroileal transit of slow release 5-aminosalicylic acid. **Gut** v. 34, p. 669-675, 1993.
- GOMES, J.P.; WATAD, A.; SHOENFELD, Y. Nicotine and autoimmunity: The lotus' flower in tobacco. **Pharmacol Res** v. 128, p.101–109, 2018.
- GOLDSTEIN, E.J.C.; TYRRELL, K.L.; CITRON, D.M. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. **Clin Infect Dis**, v. 60, p.S98–S107, 2015. DOI: //doi.org/10.1093/cid/civ072.
- GOYANES, A.; HATTON, G.B.; MERCHANT, H.A.; BASIT, A.W. Gastrointestinal release behaviour of modified-release drug products: dynamic dissolution testing of mesalazine formulations. **Int J Pharma**, v. 484, p. 103–108, 2015.
- GUARINO, M.; ALTOMARE, A.; EMERENZIANI, S.; DI ROSA, C.; RIBOLSI, M.; BALESTRIERI, P.; IOVINO, P.; ROCCHI, G.; CICALA, M. Mechanisms of Action of Probiotics and Their Effects on Gastro-Intestinal Disorders in Adults. **Nutrients** v. 12, 1037, 2020.
- GUEDES, A.L.V.; LORENTZ, A.L.; RIOS, L.F.A.R.; FREITAS, B.C.; DIAS, A.G.N.; UHLEIN, A.L.E.; VIEIRA NETO, F.O.; JESUS, J.F.S.; TORRES, T.S.N.; ROCHA, R.; ANDRADE, V.D.; SANTANA, G.O. Hospitalizations and inhospital mortality for inflammatory bowel disease in Brazil. **World J Gastrointest Pharmacol Ther** v. 13, n.1, p. 1-10, 2022.
- HARALAMPU, S.G. Resistant starch—A review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydr. Polym.** v. 41, p. 285–292, 2000.
- HARTWIG, O.; BOUSHEHRI, M.A.S.; SHALABY, K.S.; LORETZ, B.; LAMPRECHT, A.; LEHR, C-M. Drug delivery to the inflamed intestinal mucosa – targeting technologies and human cell culture models for better therapies of IBD. **Adv Drug Deliv Rev** v.175, 113828, 2021.

- HENS, B.; CORSETTI, M.; SPILLER, R.; MARCIANI, L.; VANUYTSEL, T.; TACK, J.; TALATTOF, A.; AMIDON, G.L.; KOZIOLEK, M.; WEITSCHIES, W.; WILSON, C.G.; BENNINK, R.J.; BROUWERS, J.; AUGUSTIJNS, P. Exploring gastrointestinal variables affecting drug and formulation behavior: methodologies, challenges and opportunities. **Int. J. Pharm.**, v. 519, p. 79–97, 2017.
- HO, G-T.; LEES, C.; SATSANGI, J. Ulcerative colitis. **Curr Treat Options Gastroenterol.** v. 39, n. 4, p. 224-8, 2015.
- HOSSEINI, S.F.; ANSARI, B.; GHARSALLAOUI, A. Polyelectrolytes-stabilized liposomes for efficient encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* and improvement of its survivability under adverse conditions, **Food Chemistry**, v. 372, 2022. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131358.
- HTOON, A.K.; UTHAYAKUMARAN, S.; PIYASIRI, U.; APPELQVIST, A.M.; LÓPEZ-RUBIO, A.; GILBERT, E.P.; MULDER, R.J. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch. **Food Chemistry**, v. 120, p. 140-149, 2010.
- HUA, S.; MARKS, E.; SCHNEIDER, J.J.; KEELY, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue, **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.** v.11, p. 1117–1132, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.018>.
- HUA, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. **Front. Pharmacol.** v. 11, p. 524, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00524.
- HUANG, S.; VIGNOLLES, M-L.; CHEN, X.D.; LE LOIR, Y.; JAN, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Spray Drying of Probiotics and Other Food-grade Bacteria: A Review. **Trends in food sci & technol**, v. 63, p. 1-17, 2017.
- HUANG S.; MÉJEAN S.; RABAH H.; DOLIVET, A.; LOIR, Y.L.; CHEN, X.D.; JAN G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. **J Food Engin**, v. 196, p. 11-17, 2017.
- HUQ, T.; FRASCHINI, C.; KHAN, A.; RIEDL, B.; BOUCHARD, J.; LACROIX, M. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. **Carbohydr Polym**, v. 168, p. 61–69, jul. 2017.
- ITOH, K.; HIRAYAMA, T.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R.; ATTWOOD, D. In situ gelling pectin formulations for oral drug delivery at high gastric pH. **Int J Pharm**, v.335, p. 90–96, 2007.
- JACKSON, C.A.; CLATWORTHY, J.; ROBINSON, A.; HORNE, R. Factors associated with non-adherence to oral medication for inflammatory bowel disease: a systematic review. **Am. J. Gastroenterol.** v. 105, p. 525–39, 2010.
- JAKUBCZYK, D.; LESZCZYŃSKA, K. The Effectiveness of Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD)-A Critical Review, **Nutrients**. v. 12, n. 7, 1973, 2020. DOI: 10.3390/nu12071973.
- JEANTET, R.; DUCEPT, F.; DOLIVET, A.; MÉJEAN, S.; SCHUCK, P. Residence time distribution: a tool to improve spray-drying control. **Dairy Sci and Technol, Rennes**, v.88, p.31–43, 2008.

- JOSHI, R.; KUMAR, S.; UNNIKRISHNAN, M.; MUKHERJEE, T. Free radical scavenging reactions of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine: mechanistic aspects and antioxidant activity. **Free Radic. Res.** v. 39, p. 1163–1172, 2005.
- KAISER, G.C.; YAN, F.; POLK, D.B. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappa B activation in mouse colonocytes. **Gastroenterology** v. 116, p. 602-9, 1999.
- KANAZAWA, S.; TSUNODA, T.; ONUMA, E.; MAJIMA, T.; KAGIYAMA, M.; KIKUCHI, K. (2001) VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **Am J Gastroenterol** v. 96, p. 822–828, 2001.
- KANE, S.V.; COHEN, R.D.; AIKENS, J.E.; HANAUER, S.B. Prevalence of nonadherence with maintenance mesalamine in quiescent ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol.** v. 96, p. 2929–2933, 2001.
- KANE, S.; HUO, D.; AIKENS, J.; HANAUER, S. Medication nonadherence and the outcomes of patients with quiescent ulcerative colitis. **Am J Med.** v. 114, p. 39–43, 2003.
- KAPLAN, G.G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* v. 12, p. 720–727, 2015.
- KAPLAN, G.G.; WINDSOR, J.W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** v. 18, p. 56–66, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00360-x>.
- KAPSORITAKIS, A.; SFIRIDAKI, A.; MALTEZOS, E.; SIMOPOULOS, K.; GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E.; KOUKOURAKIS, M.I. Vascular Endothelial Growth Factor in Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Colorectal Dis.** v.18, p. 418–422, 2003.
- KATTA, S.; GAUVIN, W. Basic concepts of spray dryer design. **AICHE J.** v. 22, n.4, p. 713–724, 1976.
- KAUFMAN, J.; GRIFFITHS, T.A.; SURETTE, M.G.; NESS, S.; RIOUX, K.P. Effects of Mesalamine (5-5-Aminosalicylic Acid) on Bacterial Gene Expression. **Inflamm Bowel Dis** v. 15, n. 7, p.985–996, 2009.
- KAWAI, K.; TAKATO, S.; SASAKI, T.; KAJIWARA, K. Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures. **Food Hydrocol.** v. 27, p. 228-234, 2012.
- KAYAL, M.; SHAH, S. Ulcerative Colitis: current and emerging treatment strategies, **J. Clin. Med.** v. 9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9010094>.
- KEEFER, L.; KESHAVARZIAN, A.; MUTLU, E. Reconsidering the methodology of “stress” research in inflammatory bowel disease. **J Crohn's and Colitis**, v. 2, n. 3, p. 193– 201, 2008.
- KESHARWANI, S.S.; AHMAD, R.; BAKKARI, M.A.; RAJPUT, M.K.S.; DACHINENI, R.; VALIVETI, C.K.; KAPUR, S.; BHAT, G.J.; SINGH, A.B.; TUMMALA, H. Site-directed non-covalent polymer-drug complexes for inflammatory bowel disease (IBD): Formulation development, characterization and pharmacological evaluation. **J Contr Rel**, v. 290, p. 165-179, 2018.
- KHAN, I.; ULLAH, N.; ZHA, L.; BAI, Y.; KHAN, A.; ZHAO, T.; CHE, T.; ZHANG, C. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or

Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. **Pathogens** v. 8, p. 12, 2019.

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

KIANK, C.; TACH'E, Y.; LARAUCHE, M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 41–48, 2010.

KIEKENS, S.; VANDENHEUVEL, D.; BROECKX, G.; CLAES, I.; ALLONSIUS, C.; DE BOECK, I.; THYS, S.; TIMMERMANS, J-P.; KIEKENS, F.; LEBEER, S. Impact of spray-drying on the pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Microb Biotechnol.** v. 12, n. 5, p. 849–855, 2019. DOI: 10.1111/1751-7915.13426.

KIM, J.; MUHAMMAD, N.; JHUN, B.H.; YOO, J.W. Probiotic delivery systems: a brief overview, **J Pharm Investig** v. 46, p. 377–386, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0259-7>.

KIM, W.S.; PERL, L.; PARK, H.J.; TANDIANUS, E.J.; DUNN, W.M. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Curr Microbiol.** v. 43, n. 5, p. 346-350, 2001.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Sci. Technol.** v. 9, p. 295-306, 1998.

KOBAYASHI, T.; SIEGMUND, B.; LE BERRE, C.; WEI, S.C.; FERRANTE, M.; SHEN, B.; BERNSTEIN, C.N.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L.; HIBI, T. Ulcerative colitis. **Primer, Nature Rev, Dis Prim**, v. 6, p. 74, 2020.

KOLAKOVIC, R.; LAAKSONEN, T.; PELTONEN, L.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release. **Int J Pharm**, v. 430, n. 1–2, p. 47–55, 2012.

KOTLA, N.G.; GULATI, M.; SINGH, S.K.; SHIVAPOOJA, A. Facts, fallacies and future of dissolution testing of polysaccharide based colon-specific drug delivery. **J of Contr Rel**, v. 178, p. 55–62, 2014.

KOTLA, N.G.; RANA, S.; SIVARAMAN, G.; SUNNAPU, O.; VEMULA, P.K.; PANDIT, A.; ROCHEV, Y. Bioresponsive drug delivery systems in intestinal inflammation: State-of-the-art and future perspectives. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 146, p. 248-266, 2018.

KULKARNI, N.; JAIN, P.; SHINDIKAR, A.; SURYAWANSHI, P.; THORAT, N. Advances in the Colon-Targeted Chitosan Based Multiunit Drug Delivery Systems for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Carbohydr. Polym.** v. 288, 119351, 2022.

KRUIS, W.; FRIC, P.; POKROTNIEKS, J.; LUKAŠ, M.; FIXA, B.; KAŠČÁK, M.; KAMM, M.A.; WIESMUELLER, J.; BEGLINGER, C.; STOLTE, M. Maintaining Remission of Ulcerative Colitis with the Probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 Is as Effective as with Standard Mesalazine. **Gut** v. 53, p. 1617–1623, 2004.

LANGHORST, J.; COBELENS, P.M.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C.J.; BENSON, S.; RIFAIE, N.; DOBOS, G.J.; SCHEDLOWSKI, M.; ELSENBURCH, S. Stress-related peripheral neuroendocrine-immune interactions in women with ulcerative colitis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8–10, p. 1086–1096, 2007.

- LARROIA S.; MARTIN, H. Bifidobacterium as possible dietary adjuncts cultured dairy products – a review. **Cult Dairy Prod Jour.** v. 25, p. 18-22, 1990.
- LAUTENSCHLÄGER, C.; SCHMIDT, C.; FISCHER, D.; STALLMACH, A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. **Adv Drug Delivery Rev,** v. 71, p. 58–76, 2014.
- LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose coatings as new release systems for active packaging. **Carbohydr. Polym.** v. 103, p. 528–537, 2014.
- LEBEER, S.; CLAES, I.J.J.; VERHOEVEN, T.L.A.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. **Microb Biotechnol** v.4, p. 368–374, 2011.
- LEBEER, S.; CLAES, I.; TYTGAT, H.L.P.; VERHOEVEN, T.L.A.; MARIEN, E.; VON OSSOWSKI, I., *et al.* Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG *pili* in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. **Appl Environ Microbiol.** v.78, p. 185–193, 2012.
- LEDDIN, D.; TAMIM, H.; LEVY, A.R. Decreasing incidence of inflammatory bowel disease in eastern Canada: a population database study. **BMC gastroenterology.** v. 14, n. 1, p. 140, 2014.
- LEE J.; JEE S.R.; KIM H.W.; BAEK D.H.; SONG G.A.; MOON W.; PARK, S.J.; KIM, H.J.; LEE, J.H.; PARK, J.H.; KIM, T.O. Factors associated with low adherence to oral 5-aminosalicylic acid in patients with ulcerative colitis. **PLoS ONE** v. 14, n. 3, e0214129, 2019.
- LERNER, A.; AMINOV, R.; MATTHIAS, T. Dysbiosis may trigger autoimmune diseases via inappropriate posttranslational modification of host proteins. **Front Microbiol** v. 7, p. 84, 2016.
- LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y.; HAN, T.; LI, Z.; ZHOU, P.; PAN, P.; WANG, W.; HU, D.; LIU, X.; ZHANG, Q.; WU, J. Coronavirus infections and immune responses. **J Med Virol** v. 92, n. 4, p. 424–432, 2020.
- LIU, H.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. **Carbohydr Polym,** v. 69, p. 756–762, 2007.
- LOFTUS Jr., E.V.; SANDBORN, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin North Am** v. 31, p. 1-20, 2002.
- LOFTUS, E.V.; KANE, S.V.; BJORKMAN, D. Systematic review: short-term adverse effects of 5-aminosalicylic acid agents in the treatment of ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 19, v. 179–189, 2004.
- LOGAN I.; BOWLUS C.L. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. **Autoimmunity reviews.** v. 9, n.5, p. 372–378, 2010.
- LOPES, S.A.; ROQUE-BORDA, C.A.; DUARTE, J.L.; DI FILIPPO, L.D.; BORGES CARDOSO, V.M.; PAVAN, F.R.; CHORILLI, M.; MENEGUIN, A.B. Delivery Strategies of Probiotics from Nano- and Microparticles: Trends in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease—An Overview. **Pharmaceutics,** v. 15, p. 2600, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112600>.
- LOZOYA-AGULLO, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZA, I.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. Preclinical models for colonic absorption,

application to controlled release formulation development. **Eur J Pharma and Biopharmac**, v. 130, p. 247-259, 2018.

LU, Y.; LI, X.; LIU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, D. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. **Front Immunol** v. 9, n. 72, 1–9, 2018.

MAIOR, J.; REIS, A.V.; MUNIZ, E.C.; CAVALCANTI, A.O. Reaction of pectil and glycidyl methacrilate and ulterior formation of free films by reticulation. **Int J Pharm**, v. 355, p. 184–194, 2008.

MANADAS, R.; PINA, M., E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev Bras de Ciências Farma**, v. 38, n. 4, out/dez, 2002.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Synthesis and Characterization of Nanocellulose Reinforced Full-Interpenetrating Polymer Network Based on Poly (vinyl alcohol) and Polyacrylamide (Both Crosslinked) Composite Films. **Polymer Composites**, v. 38, n. 8, p. 1720-1731, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/pc.23742>.

MARDINI, H.E.; GRIGORIAN, A.Y. Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: a meta-analysis, **Inflamm Bowel Dis**, v. 20, p.1562-1567, 2014.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health, **Nutrients**, 9, n. 8, 1021, 2017.

MATTOS, B.; GARCIA, M.; NOGUEIRA, J.; PAIATTO, L.; ALBUQUERQUE, C.; SOUZA, C.; FERNANDES, L.G.R.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; SIMION, P.U. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. **Med Inflamm**. v. 2015, p. 1-11, 2015.

MACDERMOTT, R.P. Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. **Am J Gastroenterol** v. 95, p. 3343-5, 2000.

MAWDSLEY, J. E.; RAMPTON, D. S. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**, v. 54, n. 10, p. 1481–1491, 2005.

MCCONNELL, R.E; TYSKA, M.J. Myosin-1a powers the sliding of apical membrane along microvillar actin bundles. **J Cell Biol**, v. 177, p. 671- 81, 2007.

MENEGUIN, A.B.; SÁBIO, R.M.; DE SOUZA, M.P.C.; FERNANDES, R.P.; DE OLIVEIRA, A.G.; CHORILLI, M. Cellulose Nanofibers Improve the Performance of Retrograded Starch/Pectin Microparticles for Colon-Specific Delivery of 5-ASA. **Pharmaceutics** v. 13, p. 1515, 2021.

MENEGUIN, A.B. **Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

MENEGUIN, A.B.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydr. Polym.** v. 99, p. 140–149, 2014.

MENEGUIN, A.B.; FERREIRA CURY, B.S.; DOS SANTOS, A.M.; FRANCO, D.F.; BARUD, H.S.; DA SILVA FILHO, E.C. Resistant starch/pectin freestanding films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release. **Carbohydr. Polym.** v. 157, p. 1013–1023, 2017.

MENEGUIN, A.B.; BEYSSAC, E.; GARRAIT, G.; HSEIN, H.; CURY, B.S.F. 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. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 123, p. 84–94, 2018.

MENEGUIN, A.B. **Micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente pectina como estratégia para administração oral de insulina.** 212 f. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

MENEGUIN, A.B.; SÁBIO, R.M.; DE SOUZA, M.P.C; FERNANDES, R.P.; DE OLIVEIRA, A.G.; CHORILLI, M. Cellulose Nanofibers Improve the Performance of Retrograded Starch/Pectin Microparticles for Colon-Specific Delivery of 5-ASA. **Pharmaceutics** v. 13, p. 1515, 2021.

MISZPUTEN S.J. Terapêutica não biológica das doenças inflamatórias intestinais. In: CURY, D.B; MOSS, A.C. **Doenças inflamatórias intestinais: retocolite ulcerativa e doença de Crohn.** Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011. 464p.

MLADENOVSKA, K.; RAICKI, R.S.; JANEVIK, E.I.; RISTOSKI, T.; PAVLOVA, M.J.; KAVRAKOVSKI, Z.; DODOV, M.G.; GORACINOVA, K. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. **Int. J. Pharm.** v. 342, p. 124–136, 2007b.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Cur Opi in Plant Biol.** v. 11, p. 266–277, 2008.

MOLODECKY, N.A.; SOON, I.S.; RABI, D.M.; GHALI, W.A.; FERRIS, M.; CHERNOFF, G.; BENCHIMOL, E.I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; BARKEMA, H.W.; et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases with Time, Based on Systematic Review. **Gastroenterol** v. 142, p. 46–54. e42, 2012.

MOREIRA A.L.; DE CAMPOS LOBATO, L.F.; DE SOUZA, H.S. IBD Epidemiology: What is Going on in the Developing World? Results from 163,000 Patients. **Gastroenterol.** v. 156, n. 6, p. 73, 2019.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal T H 17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. **Science** v. 317, p. 256–260, 2007.

MÜLLER, A.; NI, Z.; HESSLER, N.; WESARG, F.; MULLER, F.A.; KRALISCH, D.; FISCHER, D. The Biopolymer Bacterial Nanocellulose as Drug Delivery System: Investigation of Drug Loading and Release using the Model Protein Albumin. **J Pharm Sci,** v. 102, p.579-592, 2013.

NASS, B.Y.S.; DIBBETS, P.; MARKUS, C.R. Impact of the COVID-19 pandemic on inflammatory bowel disease: The role of emotional stress and social isolation. **Stress and Health,** v. 38, n. 2, p. 222–233, 2022.

NATARAJAN, J.V.; NUGRAHA, C.; NG, X.W; VENKATRAMAN, S. Sustainedrelease from nanocarriers: a review. **J Control Rel,** v.193, p. 122–138, 2014.

NATH, A.; HAKTANIRLAR, G.; VARGA, Á.; MOLNÁR, M.; ALBERT, K.; GALAMBOS, I.; KORIS, A.; VATAI, G. Biological Activities of Lactose-Derived Prebiotics and Symbiotic with Probiotics on Gastrointestinal System. **Medicina.** v. 54, n. 2, p. 18, 2018.

- NAYAK, A.K.; PAL, D.; SANTRA, K. Ispaghula mucilage-gellan mucoadhesive beads of metformin HCl: Development by response surface methodology. **Carbo Polym**, v. 107, p.41–50, 2014.
- NEURATH, M.F.; TRAVIS, S.P. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. **Gut**, v. 61, p. 1619–1635, 2012.
- NEWTON, A.M.; PRABAKARAN, L.; JAYAVEERA, KN. Formulation development, optimization and study on drug release kinetics of Eudragit® L100-HPMC E15 LV mixed film-coated colon-targeted Mesalamine tablets. **Asian J Pharm** v. 6, p. 180-9, 2012.
- NG, S.C.; SHI, H.Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F.E.; TANG, W.; BENCHIMOL, E.I., et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **Lancet**. v. 390, p. 2769–2778, 2017.
- NIKOLAUS, S.; FOLSCN, U.; SCHREIBER, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterol** v. 47, p. 71-82, 2000.
- NIELSEN, O.H.; MUNCK, L.K. Drug Insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.** v. 4, p. 160–170, 2007.
- NUNTHANID, J.; HUANBUTTA, K.; LUANGTANA-ANAN, M.; SRIAMORNSAK, P.; LIMMATVAPIRAT, S.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Development of time-, pH, and enzyme-controlled colonic drug delivery using spray-dried chitosan acetate and hydroxypropyl methylcellulose. **Eur J Pharm and Biopharm**, v. 68, p. 253–259. 2008.
- OBA, J. O que podemos fazer para evitar as doenças inflamatórias intestinais? A importância da microbiota. **Intern J Nutrol**, v. 10, n.1, p. 306S - 312S, 2017.
- OKA, A.; SARTOR, R.B. Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. **Dig Dis and Sci**, v. 65, p. 757–788, 2020. DOI:10.1007/s10620-020-06090-z.
- PALUMBO, V. D.; ROMEO, M.; GAMMAZZA, A.M.; CARINI, F.; DAMIANI, P.; DAMIANO, G.; BUSCEMI, S.; LO MONTE, A.I.; GERGES-GEAGEA, A.; JURJUS, A.; et al. The Long-Term Effects of Probiotics in the Therapy of Ulcerative Colitis: A Clinical Study. **Biomed. Pap.** v. 160, p. 372–377, 2016.
- PAPA, A.; SCALDAFERRI, F.; DANESE, S.; GUGLIELMO, S.; ROBERTO, I.; BONIZZI, M.; MOCCI, G.; FELICE, C.; RICCI, C.; ANDRISANI, G.; GIUSEPPE FEDELI, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. Vascular involvement in inflammatory bowel disease: pathogenesis and clinical aspects. **Dig Dis** v. 26, p. 149–155, 2008.
- PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MASCHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Intern J of Pharm**, v. 309, p. 44–50, 2006.
- PARENTE, J.M.; COY, C.S.; CAMPELO, V.; PARENTE, M.P.; COSTA, L.A.; DA SILVA, R.M.; STEPHAN, C.; ZEITUNE, J.M. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World J Gastroenterol** v. 21, 1197-1206, 2015.
- PARKER, E.A.; ROY, T.; D'ADAMO, C.R.; WIELAND, L.S. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**. v. 45, p. 125-134, 2018.

- PATEL, M.M. Cutting-edge technologies in colon-targeted drug delivery systems. **Exp Opi on Drug Delivery**, v. 8, p. 1247–1258, 2011.
- PATEL, R.P.; PATEL, M.P.; SUTHAR A.M. Indian Society for Education and Environment (iSee), **Indian J. Sci. Technol.** p.44-47, v.2, n.10, 2009.
- PAZMANDI, J.; KALINICHENKO, A.; ARDY, R.C.; BOZTUG, K. Earlyonset inflammatory bowel disease as a model disease to identify key regulators of immune homeostasis mechanisms. **Immunology**, v. 287, p.162–185, 2019.
- PENCY, S. R. Improvement in drying and concentrating liquid substances by atomizing. Titular: Samuel R. Pency. Patent n° 125,406.1.872. **UNITED STATES PATENT OFFICE**. New York, N.Y. Depósito 1.872. (Specification forming part of Letters Patent No. 125,406, dated April 9, 1872). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-125406-A>. Acesso em: 27 de dezembro de 2022.
- PERERA, G.; BARTHELMES, J.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Novel pectin-4-aminothiophenole conjugate microparticles for colon-specific drug delivery. **J Contr Rel**, v. 145, p. 240–246, 2010.
- PINHO, M.A. Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. **Rev Bras Coloproctol**. v. 28, n. 1, p. 119-23, 2008.
- PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F.J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of Action of Probiotics, **Adv Nutr**, v. 10, p. S49-S66, 2019.
- POOLEY, N.; GHOSH, L.; SHARON, P. Up-regulation of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 differs between Crohn's disease and ulcerative colitis. **Dig Dis Sci**, v. 40, p. 219-225, 1995.
- QUARESMA, A.B.; KAPLAN, G.G.; KOTZE, P.G. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Cur Opi in Gastroenterology** v. 35, n. 4, p. 259-264, July 2019. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000534.
- QURESHI, A.I.; COHEN, R.D. Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? **Adv Dr Del Reviews** v. 57, p. 281–302, 2005.
- RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F.; SCHWARTZ, L.W.; SIMON, P.L. Effect of aminophenols (5-ASA and 4-ASA) on colonic interleukin-1 generation. **Gut**, v. 33, p. 929-932, 1992.
- RASMUSSEN, S.N.; BONDESEN, S.; HVIDBERG, E.F.; HANSEN, S.H.; BINDER, V.; HALSKOV, S.; FLACHS, H. 5-Aminosalicylic Acid in a Slow-Release Preparation: Bioavailability, Plasma Level, and Excretion in Humans. **Gastroenterology** v. 83, 1062–1070, 1982.
- REED, K.K.; WICKHAM, R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, p. 3-14, 2009.
- RIBEIRO, L.N.M.; ALCÂNTARA, A.C.S.; DARDER, M.; ARANDA, P.; ARAÚJO-MOREIRA, F.M.; RUIZ- HITZKY, E. Pectin-coated chitosan-LDH bio nanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery. **Inter J Pharm**, v. 463, p. 1–9, 2014.

RÍOS-COVIÁN, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILÁN, G.C.; SALAZAR, N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health, **Front Microbiol**, v. 7, p.185, 2016.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROGLER, G.; BRAND, K.; VOGL, D.; PAGE, S.; HOFMEISTER, R.; ANDUS, T.; KNUECHEL, R.; BAEUERLE, P.A.; SCHOLMERICH, J.; GROSS, V. Nuclear Factor κ B Is Activated in Macrophages and Epithelial Cells of Inflamed Intestinal Mucosa. **Gastroenterology**, v. 115, p. 357–369, 1998.

ROUND, A.N.; RIGBY, N.M; MACDOUGALL, A.J.; MORRIS, V.J. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. **Carbo Res**, v. 345, p.487-497, 2010.

RUBINSTEIN, A. Colonic drug delivery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, p. 33–37, 2005.

SAADATZADEH, A.; ATYABI, F.; FAZELI, M.R.; DINARVAND, R.; JAMALIFAR, H.; ABDOLGHAFFARI, A.H.; ABDOLLAHI, M. Biochemical and pathological evidences on the benefit of a new biodegradable nanoparticles of probiotic extract in murine colitis. **Fund & Clin Pharm**, v. 26, p. 589–598, 2012.

SAJADINEJAD, M.S.; ASGARI, K.; MOLAVI, H.; KALANTARI, M.; ADIBI, P. (2012). Psychological issues in inflammatory bowel disease: An overview. **Gastro Research and Practice**, v. 106502, 2012.

SAKAMOTO, K. Pathologic Response of the Gastrointestinal Tract to Toxicants. In: MCQUEEN, C. **Compr Toxicology**. v.10, p. 94-113, 2010.

SALAMA, A.H. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. **Drug Deliv. and Transl. Res.** v. 10, n. 1–12, 2020.

SAMAK, Y.O.; EL MASSIK, M.; COOMBES, A.G.A. A comparison of aerosolization and homogenization techniques for production of alginate microparticles for delivery of corticosteroids to the colon. **J Pharm Sci**, v. 106, p. 208–216, 2017.

SAMBORSKA, K.; BOOSTANI, S.; GERANPOUR, M.; HOSSEINI, H.; DIMA, C.; KHOSHNOUDI-NIA, S.; ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; SHADDEL, R.; AKBARI-ALAVIJEH, S., JAFARI, S. M. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. **Trends in F Sci & Tech** v. 108, p. 297–325, 2021.

SANDBORN, W.J. Oral 5-ASA therapy in ulcerative colitis: what are the implications of the new formulations? **J. Clin. Gastroenterol.** v. 42, p. 338–344, 2008.

SANDERS, M.E.; MERENSTEIN, D.; MERRIFIELD, C.A.; HUTKINS, R. Probiotics for human use, **Nutrition Bulletin**, v. 43, p.212-225, 2018.

SANDERS, M.E.; MERENSTEIN, D.J.; REID, G.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic, **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, p. 605-616, 2019.

SARKAR, S. Microbiological Considerations for Probiotic Supplemented Foods. **Intern J Micro & Adv Immuno**, v. 1, p. 1-7, 2013.

- SARDO, H.S.; SAREMNEJAD, F.; BAGHERI, S.; AKHGARI, A.; GAREKANI, H.A.; SADEGHI, F. A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. **Intern J of Pharm**, v. 558, p. 367–379, 2019.
- SAWARKAR, S.P.; DESHPANDE, S.G.; BAJAJ, A.N.; NIKAM, V.S. In vivo evaluation of 5-ASA colon-specific tablets using experimental-induced colitis rat animal model. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, p. 1445–1454, 2015.
- SCHOULTZ, I.; KEITA, A. Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease—Focusing on Intestinal Barrier Function. **Cells**. v.8, n. 2, p. 193, 2019.
- SCHULZKE, J.D.; PLOEGER, S.; AMASHEH, M.; FROMM, A.; ZEISSIG, S.; TROEGER, H.; RICHTER, J.; BOJARSKI, C.; SCHUMANN, M.; FROMM, M. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1165, p. 294–300, 2009.
- SCALDAFERRI, F.; VETRANO, S.; SANS, M.; ARENA, V.; STRAFACE, G.; STIGLIANO, E.; REPICI, A.; STURM, A.; MALESCI, A.; PANES, J.; YLAHERTTUALA, S.; FIOCCHI, C.; DANESE, S. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology** v. 136, p. 585–595, e585, 2009.
- SEWITCH M.J.; ABRAHAMOWICZ M.; BARKUN A.; BITTON A.; WILD G.E.; COHEN A.; DOBKIN, P.L. Patient nonadherence to medication in inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**. v. 98, n. 7, p. 1535–1544, 2003.
- SHALE, M.J.; RILEY, S.A. Studies of compliance with delayed-release mesalazine therapy in patients with inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 18, p. 191–198, 2003.
- SHEN, Z.H.; ZHU, C.X.; QUAN, Y.S.; YANG, Z.Y.; WU, S.; LUO, W.W.; TAN, B.; WANG, X.Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **W J of Gastroenterology**, v. 24, p. 5–14, 2018.
- SHIVASHANKAR, R.; TREMAINE, W.J.; HARMSSEN, W.S.; LOFTUS Jr., E.V. Incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted county, Minnesota from 1970 Through 2010. **Clin Gastroenterol Hepatol**. v. 15, n. 6, p. 857–863, 2017.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug delivery kinetics (the "sequential layer" model). **Pharm Research**, v. 17, p. 1290-1298, 2000.
- SILVA, P.T.; FRIES, L.L.M.; MENEZES, C.R.; SILVA, C.B.; SORIANI, H.H.; BASTOS, J.O.; MOTTA, M.H.; RIBEIRO, R.F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural** [online]. v. 45, n. 7, 2015.
- SILVA, JHONATAN M.; BARUD, HERNANE S.; MENEGUIN, ANDRÉA B.; CONSTANTINO, VERA R.L.; RIBEIRO, SIDNEY J.L. (2019). Inorganic-organic bio-nanocomposite films based on Laponite and Cellulose Nanofibers (CNF). **Applied Clay Science**, v. 168, p. 428–435, 2019. DOI: 10.1016/j.clay.2018.12.003.
- SINGH, A.; MANDAL, U.K.; NARANG, R.K. Development and characterization of enteric coated pectin pellets containing mesalamine and *Saccharomyces boulardii* for

specific inflamed colon: In vitro and in vivo evaluation. **J of Drug Delivery Science and Tech** v. 62, p. 102393, 2021.

SINGH, A.; KAUR, K.; MANDAL, U.K.; NARANG, R.K. Nanoparticles as budding trends in colon drug delivery for the management of ulcerative colitis. **Curr Nanomedicine** v. 10, p. 225–247, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.2174/2468187310999200621200615>.

SINGH, A.; SINGH, G.; MANDAL, U.K.; NARANG, R.K. Smart nanocarriers: a novel tool for the treatment of ulcerative colitis, **Pharma** v. 12, p.37–43, 2020b.

SINGH, P.; ANANTHAKRISHNAN, A.; AHUJA, V. Pivot to Asia: inflammatory bowel disease burden. **Intest. Res.** v. 15, p. 138–41, 2017.

SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. **Eur J of Pharm Sci**, v.18, p. 3–18, 2003.

SOUZA, A.C.G.; SOUZA, P.S.; COSTA, T.M.; PASSOS, S.C. **Retocolite Ulcerativa associada à Doença de Crohn: um estudo de caso**. Salvador: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, 2015.

SOUZA, F.G.; PRETE, A.C.L.; RIBEIRO, C.H.M.A. Adesão ao tratamento farmacológico em pacientes com doenças inflamatórias intestinais: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 2, e4601, 2021.

SRIAMORNSAK, P. Application of pectin in oral drug delivery. **Expet Opin. Drug Deliv.** v. 8, p. 1009–1023, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.584867>.

STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A., (ed.). **Food Polysac and their applications**, 2nd. ed. Florida: CRC Press, 2006. Capítulos 1, 7 e 8.

STENSON, W.F.; LOBOS, E. Sulfasalazine inhibits the synthesis of chemotactic lipids by neutrophils. **J Clin Invest** v. 69, p. 494-7, 1982.

STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Patologia**. 2. ed. São Paulo: Manole; 2002.

STEVENS, C.; LIPMAN, M.; FABRY, S.; MOSCOVITCH-LOPATIN, M.; ALMAWI, W.; KERESZTES, S; PEPPERCORN, M.A.; STROM, T.B. 5-Aminosalicylic acid abrogates T-cell proliferation by blocking interleukin-2 production in peripheral blood mononuclear cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 272, p. 399-406, 1995.

SU, H.J.; CHIU, Y.T.; CHIU, C.T.; LIN, Y.C.; WANG, C.Y.; HSIEH, J.Y.; WEI, S-C. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. **J Formos Med Assoc.** v. 118, n. 7, p. 1083-92, 2019a.

SU, Y.; ZHENG, X.; ZHAO, Q.; FU, N.; XIONG, H.; WU, W.D.; CHEN, X.D. Spray drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG with calcium-containing protectant for enhanced viability. **Powder Technology** v.358, n. 15, p. 87-94, 2019b.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. LIBECON. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment J**, v. 7, n. 2, dez. 2006.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **Intern Dairy J**, v.19, i.4, p. 209–214, 2009.

- SZKLO, M.A. Importância da epidemiologia na pesquisa clínica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 1, n. 2, p. 9-24, 2002.
- TAHARA, K.; SAMURA, S.; TSUJI, K.; YAMAMOTO, H.; TSUKADA, Y.; BANDO, Y.; TSUJIMOTO, H.; MORISHITA, R.; KAWASHIMA, Y. Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease. **Biomaterials**, v.32, p. 870–878, 2011.
- TAJIRI, T.; MORITA, S.; SAKAMOTO, R.; MIMURA, H.; OZAKI, Y.; REPPAS, C.; KITAMURA, S. Developing dissolution testing methodologies for extended-release oral dosage forms with supersaturating properties. Case example: Solid dispersion matrix of indomethacin. **Inter J of Pharmaceutics**, v. 490, p. 368-374, 2015.
- TAVARES JUNIOR, A. G.; DE ARAÚJO, J. T. C.; DUARTE, J. L.; SILVESTRE, A. L. P.; DI FILIPPO, L. D.; CHORILLI, M. Polymeric Systems for Colon-specific Mesalazine Delivery in the Intestinal Bowel Diseases Management. **Cur Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 1351–1367, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867329666220707102912>.
- TENJARLA, S. Dissolution of Commercially Available Mesalamine Formulations at Various pH Levels. **Drugs R& D**. v. 15, n. 2, p.211-215. 2015.
- TESTA, A.; CASTIGLIONE, F.; NARDONE, O.M.; COLOMBO, G.L. Adherence in ulcerative colitis: an overview. **Patient Prefer Adherence**. v. 11, p. 297–303, 2017.
- THAKUR, V.; SINGH, A.; JOSHI, N.; MISHRA, N. Spray Dried Formulation of Mesalamine Embedded with Probiotic Biomass for the Treatment of Ulcerative Colitis: In-Vitro and In-Vivo studies. **Drug Dev Ind Pharm** v. 45, n. 11, p. 1807–1820, 2019.
- THE BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office Books, 1999.
- TOMAR, S.K.; KEDIA, S.; SINGH, N.; UPADHYAY, A.D.; KAMAT, N.; BOPANNA, S.; YADAV, D.P.; GOYAL, S.; JAIN, S.; MAKHARIA, G.; et al. Higher Education, Professional Occupation, and Upper Socioeconomic Status Are Associated with Lower Adherence to Medications in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **JGH Open** v. 3, p. 302–309, 2019.
- TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. **Physiol Review**, v. 81, 1031–1064, 2001.
- TORRADO, S.; TORRADO, J.J.; CADORNIGA, R. Topical application of albumin microspheres containing vitamin A. Drug release and availability. **Int J Pharm**, v. 86, p. 147–152, 1992.
- TRIPATHI, P.; BEAUSSART, A.; ALSTEENS, D.; DUPRES, V.; CLAES, I.; VON OSSOWSKI, I.; DE VOS, W.M.; PALVA, A.; LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DUFRÊNE, Y.F. Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **ACS Nano** v. 7, p. 3685–3697, 2013.
- TSAI, Y. L.; LIN, T. L.; CHANG, C. J.; WU, T.R.; LAI, W.F.; LU, C.C.; LAI, H.C. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases, **J Biomed Sci**, v. 26, p.3, 2019.
- TSIOLAKIDOU, G.; KOUTROUBAKIS, I.E.; TZARDI, M.; KOUROUMALIS, E.A. Increased expression of VEGF and CD146 in patients with inflammatory bowel disease. **Dig Liver Dis** v. 40, p. 673–679, 2008.

TUNG, N.T.; PHAM, T.M.H; NGUYEN, T.H.; PHAM, T.T.; NGUYEN, T.Q. Pectin/HPMC dry powder coating formulations for colon specific targeting tablets of metronidazole. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 33, p. 19–27, 2016.

UNGARO, R.; MEHANDRU, S.; ALLEN, P.B.; PEYRIN-BIROULET, L.; COLOMBEL, J.-F. Ulcerative Colitis. **Lancet**, v. 389, p. 1756–1770, 2017.

UNITED States Pharmacopoeia and National Formulary. 30th. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Easton: Mack, 2007.

VALDEZ, G.F.; GIORI, G.S. Effectiveness of soy milk as food carrier for *Lactobacillus acidophilus*. **J Food Protection** v. 56, n. 4, p. 320–322, 1983.

VALO, H.; KOVALAINEN, M.; LAAKSONEN, P.; HÄKKINEN, M.; AURIOLA, S.; PELTONEN, L.; LINDER, M.; JÄRVINEN, K.; HIRVONEN, J.; LAAKSONEN, T. Immobilization of protein-coated drug nanoparticles in nanofibrillar cellulose matrices-enhanced stability and release. **J Control Release**, v. 156, p. 390–397, 2011.

VASS, P.; DEMUTH, B.; HIRSCH, E.; NAGY, B.; ANDERSEN, S.K.; VIGH, T.; VERRECK, G.; CSONTOS, I.; NAGY, Z.K.; MAROSI, G. Drying technology strategies for colon-targeted oral delivery of biopharmaceuticals. **J Control Release**. V. 296, p. 162–178, 2019. DOI 10.1016/j.jconrel.2019.01.023.

VIANA, C.C.R.; RENHE, I.R.T.; DE BESSA, M.E.; MARTINS, E.; STEPHANI, R.; DE CARVALHO, A.F.; PERRONE, I.T. Microencapsulamento de bactérias probióticas: uma breve revisão. **Res, Soc and Develop**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2021.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**. v. 46, p. 20–25, 2009.

WAGNER, M.B. Medindo a ocorrência de doença: prevalência ou incidência? **Jornal de Pediatria**. v. 74, p. 157–162, 1998.

WALDMAN, E.A.; ROSA, T.E.C. **Breve introdução à epidemiologia**, São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 1994. Disponível em: http://portalses.saude.sc.gov.br/arquivos/sala_de_leitura/saude_e_cidadania/ed_07/index.html. Acesso em: 05 de dezembro de 2022.

WALLACE, K.L.; ZHENG, L.-B.; KANAZAWA, Y.; SHIH, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 1, p. 6–21. 2014. DOI:10.3748/wjg.v.20.i1.6.

WAN, L.S.; HENG, P.W.; CHIA, C.G.; CECECILIA, G.H. Spray drying as a process for encapsulation and the effect of different coating polymers. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** v. 18, n. 9, p. 997–1011, 1992.

WANG, H.; GAO, K.; WEN, K.; ALLEN, I.C.; LI, G.; ZHANG, W.; KOCHER, J.; YANG, X.; GIRI-RACHMAN, E.; LI, G.-H.; CLARK-DEENER, S.; YUAN, L. *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic pigs transplanted with human gut microbiota. **BMC microbiology**. v. 16, n.1, p. 109, 2016.

WANG, Y.; SHEN, W.; SHI, X.; FU, F.; FAN, Y.; SHEN, W.; CAO, Y.; ZHANG, Q.; QI, R., Alpha-Tocopheryl Succinate-Conjugated G5 PAMAM Dendrimer Enables Effective Inhibition of Ulcerative Colitis. **Adv. Healthc. Mater.** v. 6, p. 1700276, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, 1-4 Oct. 2001. *In*: World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Food and Nutrition Paper, Rome, n. 85, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 07 de dezembro de 2022.

WIEËRS, G.; BELKHIR, L.; ENAUD, R.; LECLERCQ, S.; PHILIPPART DE FOY, J.-M.; DEQUENNE, I.; DE TIMARY, P.; CANI, P.D. How Probiotics Affect the Microbiota. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 9, p. 454, 2020.

WILKS, S. **Lect on patho anatomy**. Philadelphia: Lindsay and blakston, 1875, p. 408.

WILLIAMS, C.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; RIOUX, K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. **Ther Adv in Gastro**, v. 4, p. 237–248, 2011.

WINDSOR, J.W.; KAPLAN, G.G. Evolving Epidemiology of IBD. **Curr Gastroenterol Rep.** v. 21, n. 8, p. 40, 2019. DOI: 10.1007/s11894-019-0705-6. PMID: 31338613.

WU, J.; YUAN, X.; WANG, B.; GU, R.; LI, W.; XIANG, X.; TANG, L.; SUN, H. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: from gene structure to pathogenic mechanisms and potential therapy. **Front Microbiol** v. 11, p. 1576, 2020.

XU, K.; CAI, H.; SHEN, Y.; XU, K.; CAI, H.; SHEN, Y.; NI, Q.; CHEN, Y.; HU, S.; LI, J.; WANG, H.; YU, L.; HUANG, H.; QIU, Y.; WEI, G.; FANG, Q.; ZHOU, J.; SHENG, J.; LIANG, T.; LI, L. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban** v. 49, n.1, p. 147–157, 2020. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.02.

XU, DY.; LI, GJ.; LIAO, ZF.; HE, X.H. Preparation and in vitro controlled release behavior of a novel pH-sensitive drug carrier for colon delivery. **Polym. Bull.** v. 62, p. 183–193, 2009.

YE, B.; VAN LANGENBERG, D.R. Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: are all created equal? **W J of Gastro Pharm and Therap**, v. 6, p.137-144, 2015.

YIN, M.; YUAN, Y.; CHEN, M.; LIU, F.; SAQIB, M.N.; CHIOUE, B-S.; ZHONG, F. The dual effect of shellac on survival of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules. **Food Chemistry** v. 389, p. 132999, 2022.

YU, C.D.; XU, Q.J.; CHANG R.B. Vagal sensory neurons and gut-brain signaling. **Cur O in Neuro**, v. 62, p. 133–140, 2020.

ZAVAREZE, E.R.; DIAS, A.R.G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbo Pol**, v. 83, p. 317–328, 2011.

ZHANG, J.; ZHAO, Y.; HOU, T.; ZENG, H.; KALAMBHE, D.; WANG, B.; SHEN, X.; HUANG, Y. Macrophage based nanotherapeutic strategies in ulcerative colitis. **J Control Release** v. 320, p. 363–380, 2020.

ZHANG, L.; HU, X.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Slowly digestible starch repared from rice starches by temperature-cycled retrogradation. **Carbo Pol**, v.84, p. 970-974, 2011.

ZHANG, M.; XU, C.; WEN, L.; HAN, M.K.; XIAO, B.; ZHOU, J.; MERLIN, D. A hyaluronidase-responsive nanoparticlebased drug delivery system for targeting colon cancer cells. **C Research**, v. 76, p. 7208–7218, 2016.

ZHANG, Y.; LI, Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. **W J Gastro**. v. 20, n. 1, p. 91-99, 2014.

ZHANG, L.; LOU, Y.; SCHUTYSER, M. A. I. 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. **F Structure**, v. 18, p. 14–22, out. 2018.

ZHOU, S.; ZHANG, B.; LIU, X.; TENG, Z.; HUAN, M.; YANG, T. A new natural angelica polysaccharide-based colon-specific drug delivery system. **J of Pharm Sci**, v. 98, p. 56–4768, 2009.

ZIAEE, A.; ALBADARIN, A. B.; PADRELA, L.; FEMMER, T.; O'REILLY, E.; WALKER, G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. **Eur J of Pharm Sci** v. 127, p. 300–318, 2019.