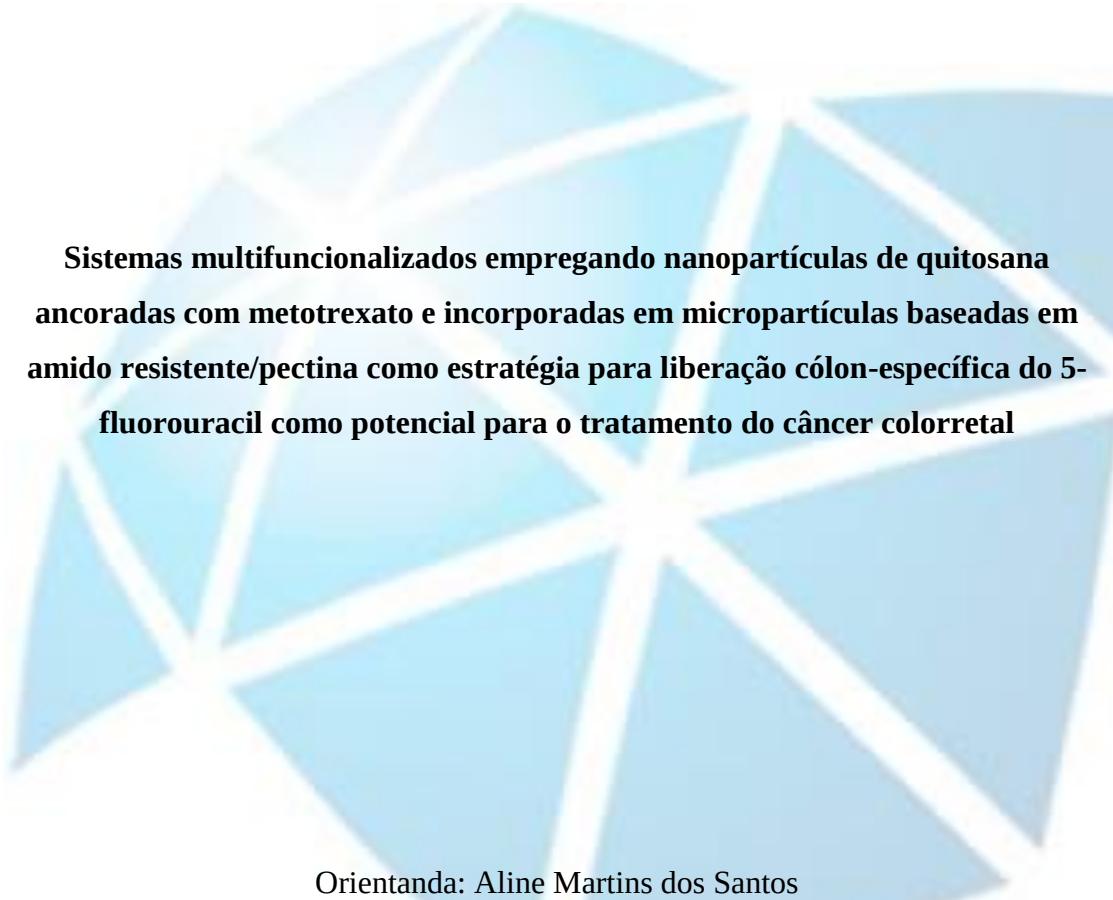


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Sistemas multifuncionalizados empregando nanopartículas de quitosana ancoradas com metotrexato e incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina como estratégia para liberação cólon-específica do 5-fluorouracil como potencial para o tratamento do câncer colorretal**

Orientanda: Aline Martins dos Santos  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião  
Coorientador: Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

**Araraquara/SP**  
**2019**

**Aline Martins dos Santos**

**Sistemas multifuncionalizados empregando nanopartículas de quitosana ancoradas com metotrexato e incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina como estratégia para liberação cólon-específica do 5-fluorouracil como potencial para o tratamento do câncer colorretal**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

**Araraquara/SP**

**2019**

---

**S237s**

Santos, Aline Martins dos.

Sistemas multifuncionalizados empregando nanopartículas de quitosana ancoradas com metotrexato e incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina como estratégia para liberação cólon-específica do 5- fluorouracil como potencial para o tratamento do câncer colorretal / Aline Martins dos Santos. – Araraquara: [S.n.], 2019. 142 f. : il.

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

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião.

Coorientador: Leonardo Miziara Barboza Ferreira.

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3. 5-fluorouracil. 4. Metotrexato. 5. Micropartículas. 6. Amido resistente. 7. Pectina. 8. Liberação cólon-específica. 9. Biodistribuição *in vivo*. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Ferreira, Leonardo Miziara Barboza, coorient. III. 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 TESE:** Sistemas multifuncionalizados empregando nanopartículas de quitosana ancoradas com metotrexato e incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina como estratégia para liberação cólon-específica do 5- fluorouracil como potencial para o tratamento do câncer colorretal

**AUTORA:** ALINE MARTINS DOS SANTOS

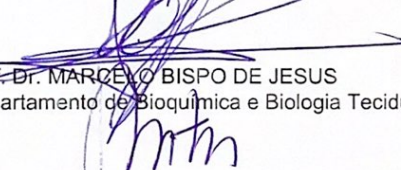
**ORIENTADORA:** MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

**COORDENADOR:** LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA

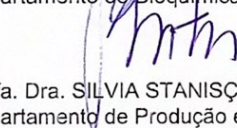
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF do Câmpus de Araraquara - UNESP



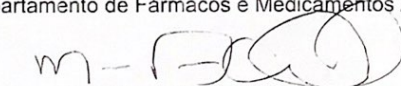
Prof. Dr. MARCELO BISPO DE JESUS  
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / Instituto de Biologia da UNICAMP



Prof. Dra. SILVIA STANISÇUASKI GUTERRES  
Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia / UFRGS



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / FCF - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. MARCO VINICIUS CHAUD  
Departamento de Farmácia / Universidade de Sorocaba

Araraquara, 30 de julho de 2019

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por me guiar e me dar força quando pensei em desistir;

À minha mãe, por me apoiar incondicionalmente nos estudos.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o maior responsável por essa conquista.

Aos meus pais, **Ivaldo** e **Leonice**, pelos valores transmitidos e por sempre me apoiar e incentivar, e especialmente à minha mãe, por vibrar comigo a cada conquista.

Ao meu noivo **Evandro**, por todo o suporte afetivo, paciência e companheirismo durante esses longos anos.

À minha irmã **Andréia**, por cada palavra de carinho e apoio, sempre acreditando em mim.

Aos meus sogros **Francisco** e **Marisa**, por todo apoio e carinho.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, pela amizade e por confiar sempre em mim, compartilhando seus conhecimentos com muito carinho e paciência.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela amizade, apoio, colaboração e ensinamentos transmitidos.

À **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury**, pela amizade, contribuição e ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Kristofer Thurecht**, por me receber e orientar durante o estágio sanduíche e, acima de tudo, pelos ensinamentos que sem dúvida me engrandeceram profissionalmente.

À **Andréia Bagliotti Meneguín**, pela amizade, companheirismo, contribuição e por toda ajuda para a realização de experimentos e discussões para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os **amigos do laboratório de Farmacotécnica**, pela amizade e companheirismo, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente às técnicas de Laboratório **Natália** e **Margarete**, pela amizade e pela ajuda prestada para a realização de meus experimentos.

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

Ao **Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus** e ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)**, pela colaboração e ajuda com as análises celulares e, em especial, à

doutoranda **Raquel Liszbinski** por toda ajuda e amizade durante a realizações dos experimentos.

À equipe da **Seção de Pós-graduação**, em especial à **Cláudia, Aniele e Daniela**, pela atenção, apoio e serviços prestados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado no País (Processo 2016/01464-9) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo 2017/25846-0).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** (Código 001) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros anos do curso de doutorado.

## **EPÍGRAFE**

"A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável"

[Mahatma Gandhi]

## RESUMO

5-fluorouracil (5-FLU) e metotrexato (MTX) são utilizados no tratamento do câncer colorretal (CC), no entanto, sua eficácia clínica é limitada devido à falta de especificidade, levando a efeitos colaterais graves. Neste sentido, nanopartículas (NPs) baseadas em quitosana (QS), encapsuladas com 5-FLU e funcionalizadas com MTX, bem como a incorporação dessas NPs em micropartículas (MPs) de amido resistente e pectina (AR/P) para administração oral foram delineadas visando alcançar a liberação direcionada, e aumentar a concentração local do fármaco no cólon e/ou região tumoral. O método de geleificação ionotrópica utilizando tripolifosfato (TPP) como reticulante foi eficiente na obtenção de NPs de QS/TPP/5-FLU, as quais apresentaram diâmetro médio entre 122,2 a 155,0 nm, com índice de polidispersão (PDI) entre 0,24 e 0,35, valor de potencial zeta (acima de +21 mV) e forma esférica. A eficiência de encapsulação (EE) do 5-FLU nestas NPs variou entre 12,24 a 23,58%, demonstrando que a amostra com maior proporção de QS (4:1:1 QS/TPP/5-FLU) promoveu maior EE. A QS foi conjugada com sucesso ao MTX, e o teor do MTX obtido para as amostras QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3 foi de 16,92, 27,52 e 30,89%, respectivamente. As NPs funcionalizadas com MTX apresentaram diâmetro médio entre 376,4 e 407,8 nm, com valores de PDI entre 0,38 e 0,41 e potencial zeta entre +31,6 e +26,3 mV, demonstrando uma redução na EE do 5-FLU (15,71-18,23%). Ensaios de mucoadesão demonstraram que as NPs de QS/TPP sem e com adição de 5-FLU apresentaram maior capacidade mucoadesiva comparadas as NPs funcionalizadas com MTX, as quais promoveram uma redução nos valores de potencial zeta, indicando uma menor adsorção de mucina à superfície dessas NPs. As NPs de QS/TPP com e sem 5-FLU foram encapsuladas em MPs de AR/P usando o método de geleificação ionotrópica por gotejamento manual e/ou aerossolização, e as MPs carregadas com NPs apresentaram diâmetro médio acima de 800 µm e 10 µm, respectivamente. A forma esférica das MPs e a eficiência de incorporação das NPs nas MPs foram confirmadas em ambos os métodos. Os estudos de liberação *in vitro* do 5-FLU demonstraram que a encapsulação das NPs em MPs de AR/P promoveu um maior controle das taxas de liberação do 5-FLU, com redução significativa em meio ácido (53%). NPs de QS foram marcadas com sucesso usando o fluoróforo Cy5 para sua monitorização usando imagens ópticas multiespectrais em camundongos. Nos ensaios de biodistribuição *in vivo*, as NPs QS-Cy5 apresentaram uma distribuição mais rápida ao longo do trato gastrointestinal (TGI), ou seja, um tempo de trânsito mais curto em comparação com as MPs carregadas com NPs. Além disso, as NPs QS-Cy5 mostraram absorção não específica na corrente sanguínea com acúmulo no rim, enquanto que para as MPs carregadas com NPs não foi observado acúmulo significativo no sangue ou nos principais órgãos, indicando que a encapsulação das NPs em MPs de AR/P resultou em uma maior proteção das NPs ao longo do TGI após a administração oral. Portanto, o conjunto de resultados sugere que as MPs de AR/P são potenciais carreadores para a liberação de NPs carregadas de fármaco ao cólon e este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de sistemas orais para o tratamento do CC.

**Palavras-chave:** Nanopartículas; quitosana; 5-fluorouracil; metotrexato; micropartículas; amido resistente; pectina; liberação cólon-específica; biodistribuição *in vivo*.

## ABSTRACT

5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) has been widely used in the treatment of colorectal cancer (CRC), however, its clinical efficacy is limited due to its lack of specificity, leading to severe side effects. In this sense, chitosan (CS) nanoparticles (NPs) encapsulated with 5-FU and functionalized with MTX, as well as the incorporation of these NPs into resistant starch and pectin (RS/P) microparticles (MPs) for oral administration were designed to achieve targeted release, and to increase local drug concentration in the colon and/or tumor region. Iontropic gelation method using tripolyphosphate (TPP) as a crosslinker was efficient in obtaining CS/TPP/5-FU NPs, with a mean diameter between 122.2 and 155.0 nm, with a polydispersity index (PDI) between 0.24 and 0.35, zeta potential value (above +21 mV) and spherical shape. 5-FU encapsulation efficiency (EE) in these NPs ranged from 12.24 to 23.58%, showing that the sample with a higher proportion of CS (4:1:1 CS/TPP/5-FU) which presented higher EE. CS was successfully labelled to the MTX and MTX content obtained for CS-MTX-1; CS-MTX-2 and CS-MTX-3 samples were 16.92, 27.52 and 30.89%, respectively. NPs functionalized with MTX presented mean diameter between 376.4 and 407.8 nm, with PDI values between 0.38 and 0.41 and zeta potential between +31.6 and +26.3 mV, with a small reduction in the EE of 5-FU (15.71-18.23%). Mucosadhesion studies demonstrated that the CS/TPP NPs with and without 5-FU, presented higher mucoadhesive capacity compared to the NPs functionalized with MTX, which led to the reduction in the zeta potential values, indicating lower adsorption of mucin on the surface of these NPs. CS/TPP NPs with and without 5-FU were encapsulated into RS/P MPs using ionotropic gelation method by manual dripping and/or aerosolization, and MPs loaded with NPs had average diameter above 800  $\mu\text{m}$ , and diameter of 10  $\mu\text{m}$ , respectively. Spherical shape of the MPs and nanoparticle encapsulation efficiency into microparticles were confirmed in both methods. *In vitro* release studies demonstrated that the encapsulation of NPs into RS/P MPs promoted greater control of 5-FU release rates, with a significant reduction in acid media (53%). CS NPs were successfully labelled using Cy5 fluorophore and were monitored using multispectral optical imaging in mouse. *In vivo* biodistribution studies, CS-Cy5 NPs showed a faster clearance in the distribution pattern along the gastrointestinal tract (GIT), i.e., a shorter transit time compared to CS NPs-loaded RS/P microparticles. In addition, CS-Cy5 NPs showed non-specific absorption into the blood-stream with associated kidney accumulation, while for the CS NPs-loaded RS/P microparticles no significant accumulation was observed in blood or major organs, indicating that the encapsulation of NPs into RS/P MPs resulted in higher protection of the NPs along the GIT after oral administration. Therefore, the set of results suggests that RS/P MPs are potential carriers for delivering drug-loaded nanoparticles to the colon and this work will contribute to the development of oral-systems for the treatment of CRC.

**Keywords:** Nanoparticles; chitosan; 5-fluorouracil; methotrexate; resistant starch; pectin; microparticles; colon specific delivery; *in vivo* biodistribution.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estágios de desenvolvimento do câncer colorretal. ....                                                                                            | 25 |
| Figura 2. Estrutura química do 5-fluorouracil. ....                                                                                                         | 27 |
| Figura 3. Estrutura química do MTX (A) e do ácido fólico (B). ....                                                                                          | 29 |
| Figura 4. Representação esquemática da nanocápsula e nanoesfera. ....                                                                                       | 31 |
| Figura 5. Representação esquemática dos diferentes tipos de ligantes utilizados na funcionalização de nanopartículas. ....                                  | 32 |
| Figura 6. Estrutura molecular da quitosana. ....                                                                                                            | 33 |
| Figura 7. Estrutura linear da amilose (a) e ramificada da amilopectina (b). ....                                                                            | 34 |
| Figura 8. Estrutura da pectina. ....                                                                                                                        | 36 |
| Figura 9. Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas pelo método de geleificação ionotrópica. ....                                | 46 |
| Figura 10. Representação esquemática do processo de funcionalização da QS com MTX: a) síntese do MTX ativado; b) síntese do acoplamento da QS com MTX. .... | 50 |
| Figura 11. Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P. ....                                                           | 56 |
| Figura 12. Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da quitosana com Cy5. ....                                        | 59 |
| Figura 13. Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da blenda de AR/P com o corante Rodamina-NH <sub>2</sub> . ....   | 60 |
| Figura 14. Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P usando o método de aerossolização. ....                         | 62 |
| Figura 15. Espectro de absorção do 5-FLU em meio aquoso. ....                                                                                               | 65 |
| Figura 16. Curva analítica do 5-FLU obtido por espectrofotometria UV-vis. ....                                                                              | 66 |
| Figura 17. Espectros de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU. ....                                                                                       | 68 |
| Figura 18. Cromatogramas do MTX, 5-FLU e MTX+5-FLU (25 µg.mL <sup>-1</sup> ) obtidos em fase móvel tampão acetato de amônio e metanol (70:30). ....         | 69 |
| Figura 19. Curva analítica do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE. ....                                                                                      | 71 |
| Figura 20. Cromatograma do sobrenadante das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP). ....                                                                     | 74 |
| Figura 21. Cromatogramas das soluções de 5-FLU em: (A) HCl/KCl pH 1,2, (B) tampão fosfato pH 6,8 e (C) tampão fosfato pH 7,4. ....                          | 74 |
| Figura 22. Gráfico de Debye. ....                                                                                                                           | 75 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 23. Influência do potencial zeta em função do pH do 5-fluorouracil, quitosana e tripolifosfato de sódio.....                                                                                                                                                                | 77  |
| Figura 24. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas sem fármaco na proporção 4:1 QS/TPP (aumento de 50.000x). ....                                                                                                                                                  | 90  |
| Figura 25. Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas com fármaco na proporção 4:1:1 QS/TPP/5-FLU (aumento de 60.000x). ....                                                                                                                                          | 90  |
| Figura 26. Distribuição de tamanho das nanopartículas sem e com adição de 5-FLU...                                                                                                                                                                                                 | 91  |
| Figura 27. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do MTX, QS e QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3). ....                                                                                                                                           | 95  |
| Figura 28. Espectros ampliados na região de 1800 a 850 $\text{cm}^{-1}$ do infravermelho da QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3). ....                                                                                                                             | 96  |
| Figura 29. Espectro de RMN $^1\text{H}$ das amostras (a) QS, (b) QS-MTX-1, (c) QS-MTX-2, (d) QS-MTX-3 (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ ) e (e) MTX (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ).....                                                                                     | 97  |
| Figura 30. Curvas de DSC do MTX (a), QS-MTX-1 (b), QS-MTX-2 (c), QS-MTX-3 (d) e da QS (e). ....                                                                                                                                                                                    | 99  |
| Figura 31. Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS (A) e MTX (B). ....                                                                                                                                                                           | 100 |
| Figura 32. Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS-MTX conjugados, QS-MTX-1 (C), QS-MTX-2 (D) e QS-MTX-3 (E).....                                                                                                                                | 101 |
| Figura 33. Nanopartículas obtidas usando QS funcionalizada com MTX (A) e nanopartículas obtidas usando mistura de QS não funcionalizada e QS funcionalizada com MTX (B). ....                                                                                                      | 102 |
| Figura 34. Influência da adição de dispersões de mucina, em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no potencial zeta das nanopartículas (média $\pm$ DP, $n = 3$ ). ....                                                                             | 104 |
| Figura 35. Fotomicrografias representativa obtidas por MEV-FEG da superfície e corte transversal das micropartículas sem nanopartículas (a), micropartículas carregadas com nanopartículas nas proporções NP:AR/P 1:1 (b), 1:2 (c) e 1:4 (d).....                                  | 109 |
| Figura 36. Perfis de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU) em comparação com o fármaco livre em meios ácido HCl/KCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 7,4..... | 111 |
| Figura 37. Espectro de absorção da quitosana e quitosana marcada com Cy5 na região do UV. ....                                                                                                                                                                                     | 116 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 38. Espectro de absorção do amido resistente/pectina e do amido resistente/pectina marcado com rodamina na região do UV. ....                                                                                                                                                                       | 117 |
| Figura 39. Espectro de absorção do amido resistente/pectina e amido resistente/pectina marcado com o corante BDP na região do UV. ....                                                                                                                                                                     | 118 |
| Figura 40. Distribuição de tamanho das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) preparadas usando o método de aerossolização. ....                                                                                                                                     | 119 |
| Figura 41. Os corantes BDP-NH <sub>2</sub> e Rodamina-NH <sub>2</sub> no sobrenadante da solução de cloreto de alumínio e cloreto de cálcio, respectivamente, após a formação das micropartículas de AR/P.....                                                                                             | 120 |
| Figura 42. Imagem confocal: (A) micropartícula de AR/P; (B) micropartícula de AR/P carregada com nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha); (C) nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha). ....                                                                                                    | 121 |
| Figura 43. Imagem representativa da posição dos principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e do TGI mostrado na Figura 44 e 45. ....                                                                                                                                                          | 123 |
| Figura 44. Biodistribuição <i>in vivo</i> das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após a administração oral e os animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa). ....                                                        | 124 |
| Figura 45. Biodistribuição <i>in vivo</i> das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após administração oral e animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa).....                       | 126 |
| Figura 46. Intensidade de fluorescência das nanopartículas QS/TPP e das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas QS/TPP (sinal Cy5) em vários tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) nos principais órgãos (sangue, rim, fígado, baço, pulmão e coração), determinada usando análise de ROI (p <0,05)..... | 127 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Parâmetros cromatográficos empregados na metodologia analítica.....                                                                                                                         | 43 |
| Tabela 2. Síntese do acoplamento da quitosana com metotrexato ativado em diferentes graus de funcionalização. ....                                                                                    | 51 |
| Tabela 3. Dados de precisão intracorrida e intercorrida do 5-FLU. ....                                                                                                                                | 66 |
| Tabela 4. Resultados obtidos para a exatidão.....                                                                                                                                                     | 67 |
| Tabela 5. Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do MTX.....                                                                                              | 70 |
| Tabela 6. Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do 5-FLU.....                                                                                            | 70 |
| Tabela 7. Dados das curvas analíticas obtidas por CLAE.....                                                                                                                                           | 71 |
| Tabela 8. Dados de precisão intracorrida e intercorrida do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE. ....                                                                                                   | 72 |
| Tabela 9. Resultados obtidos para a exatidão do método analítico para quantificação do MTX e 5-FLU.....                                                                                               | 73 |
| Tabela 10. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do MTX e 5-FLU por CLAE. ....                                                                                                       | 73 |
| Tabela 11. Avaliação da influência da variação de massa de quitosana no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco. ....               | 78 |
| Tabela 12. Avaliação da influência da variação de massa de TPP no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco. ....                     | 79 |
| Tabela 13. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3). ....                              | 81 |
| Tabela 14. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 5,5 (média $\pm$ DP, n = 3). ....                              | 83 |
| Tabela 15. Avaliação da eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 e 5,5, utilizando os métodos de ultracentrifugação e filtração-centrifugação (média $\pm$ DP, n = 3). .... | 85 |
| Tabela 16. Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas usando NaCl 0,1 M em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3). ....                                    | 86 |

|                                                                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 17. Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....                                                                       | 87  |
| Tabela 18. Efeito do aumento do tempo de interação do 5-FLU com a quitosana na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....                                             | 88  |
| Tabela 19. Efeito do pH da solução 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média $\pm$ DP, n = 3).....                                                                                | 89  |
| Tabela 20. Potencial zeta do MTX, QS, QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) (média $\pm$ DP).....                                                                                                              | 93  |
| Tabela 21. Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EE% das nanopartículas preparadas utilizando QS-MTX conjugados.....                                                                                                       | 103 |
| Tabela 22. Rendimento (%) do processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas com diferentes proporções de AR/P.....                                                                                 | 106 |
| Tabela 23. Eficiência de encapsulação das nanopartículas nas micropartículas preparadas com diferentes proporções de AR/P.....                                                                                             | 107 |
| Tabela 24. Percentual de 5-FLU liberado em meio ácido pH 1,2 (15 e 120 min) e tampão fosfato pH 7,4 (30 e 240 min).....                                                                                                    | 111 |
| Tabela 25. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU)..... | 113 |

## **LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CC:** Câncer colorretal

**QS:** Quitosana

**5-FLU:** 5-fluorouracil

**MTX:** Metotrexato

**TPP:** Tripolifosfato

**AA:** Alta amilose

**AR:** Amido resistente 3

**P:** Pectina

**TGI:** Trato gastrointestinal

**NPs:** Nanopartículas poliméricas

**MPs:** Micropartículas poliméricas

**IV:** Infravermelho

**A2:** Segundo coeficiente virial

**PDI:** Índice de polidispersão

**EE%:** Porcentagem de eficiência de encapsulação

**tR:** Tempo de retenção

**LQ:** Limite de quantificação

**LD:** Limite de detecção

**DPR%:** Desvio padrão relativo em porcentagem

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência

**DLS:** Espalhamento de luz dinâmica (*dynamic light scattering*)

**MEV:** Microscopia eletrônica de varredura

**DSC:** Calorimetria exploratória diferencial (*differential scanning calorimeter*)

**DTG:** Termogravimetria Derivada

## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....                                                                                                              | 20 |
| 2     | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                                                                                   | 24 |
| 2.1   | Câncer colorretal .....                                                                                                       | 24 |
| 2.2   | 5-fluorouracil .....                                                                                                          | 27 |
| 2.3   | Metotrexato .....                                                                                                             | 28 |
| 2.4   | Nanopartículas poliméricas.....                                                                                               | 30 |
| 2.5   | Polímeros naturais.....                                                                                                       | 32 |
| 2.5.1 | Quitosana .....                                                                                                               | 32 |
| 2.5.2 | Amido resistente .....                                                                                                        | 34 |
| 2.5.3 | Pectina .....                                                                                                                 | 35 |
| 3     | OBJETIVO.....                                                                                                                 | 39 |
| 3.1   | Etapas para alcançar o objetivo proposto .....                                                                                | 39 |
| 4     | MATERIAL E MÉTODO.....                                                                                                        | 40 |
| 4.1   | Materiais .....                                                                                                               | 40 |
| 4.2   | Principais equipamentos .....                                                                                                 | 40 |
| 5     | MÉTODOS.....                                                                                                                  | 40 |
| 5.1   | Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta .....         | 40 |
| 5.1.1 | Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis ..                                                          | 41 |
| 5.1.2 | Linearidade .....                                                                                                             | 41 |
| 5.1.3 | Precisão.....                                                                                                                 | 41 |
| 5.1.4 | Exatidão .....                                                                                                                | 41 |
| 5.1.5 | Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....                                                                  | 42 |
| 5.2   | Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... | 42 |
| 5.2.1 | Conformidade do sistema cromatográfico.....                                                                                   | 43 |
| 5.2.2 | Linearidade .....                                                                                                             | 44 |
| 5.2.3 | Precisão.....                                                                                                                 | 44 |
| 5.2.4 | Exatidão .....                                                                                                                | 44 |
| 5.2.5 | Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....                                                                  | 44 |
| 5.2.6 | Especificidade/Seletividade.....                                                                                              | 44 |
| 5.3   | Caracterização do polímero Quitosana .....                                                                                    | 45 |
| 5.3.1 | Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial ( $A_2$ ).....                                                       | 45 |

|         |                                                                                                               |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4     | Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas .....                                      | 45 |
| 5.4.1   | Análise do potencial zeta em função do pH .....                                                               | 45 |
| 5.5     | Preparo das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                                                              | 46 |
| 5.6     | Caracterização físico-química das nanopartículas QS/TPP/5-FLU .....                                           | 47 |
| 5.6.1   | Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI) .....                                            | 47 |
| 5.6.2   | Análise do potencial zeta .....                                                                               | 47 |
| 5.6.3   | Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                        | 47 |
| 5.6.3.1 | Estudos para otimizar a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....             | 48 |
| 5.6.4   | Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                                                | 49 |
| 5.7     | Síntese da quitosana funcionalizada com metotrexato .....                                                     | 49 |
| 5.7.1   | Síntese do MTX com N-hidroxisuccinimida (NHS) e N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) .....                     | 50 |
| 5.7.2   | Síntese de acoplamento da QS com MTX ativado .....                                                            | 51 |
| 5.8     | Caracterização da síntese quitosana funcionalizada com metotrexato .....                                      | 51 |
| 5.8.1   | Determinação do rendimento bruto da síntese de acoplamento QS-MTX .....                                       | 52 |
| 5.8.2   | Determinação da faixa de fusão .....                                                                          | 52 |
| 5.8.3   | Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX .....                                                       | 52 |
| 5.8.4   | Análise do potencial zeta QS-MTX conjugados .....                                                             | 52 |
| 5.8.5   | Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) .....                                              | 53 |
| 5.8.6   | Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....                                                                     | 53 |
| 5.8.7   | DSC .....                                                                                                     | 53 |
| 5.8.8   | TG/DTG .....                                                                                                  | 53 |
| 5.9     | Desenvolvimento das nanopartículas funcionalizadas com MTX .....                                              | 54 |
| 5.10    | Caracterização físico-química das nanopartículas funcionalizadas com MTX .....                                | 54 |
| 5.10.1  | Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI) .....                                            | 54 |
| 5.10.2  | Análise do potencial zeta .....                                                                               | 54 |
| 5.10.3  | Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) .....                                                           | 54 |
| 5.11    | Estudo das propriedades mucoadesivas .....                                                                    | 55 |
| 5.11.1  | Estudo in vitro de interação entre mucina e nanopartículas .....                                              | 55 |
| 5.12    | Desenvolvimento das nanopartículas incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina ..... | 55 |
| 5.12.1  | Preparo da dispersão de amido resistente e pectina para obtenção das micropartículas .....                    | 55 |

|        |                                                                                                                                                                |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.12.2 | Desenvolvimento das micropartículas carregadas com nanopartículas ...                                                                                          | 56 |
| 5.12.3 | Rendimento (%).....                                                                                                                                            | 56 |
| 5.12.4 | Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas.....                                                                            | 57 |
| 5.12.5 | Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (FEG-MEV) .....                                                                        | 57 |
| 5.13   | Estudo de dissolução do 5-FLU .....                                                                                                                            | 57 |
| 5.13.1 | Estudo de solubilidade do 5-FLU .....                                                                                                                          | 57 |
| 5.13.2 | Determinação do perfil de liberação in vitro do 5-FLU .....                                                                                                    | 58 |
| 5.13.3 | Análise dos mecanismos de liberação in vitro do 5-FLU.....                                                                                                     | 58 |
| 5.14   | Estudos de biodistribuição <i>in vivo</i> por imagem óptica de pequenos animais..                                                                              | 58 |
| 5.15   | Síntese de marcação da quitosana com Cy5 .....                                                                                                                 | 59 |
| 5.16   | Síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH <sub>2</sub> .....                                                                                       | 60 |
| 5.17   | Síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH <sub>2</sub> .....                                                                                            | 61 |
| 5.18   | Preparo das nanopartículas .....                                                                                                                               | 61 |
| 5.19   | Preparo das micropartículas carregadas com nanopartículas.....                                                                                                 | 61 |
| 5.19.1 | Determinação do tamanho das micropartículas.....                                                                                                               | 62 |
| 5.19.2 | Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas.....                                                                            | 62 |
| 5.19.3 | Imagem confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas....                                                                                          | 62 |
| 5.19.4 | Avaliação da biodistribuição in vivo das nanopartículas e das micropartículas carregadas com nanopartículas através de imagem óptica de pequenos animais ..... | 63 |
| 5.19.5 | Protocolo de aquisição de imagem .....                                                                                                                         | 63 |
| 5.20   | Análise estatística .....                                                                                                                                      | 64 |
| 6      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                                   | 65 |
| 6.1    | Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta .....                                          | 65 |
| 6.1.1  | Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis .                                                                                            | 65 |
| 6.1.2  | Linearidade .....                                                                                                                                              | 65 |
| 6.1.3  | Precisão.....                                                                                                                                                  | 66 |
| 6.1.4  | Exatidão.....                                                                                                                                                  | 66 |
| 6.1.5  | Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....                                                                                                   | 67 |
| 6.2    | Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....                                  | 67 |

|         |                                                                                                                      |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.2.1   | Determinação do espectro de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU em fase móvel.....                               | 67 |
| 6.2.2   | Conformidade do sistema cromatográfico.....                                                                          | 68 |
| 6.2.3   | Linearidade .....                                                                                                    | 70 |
| 6.2.4   | Precisão.....                                                                                                        | 71 |
| 6.2.5   | Exatidão .....                                                                                                       | 72 |
| 6.2.6   | Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....                                                         | 73 |
| 6.2.7   | Especificidade/Seletividade.....                                                                                     | 73 |
| 6.3     | Caracterização do polímero Quitosana .....                                                                           | 74 |
| 6.3.1   | Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial ( $A_2$ ).....                                              | 75 |
| 6.4     | Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas .....                                             | 76 |
| 6.4.1   | Análise do potencial zeta em função do pH .....                                                                      | 76 |
| 6.5     | Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                                            | 78 |
| 6.6     | Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                               | 84 |
| 6.6.1   | Otimização da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU.....                               | 85 |
| 6.6.1.1 | 1. Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU.....                                     | 86 |
| 6.6.1.2 | 2. Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação.....                                         | 87 |
| 6.6.1.3 | 3. Efeito do aumento do tempo de interação entre o fármaco e a quitosana na eficiência de encapsulação do 5-FLU..... | 88 |
| 6.6.1.4 | 4. Efeito do pH da solução de 5-FLU na eficiência de encapsulação...                                                 | 88 |
| 6.7     | Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU .....                                                       | 90 |
| 6.8     | Caracterização da síntese da quitosana funcionalizada com MTX.....                                                   | 92 |
| 6.8.1   | Determinação do rendimento bruto da síntese de conjugação QS-MTX .                                                   | 92 |
| 6.8.2   | Determinação da faixa de fusão.....                                                                                  | 92 |
| 6.8.3   | Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX .....                                                              | 92 |
| 6.8.4   | Análise do potencial zeta da QS-MTX conjugados.....                                                                  | 93 |
| 6.8.5   | Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....                                                      | 93 |
| 6.8.6   | Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....                                                                             | 96 |
| 6.8.7   | DSC .....                                                                                                            | 98 |
| 6.8.8   | TG/DTG .....                                                                                                         | 99 |

|        |                                                                                                                                                           |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.9    | Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas funcionalizadas com MTX.....                                                                          | 101 |
| 6.10   | Estudo das propriedades mucoadesivas .....                                                                                                                | 103 |
| 6.10.1 | Estudo <i>in vitro</i> de interação entre mucina e nanopartículas .....                                                                                   | 103 |
| 6.11   | Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas .....                                                                  | 106 |
| 6.11.1 | Rendimento (%).....                                                                                                                                       | 106 |
| 6.11.2 | Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas .....                                                                      | 106 |
| 6.11.3 | Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (MEV-FEG) .....                                                                   | 107 |
| 6.12   | Estudos de dissolução do 5-FLU .....                                                                                                                      | 109 |
| 6.12.1 | Estudo de solubilidade do 5-FLU .....                                                                                                                     | 110 |
| 6.12.2 | Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU .....                                                                                        | 110 |
| 6.12.3 | Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> do 5-FLU.....                                                                                         | 112 |
| 6.13   | Estudos de biodistribuição <i>in vivo</i> por imagem óptica de pequenos animais                                                                           | 115 |
| 6.13.1 | Caracterização da síntese de marcação da quitosana com Cy5 .....                                                                                          | 115 |
| 6.13.2 | Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH <sub>2</sub> .....                                                                | 116 |
| 6.13.3 | Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH <sub>2</sub> .....                                                                     | 117 |
| 6.13.4 | Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas usando o método de aerossolização .....                                | 118 |
| 6.13.5 | Microscopia confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas.....                                                                               | 121 |
| 6.13.6 | Avaliação da biodistribuição <i>in vivo</i> de nanopartículas e micropartículas carregadas com nanopartículas por imagem óptica de pequenos animais ..... | 122 |
| 7      | CONCLUSÕES.....                                                                                                                                           | 129 |
| 8      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                          | 131 |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CC) é a terceira maior incidência mundial e a quarta principal causa de mortalidade relacionada ao câncer entre homens e mulheres, sendo que está previsto mais de 2,2 milhões de novos casos até 2030, destacando a necessidade de novas alternativas para o tratamento desta patologia (SADREDDINI et al., 2017; SOCIETY, 2018).

O tratamento do CC depende principalmente do estágio de desenvolvimento da doença, bem como da localização do tumor. Várias abordagens têm sido utilizadas, incluindo ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia; além disso, as combinações de dois ou mais tratamentos são frequentemente utilizados (CHANDRAN et al., 2017; ESTANQUEIRO et al., 2015).

Apesar de eficiente na inibição do crescimento celular, a quimioterapia intravenosa é frequentemente ineficaz na prevenção da recorrência e progressão do câncer em pacientes. Isso se deve principalmente à falta de especificidade/seletividade de fármacos quimioterápicos em células tumorais, no qual na maioria das vezes esses fármacos não conseguem atingir os locais alvo (especialmente os tumores na região colorretal) em concentrações terapêuticas adequadas. Desta forma, apenas uma pequena fração do fármaco administrado atinge o local de ação, enquanto o restante é distribuído em órgãos e tecidos saudáveis. Esta liberação não direcionada dos fármacos citotóxicos resulta no agravamento da toxicidade e o surgimento de efeitos colaterais graves (ESTANQUEIRO et al., 2015; SADREDDINI et al., 2017). Além disso, outro grande problema da quimioterapia convencional é a predisposição das células tumorais a se tornarem resistentes aos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos (MATOS et al., 2019).

A via oral representa uma alternativa promissora no tratamento do CC, já que entre as vias de administração de fármacos, ela é considerada segura, não invasiva, que possibilita a auto-administração e flexibilidade na dosagem, fatores que contribuem para uma maior aceitação e adesão do paciente (ISHA et al., 2012; ALEXANDER, 2009; PINTO, 2010). No entanto, a vetorização de fármacos através da via oral representa um grande desafio, uma vez que existem diversas barreiras ao longo do trato gastrointestinal (TGI) a serem superadas para que o fármaco alcance o local desejado. Neste sentido, a liberação sítio específica de fármacos representa uma alternativa racional para a vetorização desses agentes terapêuticos para os sítios alvos.

Tendo em vista as limitações da terapia convencional do CC, a nanotecnologia farmacêutica é uma importante ferramenta tecnológica para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos visando a vetorização desses agentes antineoplásicos para os sítios alvos.

As nanopartículas permitem o encapsulamento de fármacos com baixa estabilidade, protegendo-os contra a degradação, promovendo a modulação das taxas de liberação do fármaco e/ou o seu direcionamento para órgãos ou tecidos específicos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; HUA et al., 2015). Estudos demonstraram a atividade antitumoral de nanopartículas no tratamento do CC, bem como sua seletividade para as células tumorais (CHENG et al., 2019; GU et al., 2019).

Adicionalmente, o tamanho reduzido das nanopartículas e a possibilidade de associação de fármacos/moléculas à sua superfície são importantes propriedades que contribuem para seu uso na terapia do CC. Assim, a utilização de ligantes na superfície de sistemas nanoestruturados representa uma estratégia promissora, que possibilitará o direcionamento de partículas para as células tumorais, maximizando sua interação celular, bem como levando à uma maior seletividade e consequentemente redução dos efeitos adversos/tóxicos (ASHWANIKUMAR et al., 2014; WANG et al., 2015). Estudos recentes têm demonstrado a capacidade do metotrexato (MTX) direcionar/vetorizar nanoestruturas através dos receptores de folato (KAR et al., 2019; SARGAZI et al., 2018).

Outra importante propriedade que as nanopartículas poliméricas podem apresentar é a mucoadesão, pois essa característica pode prolongar o tempo de permanência do sistema no local alvo, favorecendo a interação com a membrana biológica e, conseqüentemente, promovendo um aumento da concentração do fármaco no local de ação (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; ENSIGN; CONE; HANES, 2012). Entre os inúmeros polímeros utilizados para essa finalidade, a quitosana (QS) têm-se destacado por ser um polissacarídeo catiônico biocompatível e biodegradável, que oferece notáveis propriedades biológicas aos sistemas de liberação de fármacos.

Devido à presença de cargas superficiais positivas, a QS favorece a adesão à camada de muco do intestino através de interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina, melhorando a interação biológica do sistema (RINAUDO, 2011; WOODLEY, 2001). A habilidade da QS se reticular inter e intramolecularmente quando em contato com poliânions têm sido explorada para a obtenção de NPs através do

processo de geleificação ionotrópica, o qual é um processo quimicamente verde e livre de solvente orgânico (CALVO et al., 1997; FAN et al., 2012).

A performance das nanopartículas pode ser ainda melhorada, através da encapsulação das nanopartículas em sistemas de liberação específicos ao cólon por administração oral, o que deve permitir a vetorização direcionada de quimioterápicos ao cólon, favorecendo o aumento do efeito terapêutico, e minimizando a dose administrada e os efeitos colaterais associados (MA et al., 2015).

O desenvolvimento de sistemas orais visando a liberação cólon-específica de fármacos pode ser baseado em materiais que são especificamente degradados por enzimas produzidas por bactérias colônicas. O amido resistente (AR) é uma fração de amido hidrotermicamente modificada que resiste à digestão no estômago e no intestino delgado, devido à sua estrutura tridimensional mais organizada e empacotada o que dificulta o acesso das enzimas proteolíticas às ligações glicosídicas (MENEGUIN et al., 2018; YOON; LEE; LIM, 2009). Da mesma forma, a pectina (P) é outro polissacarídeo adequado para direcionar fármacos ao cólon, uma vez que é resistente à digestão de amilases e proteases, permanecendo como agregados macromoleculares nas porções superiores do TGI (LIU et al., 2003; MENEGUIN et al., 2018).

Dentre os antineoplásicos utilizados para o tratamento do CC, os mais utilizados na terapia isolada ou combinada com cirurgia e/ou radioterapia são leucovorina, irinotecano, 5-fluorouracil (5-FLU) e MTX (SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004). O 5-FLU é um análogo da pirimidina pertencente à classe dos antimetabólitos, sendo considerado um dos quimioterápicos de primeira linha no tratamento do CC. No entanto, o rápido catabolismo (cerca de 80%) pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) limita a eficácia terapêutica do 5-FLU. Além disso, o 5-FLU é caracterizado por ação não seletiva contra o epitélio do trato gastrointestinal, meia-vida curta na circulação plasmática (10-15 min) e distúrbios da medula óssea (ASHWANIKUMAR et al., 2014; BLANCO et al., 2011).

Diante do comportamento agressivo do CC, está cada vez mais evidente que a terapia combinada pode proporcionar efeitos mais significativos do que o uso dos agentes antineoplásicos individualizados, resultando na melhoria das taxas de resposta e na sobrevida dos pacientes (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LI et al., 2011). A eficácia do 5-FLU na terapia de CC pode ser consideravelmente aumentada quando utilizado em combinação com o MTX, sendo bem reconhecido na quimioterapia contra

o câncer utilizando agentes antineoplásicos sinérgicos (ASHWANIKUMAR et al., 2014).

O MTX é um antagonista do ácido fólico, amplamente utilizado no tratamento de vários tumores sólidos, incluindo câncer de mama e colorretal. Além da sua eficiência na terapia do CC, o MTX apresenta semelhança estrutural com o ácido fólico, o que permite se ligar ao transportador de folato e ser internalizado pelas células cancerígenas devido à alta expressão de receptores de folato na superfície das células cancerosas (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LI et al., 2014; WANG et al., 2015). Contudo, sua elevada citotoxicidade e baixa seletividade são responsáveis por uma série de efeitos adversos (ASHWANIKUMAR et al., 2014).

Com base nos fatos expostos, o desenvolvimento de nanopartículas de QS carregadas com 5-FLU, funcionalizadas com MTX e incorporadas em micropartículas de AR/P para administração oral, representa uma potencial estratégia para a vetorização direcionada ao cólon, levando ao aumento da atividade antitumoral e, consequentemente, o aumento da eficácia terapêutica no tratamento do CC.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Câncer colorretal

O câncer ainda é um grande desafio para a ciência e para a medicina, devido à sua grande diversidade e muitos de seus mecanismos ainda não terem sido elucidados (BRAY et al., 2018). É caracterizado por mutações no material genético das células, resultando no seu crescimento desordenado e incontrolável, originando o tumor (KOZOVSKA; GABRISOVA; KUCEROVA, 2014). Adicionalmente, essas células podem se espalhar, invadindo outras regiões do corpo, desenvolvendo as metástases (STEIN; PARDEE, 2004).

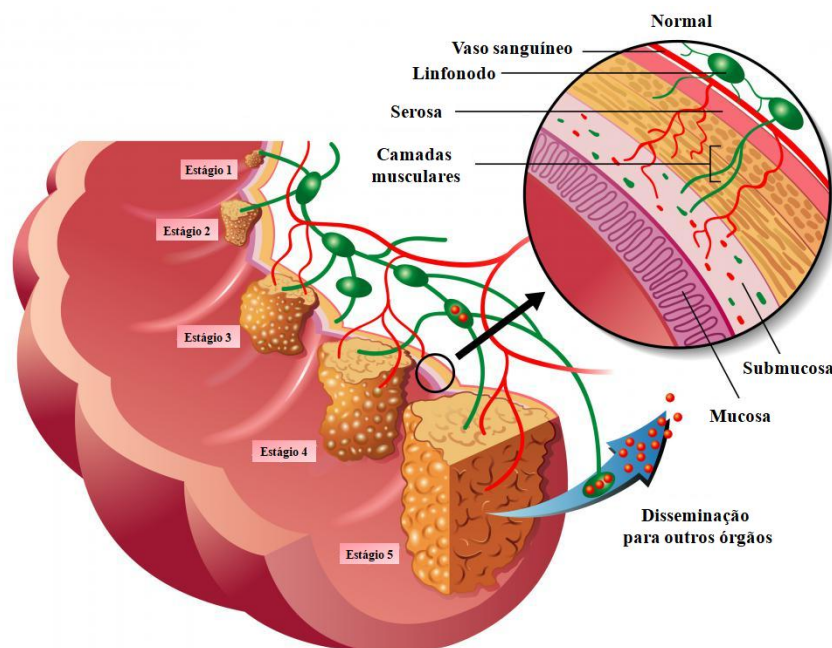
O câncer colorretal (CC), doença que acomete o cólon e o reto, é uma das neoplasias que mais atinge a população mundial, sendo considerado o terceiro tipo de tumor comumente diagnosticado, e sua incidência aumentará para mais de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes por câncer até 2030 (SOCIETY, 2018; SADREDDINI et al., 2017). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se cerca de 17.380 novos casos em homens e 18.980 em mulheres de câncer de cólon e reto para o biênio de 2018/2019 (INCA, 2019).

Essa patologia, na maioria das vezes, se dá de forma invasiva e a probabilidade de sobrevivência está fortemente relacionada ao estágio da doença no momento do diagnóstico. Seu aparecimento pode estar relacionado com a hereditariedade, hábitos e estilo de vida, como consumo de excessivo de carnes vermelhas, dieta deficiente em fibras, alimentos processados, tabagismo, sedentarismo, etc. Além disso, este fator de risco é aumentado com as doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (TGI), como doença de Crohn e retocolite ulcerativa (SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

O CC desenvolve-se a partir do crescimento de estruturas denominadas adenomas benignos (pólipos) no epitélio de revestimento intestinal, que podem evoluir para adenocarcinomas e alcançar as camadas musculares e atravessar a parede intestinal, ocorrendo em cinco estágios bem definidos, como pode ser observado na Figura 1. (SOCIETY, 2018; MISHRA et al., 2013).

**Figura 1.** Estágios de desenvolvimento do câncer colorretal.

Fonte: Adaptado de <tenderness.co>



O estágio inicial do CC (estágio 0), é caracterizado pela formação do pólipo no revestimento do área do cólon ou reto. A remoção cirúrgica de pólipos neste estágio diminui a chance de progressão do câncer em um estágio posterior. No entanto, as chances de diagnóstico nesta fase são baixas, uma vez que nesta fase a doença é assintomática. No estágio I, os pólipos começam a crescer na camada interna cólon e reto. O estágio II pode ser descrito como o crescimento do tumor nas paredes e nas proximidades dos tecidos, mas não nos gânglios linfáticos. Quando a progressão do tumor pode ser detectada em distantes órgãos, é chamado de estágio III. E na última etapa do CC, estágio IV, ocorre a disseminação do tumor para órgãos distantes, como cérebro, fígado, pulmões, revestimento da cavidade abdominal e linfonodos (MISHRA et al., 2013; PERICÀS; CORREDOIRA; MIRÓ MEDA, 2016).

Resumidamente, o desenvolvimento desordenado das células tumorais resulta na hipóxia do tecido tumoral ativando o processo angiogênico, que envolve a superexpressão de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) através da proliferação das células endoteliais e pelo aumento do efeito de permeabilidade e retenção (EPR - *Enhanced Permeability and Retention*) (FERRARA, 2004; WEHLAND et al., 2013). O efeito de EPR, provoca a hipervascularização do tecido tumoral (ASLAN et al., 2013; SINHA et al., 2006).

Os vasos sanguíneos encontrados em tumores sólidos apresentam características fisiológicas e morfológicas distintas do tecido vascular normal, como arranjos irregulares dos vasos, caracterizado por excessivas curvas nas junções entre arteríolas e veias em relação ao tecido normal (UPRETI; JYOTI; SETHI, 2013). A ligação do VEGF aos receptores das células endoteliais dos vasos pré-existentes promove a produção de óxido nítrico, responsável pela dilatação dos vasos e diminuição da resistência vascular. Assim, a estrutura dos vasos apresenta ramificações com espaços intercelulares maiores e poros na sua superfície, garantindo o suprimento nutricional e de oxigênio ao tumor (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011).

As propriedades de permeação e retenção aumentadas durante o processo angiogênico podem ser exploradas para otimizar a distribuição do fármaco nos espaços intersticiais. Isso porque o aumento de permeabilidade microvascular, bem como o aumento de pressão intersticial e ausência de sistema linfático contribuem para que sistemas nanoestruturados se acumulem no tecido tumoral (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2012).

O tratamento atual do CC depende principalmente do estágio de desenvolvimento do câncer, bem como a localização do tumor. Várias abordagens têm sido utilizadas na terapia do CC, incluindo ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Além disso, as combinações de dois ou mais tratamentos são freqüentemente utilizadas para alcançar um melhor resultado (CHANDRAN et al., 2017; ESTANQUEIRO et al., 2015). Dentre os quimioterápicos clássicos utilizados para o tratamento convencional do CC, destacam-se o 5-fluorouracil (5-FLU) e o metotrexato (MTX) que pertencem a subclasse dos ciclo-específico e ciclo-fase específico (SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

A administração desses fármacos por via intravenosa apresenta inúmeras limitações principalmente relacionadas ao fato de que altas doses precisam ser administradas para obtenção de uma concentração eficaz no tumor, ocasionando diversos efeitos adversos relacionados à acumulação não específica em tecidos e órgãos saudáveis. Além disso, à falta de especificidade/seletividade dos quimioterápicos para as células tumorais pode levar à recorrência do câncer e/ou acelerar a progressão do câncer para fases posteriores, reduzindo assim a expectativa de vida dos pacientes (ESTANQUEIRO et al., 2015; SADREDDINI et al., 2017).

Tendo em vista as inúmeras limitações da quimioterapia por via intravenosa inerentes à falta de especificidade e resistência dos quimioterápicos, destaca-se a

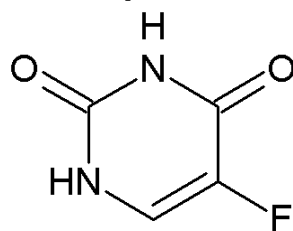
necessidade do desenvolvimento de estratégias que permitam a vetorização de fármacos para o tecido tumoral visando a otimização da eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais.

## 2.2 5-fluorouracil

O 5-fluorouracil (5-FLU) foi sintetizado na década de 1950 e classificado como antimetabólico e análogo das pirimidinas (Figura 2). É um dos antineoplásicos mais eficazes na terapia do CC, sendo considerado um fármaco específico da fase S (síntese de DNA) do ciclo celular.

Seu mecanismo de ação compreende a conversão intracelularmente do 5-FLU no metabólito ativo monofosfato de 5-fluoroxiuridina (F-UMP), que incorporado no RNA no lugar da uracila, inibe o processamento do RNA, resultando no desequilíbrio ou inibição da proliferação celular e na morte das células tumorais. Outro metabólito ativo nas células é o 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-monofosfato (F-dUMP) que inibe a enzima timidilato sintetase, levando a redução de trifosfato de timidina, interferindo na síntese de DNA (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

**Figura 2.** Estrutura química do 5-fluorouracil.



No entanto, o 5-FLU sofre metabolismo principalmente hepático pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD) (cerca de 80%), limitando sua eficácia terapêutica. A concentração sanguínea do 5-FLU após administração intravenosa reduz rapidamente e sua meia-vida no plasma é normalmente 10-15 min. Além disso, o 5-FLU apresenta absorção oral deficiente devido à degradação nas porções superiores do TGI e rápida metabolização pré-sistêmica (ASHWANIKUMAR et al., 2014; BLANCO et al., 2011; LI et al., 2014; TUMMALA; SATISH KUMAR; PRAKASH, 2015).

Efeitos colaterais associados à sua atividade não específica e distúrbios da medula óssea também têm sido observados (ASHWANIKUMAR et al., 2014; BLANCO et al., 2011).

Desta forma, várias estratégias foram desenvolvidas para aumentar a atividade do 5-FLU na terapia do CC, diminuindo sua degradação pela enzima DPD. Um exemplo disso é o uso de terapias combinadas com outros fármacos ou pró-fármacos, que evitam a degradação mediada por DPD no fígado ou a co-administração com inibidor de DPD ou substratos, ou através da estabilização da ligação de seus metabólitos à enzimas alvo. A leucovorina é frequentemente administrada em combinação com 5-FLU no tratamento do CC, por ser um metabólito de ácido fólico que aumenta a atividade do 5-FLU estabilizando a ligação dos seus metabólitos a enzima DPD. O 5-FLU tem sua eficiência significativamente aumentada quando utilizado em combinação com o MTX, uma vez que o MTX é um inibidor de DPD, aumentando assim a conversão de 5-FLU em seu metabólito ativo F-UMP. Como normalmente esses fármacos agem em diferentes alvos celulares, as combinações de dois ou mais fármacos resulta na melhoria das taxas de resposta e na sobrevida dos pacientes (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LI et al., 2011; SADREDDINI et al., 2017).

### **2.3 Metotrexato**

O metotrexato (MTX), também denominado de ametopterina, pertence à classe dos antimetabólicos e foi sintetizado pela primeira vez em 1940 como antagonista do ácido fólico. Ele é um ácido dicarboxílico fraco, que apresenta solubilidade pH-dependente em meio aquoso, e é classificado como classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, indicando que o MTX apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade (GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; PRASAD et al., 2007; RUBINO, 2001)

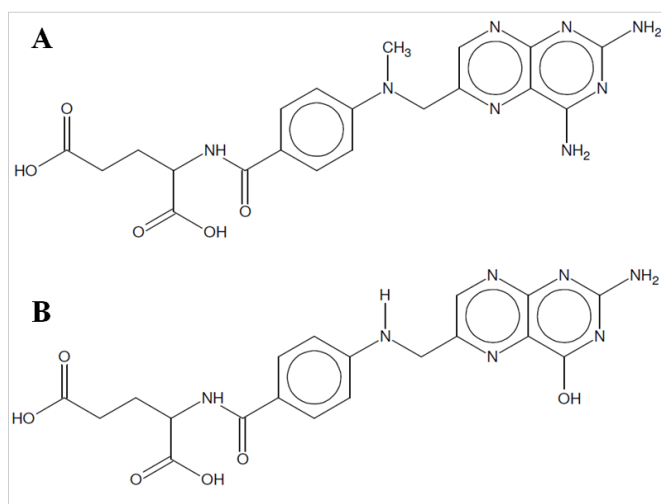
O MTX é caracterizado como um pó cristalino amarelo ou laranja, com massa molar de 454,4 g/mol, praticamente insolúvel em água e solventes orgânicos (etanol, clorofórmio e éter) e solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos e de carbonatos (RUBINO, 2001). É quimicamente composto por um anel heterocíclico (anel pterina 2,4-diamino-substituído), unido a uma porção *p*-aminobenzoil que, está ligada a uma unidade do ácido glutâmico.

O mecanismo de ação do MTX está relacionado à interferência no metabolismo do ácido fólico, atuando como um inibidor competitivo reversível da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), responsável por converter dihidrofolatos em tetrahidrofolatos. A inibição da enzima DHFR diminui a presença de folatos na forma reduzida, prejudicando a síntese de DNA, impedindo a proliferação e a divisão das células tumorais, levando à morte celular (GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; RUBINO, 2001; SCHRODER, 2003).

É amplamente utilizado no tratamento de várias doenças, incluindo leucemia, osteossarcoma, linfoma não-Hodgkin, psoríase, artrite reumatóide, bem como no tratamento de diversos tumores sólidos, como o câncer colorretal (ABOLMAALI et al., 2016; KARAMI et al., 2019).

Além da sua eficiência na terapia do CC, o MTX apresenta semelhança estrutural com o ácido fólico (Figura 3), o que permite seu transporte celular para as células tumorais, as quais superexpressam receptores de folato (ASHWANIKUMAR et al., 2014; BLANCO et al., 2011; LI et al., 2014). Um aspecto importante é que os receptores de folato são expressos em células normais e tumorais, no entanto em células tumorais apresentam níveis elevados de expressão devido esses receptores estarem ligados com os fatores de crescimento. Assim, a densidade de expressão dos receptores de folato aumentam à medida que a fase ou grau em que o câncer se agrava (LU; LOW, 2002; WANG et al., 2015).

**Figura 3.** Estrutura química do MTX (A) e do ácido fólico (B).



Embora alguns pesquisadores relatam a resistência celular do MTX no receptor de folato dependente de diversos fatores (BANERJEE et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2013), inúmeros estudos relacionam sua estrutura com o aumento da capacidade

terapêutica de sistemas de liberação de fármacos (ASHWANIKUMAR et al., 2014; LUO et al., 2014; THAPA et al., 2017; WANG et al., 2015). A conjugação do MTX em nanogéis resultou no aumento da captação e acúmulo desses sistemas pelas células tumorais resistentes, bem como numa maior capacidade de escapar do compartimento endossomal, resultando em uma citotoxicidade melhorada dos nanogéis em comparação com o fármaco livre (ABOLMAALI et al., 2016).

Desta forma, a utilização do MTX na superfície dos sistemas de liberação de fármacos possibilitará o seu direcionamento para as células tumorais, havendo uma maior seletividade e conseqüentemente uma redução dos efeitos adversos/tóxicos.

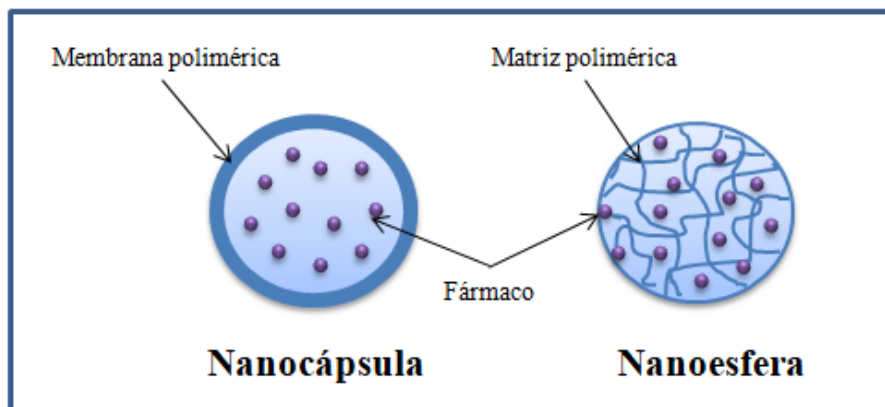
## **2.4 Nanopartículas poliméricas**

A nanotecnologia farmacêutica apresenta um grande potencial para o tratamento do CC, fornecendo ferramentas tecnológicas que poderão proporcionar a vetorização de fármacos para órgãos e/ou tecidos alvos, bem como o controle das taxas de liberação ou ainda, conferir a proteção efetiva do fármaco contra a degradação enzimática nos distintos segmentos do TGI (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; HUA et al., 2015).

Nesse sentido, a utilização de nanopartículas poliméricas (NPs) têm se mostrado bastante promissora, uma vez que seu diâmetro reduzido favorece a permeação das partículas no tecido tumoral/muco, contribuindo para o aumento do tempo de permanência do fármaco no local de ação, o que pode potencializar a terapia antitumoral (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; RABINOW, 2004).

As NPs poliméricas podem ser classificadas como nanocápsulas ou nanoesferas, dependendo da composição e da sua organização estrutural. As nanocápsulas são consideradas como sistemas reservatórios, devido à formação de um núcleo interior, revestido por uma membrana polimérica de espessura variável. Enquanto, as nanoesferas são sistemas matriciais, formadas por uma matriz polimérica na qual o fármaco pode estar disperso ou dissolvido no seu interior (Figura 4) (FERREIRA et al., 2018; LI et al., 2011; NUNES et al., 2018).

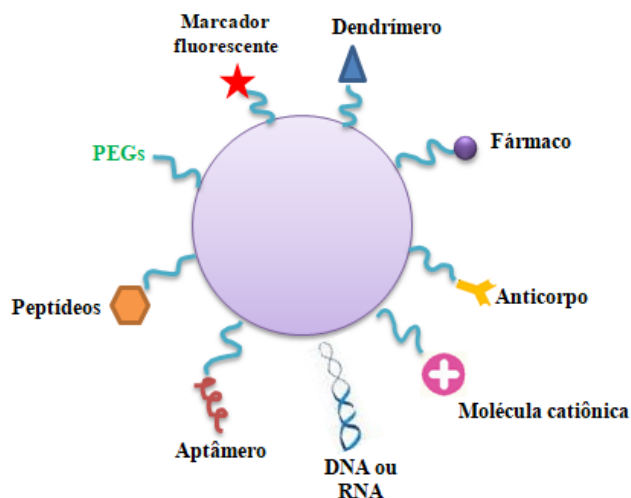
**Figura 4.** Representação esquemática da nanocápsula e nanoesfera. Fonte: Próprio autor.



Várias técnicas têm sido utilizadas na obtenção de NPs, tais como emulsificação seguida da evaporação do solvente, nanoprecipitação, *spray-drying*, coacervação simples ou complexa, microemulsificação, polimerização interfacial entre outras. Normalmente, estas técnicas necessitam da utilização de solventes ou elevada energia, o que pode levar a degradação do fármaco. Neste sentido, o processo de geleificação ionotrópica têm sido explorado para a obtenção de NPs, uma vez que apresenta importantes vantagens em relação aos demais métodos, como condições reacionais mais amenas e ausência de solventes orgânicos. Esta técnica é baseada na reticulação iônica das cadeias poliméricas, através do gotejamento de polímeros carregados positivamente ou negativamente em soluções com cargas opostas (AGRAWAL; STRIJKERS; NICOLAY, 2010; CALVO et al., 1997; DA SILVA BARBI et al., 2015; LI et al., 2011). Para a obtenção das NPs, diferentes parâmetros podem influenciar na formação, bem como nas propriedades destas partículas, que devem ser considerados, por exemplo tipo de polímero, concentração e proporção polimérica, densidade de carga, força iônica, pH do meio, etc.

A funcionalização das NPs é uma estratégia que vêm sendo amplamente explorada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, devido ao aumento do direcionamento/internalização desses sistemas para as células tumorais. Diversos ligantes podem ser utilizados na obtenção dessas partículas, como peptídeos, anticorpos, fármacos ou polímeros que apresentam elevada especificidade aos tumores expressos nas células, denominado *active targeting* (Figura 5) (WANG et al., 2015; ASHWANIKUMAR et al., 2014). Neste sentido, as propriedades e características do sistema podem ser moduladas de acordo com a escolha dos materiais e/ou polímeros que irão compor as nanopartículas.

**Figura 5.** Representação esquemática dos diferentes tipos de ligantes utilizados na funcionalização de nanopartículas. Fonte: Próprio autor.



Adicionalmente, a capacidade mucoadesiva das NPs também pode ser explorada como estratégia para o aumento da retenção do fármaco no tecido tumoral, através da utilização de polímeros com propriedades mucoadesivas. Esses polímeros são responsáveis pelo estabelecimento de um contato mais íntimo entre o sistema e o sítio biológico, criando um gradiente de concentração local do fármaco, o que deve promover uma maior ação e interação biológica do fármaco com tecido epitelial tumoral (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; DE LYRA et al., 2007; SMART, 2005).

## 2.5 Polímeros naturais

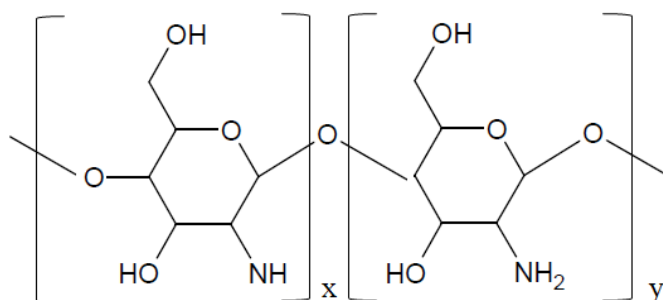
### 2.5.1 Quitosana

Dentre os inúmeros polímeros naturais, a quitosana (QS) vem sendo amplamente explorada no delineamento de NPs para liberação controlada de fármacos, devido à importantes vantagens como ser biodegradável, biocompatível e atóxica. É obtida a partir da desacetilação parcial da quitina, constituinte da casca de crustáceos e insetos. Ao longo da reação de desacetilação, os grupamentos acetamida ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) da quitina são transformados em grupamentos amina ( $-\text{NH}_2$ ). Desta forma, o grau de desacetilação da QS pode variar (56 a 96%), dependendo da origem da quitina e método

de extração, determinando a densidade de grupos amino presente na QS (NASKAR; SHARMA; KUOTSU, 2019; SHANMUGANATHAN et al., 2019).

É considerada um polissacarídeo linear, catiônico, semicristalino e sua estrutura molecular apresenta unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (Figura 6) (CALVO, et al., 1997; LI et al., 2011; RINAUDO, 2011).

**Figura 6.** Estrutura molecular da quitosana.



A QS apresenta importantes propriedades como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral (atua de forma sinérgica aos antitumorais no tratamento do câncer) (NASKAR; SHARMA; KUOTSU, 2019; PRABAHARAN, 2015). Outro grande interesse deste polímero na obtenção de sistemas de liberação de fármaco é devido à sua reconhecida propriedade mucoadesiva, estabelecida através de interações eletrostáticas entre os grupos protonados da QS e os grupos siálicos da mucina presente no muco. Adicionalmente, ela possui a capacidade de promover a abertura das junções paracelulares, facilitando o transporte intercelular de fármacos (WOODLEY, 2001). A habilidade da QS se reticular inter e intramolecularmente quando em contato com poliânions, como o tripolifosfato de sódio (TPP), têm sido amplamente explorada para a obtenção de NPs através do processo de geleificação ionotrópica (DE CARVALHO et al., 2019; NASKAR; SHARMA; KUOTSU, 2019).

Apesar da considerável inúmeras vantagens, o desenvolvimento de sistemas orais baseados em QS é um desafio, devido à sua elevada solubilidade em meio ácido, o que pode ocasionar a liberação prematura do fármaco nas porções superiores do TGI.

Neste sentido, o encapsulamento de nanopartículas em sistemas de liberação cólon-específica deve permitir a vetorização direcionada de quimioterápicos ao cólon, favorecendo a melhoria do efeito terapêutico, minimizando a dose administrada e os efeitos colaterais associados. Estudos demonstraram que o encapsulamento de nanopartículas em microcápsulas evitou a degradação prematura ou a absorção

indesejada de nanopartículas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal superior, aumentando assim a liberação no cólon após administração oral (BHAVSAR; AMIJL, 2007; MA et al., 2015).

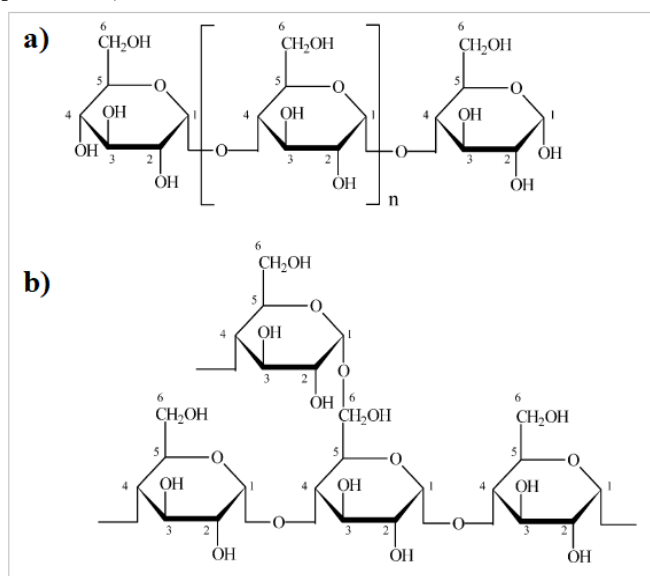
### 2.5.2 Amido resistente

O desenvolvimento de formulações orais destinadas à liberação cólon-específica de fármacos pode ser baseado em materiais que são especificamente degradados por enzimas produzidas por bactérias colônicas (MENEGUIN et al., 2018).

O amido é um polissacarídeo natural, semi-cristalino, presente em diferentes espécies vegetais na forma de grânulos, é composto por amilose (poliglicano de cadeia linear com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4) e amilopectina (glicano ramificado com ligações  $\alpha$ -1,6) (Figura 7).

**Figura 7.** Estrutura linear da amilose (a) e ramificada da amilopectina (b).

Fonte: Adaptado de: (HERRERO-MARTÍNEZ; SCHOENMAKERS; KOK, 2004).



No entanto, uma das principais limitações para o uso do amido nativo é sua elevada solubilidade em meio aquoso, sendo necessária sua modificação através de métodos físicos, químicos ou enzimáticos (ZAVAREZE; DIAS, 2011).

O amido resistente 3 (AR), também conhecido como amido retrogradado, é obtido através do processo de retrogradação, o qual envolve a etapa de amorfização das estruturas semi-cristalinas (gelatinização), seguido pela reorganização das cadeias poliméricas de maneira tridimensional mais organizada, empacotada e na forma de

hélices duplas estabilizadas por ligações de hidrogênio, o que dificulta o acesso das enzimas proteolíticas às ligações glicosídicas (DIMANTOV; KESSELMAN; SHIMONI, 2004; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; YOON; LEE; LIM, 2009). Desta forma, o AR é uma fração de amido (hidrotermicamente modificada) que resiste à digestão no estômago e no duodeno, e é digerido somente no cólon através de enzimas colônicas, o que o torna um potencial candidato para aplicação em sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014).

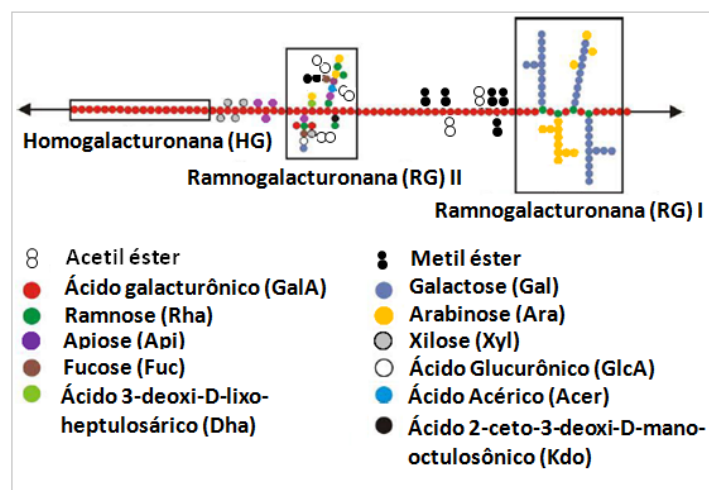
A alta amilose (AA) vem sendo considerada o principal material para obtenção de produtos com elevado teor de AR, devido ao seu elevado conteúdo de amilose, responsável pela formação de uma matriz amorfa (após o processo de retrogradação), na qual os cristalitos permanecem embebidos e protegidos da degradação enzimática (DIMANTOV et al., 2004; HTOON et al., 2009; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014).

### 2.5.3 Pectina

A pectina é um heteropolissacarídeo natural encontrado principalmente na lamela média e na parede celular primária das plantas. Quimicamente, é composta por homogalacturonana (HG), ramnogalacturonanas (RG), que são divididas nos tipos I e II, que correspondem a região lisa ou *smooth region* e região ramificada ou *hairy region*, respectivamente. A HG representa cerca de 65% da estrutura total da pectina e uma cadeia linear constituída de resíduos de ácido galacturônico (GalA) unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), esterificados com grupamentos metila e acetila (Figura 8).

De acordo com grau de esterificação (GE), a pectina pode ser classificada como pectinas de alto grau de metoxilação, quando DE >50%, e pectinas de baixo grau de metoxilação, com um DE <50% (COIMBRA, 2010; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

**Figura 8.** Estrutura da pectina. Fonte: Adaptado de: (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).



A pectina tem sido utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação por apresentar propriedades favoráveis como mucoadesão, dissolução em pH alcalino, capacidade de formar géis, entre outras. Além disso, a pectina também têm demonstrado potencial habilidade para o desenvolvimento de sistemas colônicos, uma vez que em meio ácido permanece como agregados de macromoléculas, sendo resistente à proteases e amilases presentes nas porções superiores do TGI (LIU et al., 2003; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012). Apesar destas propriedades favoráveis, o grande desafio da utilização deste polissacarídeo é sua elevada solubilidade em meio aquoso, que pode resultar na liberação prematura e indesejável do fármaco (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; SINHA; KUMRIA, 2001).

Contudo, a pectina em associação com outros polímeros, naturais ou sintéticos, também denominadas blendas poliméricas, representa uma estratégia racional para a obtenção de materiais com propriedades moduladas, permitindo o desenvolvimento de sistemas inovadores que atendem às necessidades terapêuticas específicas (LIU et al., 2003; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014). A adição da pectina na retrogradação do amido resultou no aumento do teor de amido resistente (65,8% para 96,6%), favorecendo o processo de retrogradação (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014).

O desenvolvimento de sistemas orais baseados em blendas de polissacarídeos naturais, visando a liberação cólon- específica de fármacos têm sido alvo de importantes estudos em nosso grupo de pesquisa. Meneguín e colaboradores (2014) demonstraram que a utilização do AR em associação com a pectina para obtenção de filmes de

revestimento permitiu a redução das taxas de dissolução em meio ácido e elevada resistência à digestão enzimática pela  $\alpha$ -amilase pancreática, evidenciando o potencial deste material para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014). Posteriormente, esses filmes foram empregados como material de revestimento de micropartículas de gelatina como estratégia para administração oral de insulina. Os autores verificaram que o revestimento promoveu o aumento do efeito hipoglicemiante oral *in vivo* da insulina veiculada em micropartículas (MENEGUIN et al., 2018).

Ademais, diversos estudos relacionados à vetorização cólon-específica de fármacos antineoplásicos utilizando carreadores poliméricos têm constituído importante objeto de pesquisa, a fim de promover um aumento da atividade antitumoral e melhorar a terapia do CC através da via oral (JAIN et al., 2010; MA et al., 2015; URBANSKA et al., 2012).

Ma e colaboradores (2015), desenvolveram NPs de Eudragit<sup>®</sup> incorporadas em microcápsulas poliméricas de hipromelose e quitosana para vetorização da oxaliplatina no cólon. A partir dos estudos *in vivo* utilizando camundongos, os autores verificaram um acentuado aumento da concentração do fármaco no órgão alvo, bem como um aumento do tempo de residência das NPs nos segmentos do TGI inferior, potencializando a liberação das mesmas para o cólon quando comparado às NPs livres (MA et al., 2015).

Neste estudo, o uso de terapias combinadas (associação dos fármacos 5-FLU e MTX) e estratégias capazes de promover o direcionamento de NPs para o cólon foram exploradas para o tratamento do câncer colorretal.

A escolha da QS para a obtenção das NPs foi baseada na sua importante propriedade mucoadesiva associada à sua habilidade de reticulação com poliânions, possibilitando a utilização da técnica de geleificação ionotrópica para obtenção das NPs, a qual é uma técnica de execução simples, que não requer equipamentos robustos, e evita o uso de solventes orgânicos, sendo por isso considerado um método *eco-friendly*. Apesar das importantes propriedades da QS, este polímero apresenta alta solubilidade em meio ácido, o que resulta na liberação prematura do fármaco, limitando seu uso em sistemas cólon específicos administrados pela via oral.

A tecnologia de microencapsulação das NPs foi explorada a fim de promover a vetorização das NPs de QS no cólon, evitando sua degradação em meio gástrico. Para tanto, o uso do AR/P baseou-se nas suas propriedades de resistência contra a degradação

enzimática no estômago e no duodeno, sendo digerido somente no cólon. Desta forma, o sistema desenvolvido deve possibilitar o trânsito pelo TGI superior, sem nenhuma ou com reduzida liberação tanto de NPs e fármacos, possibilitando assim a liberação de NPs no sítio de ação (cólon).

### 3 OBJETIVO

Desenvolvimento e caracterização de um sistema multifuncional oral empregando nanopartículas de quitosana contendo 5-fluorouracil, funcionalizadas com metotrexato e incorporadas em micropartículas de amido resistente e pectina, visando o tratamento do câncer colorretal.

#### 3.1 Etapas para alcançar o objetivo proposto

- ✓ Otimizar as condições para a obtenção das nanopartículas;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas;
- ✓ Avaliar o percentual do 5-FLU incorporado às nanopartículas;
- ✓ Sintetizar quitosana conjugada com MTX;
- ✓ Caracterizar a conjugação da quitosana com MTX;
- ✓ Desenvolver e caracterizar as nanopartículas funcionalizadas com MTX;
- ✓ Avaliar as propriedades mucoadesivas das nanopartículas;
- ✓ Desenvolver e caracterizar micropartículas carregadas com as nanopartículas;
- ✓ Determinar os perfis de liberação *in vitro* do 5-FLU a partir das nanopartículas e das micropartículas carregadas com as nanopartículas;
- ✓ Avaliar a biodistribuição *in vivo* das nanopartículas e das micropartículas carregadas com as nanopartículas usando imagem óptica de pequenos animais;

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

Quitosana de baixo peso molecular (grau de desacetilação de 75-85%, Sigma-Aldrich®); Tripolifosfato de sódio (Sigma-Aldrich®); 5-fluorouracil (Fagron); Metotrexato (Fagron); Ácido acético P.A (Qhemis); Ácido clorídrico - teor 37% (Qhemis); Hidróxido de sódio (Grupo Química®); Alta amilose (Hylon VII - National Starch & Chemical); Pectina de baixo grau de metoxilação, tipo LM-506CS (CP Kelco); Cloreto de alumínio (Vetec); Dimetilformamida (DMF, Fisher Scientific), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich®), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma-Aldrich®); Cianina 5 éster de amina (Cy5-NHS-éster) (Lumiprobe); N-(6-Aminohexil) Rodamina 6G-Amida bis (trifluoroacetato) (Lumiprobe).

### **4.2 Principais equipamentos**

Aagitador magnético (Quimis); Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments) acoplado ao autotitulado MPT-2; Balança analítica (Owa labor; Bel Engineering); Centrífuga (Sorvall TC); Ultracentrífuga (ThermoScientific); Espectrofotometro de UV-VIS (AGILENT modelo Cary 60); HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC (Agilent Technologies); Peagômetro (Micronal); Homogeneizador Ultra-turrax (IKA); equipamento para ensaio de dissolução Hanson Research (modelo New Hanson SR-8 Plus).

## **5 MÉTODOS**

### **5.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta**

Inicialmente, a validação por espectrofotometria de UV-Vis foi realizada com o intuito de quantificar o 5-FLU nas nanopartículas de QS/TPP para os ensaios de eficiência de encapsulação. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão

intracorrida e intercorrida, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017).

#### 5.1.1 Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis

A fim de verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção em meio aquoso, soluções de 5-FLU a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram submetidas à varredura na região entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis.

#### 5.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da obtenção de três curvas analíticas do 5-FLU, a partir da solução estoque ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e as soluções foram preparadas a partir de diluições em concentrações variando de 1,0 a  $17,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A equação da reta foi determinada através do cálculo da regressão linear entre o valor de absorbância e a concentração do fármaco.

#### 5.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada a partir da solução estoque do 5-FLU em meio aquoso, em que foram preparadas soluções de fármaco nas concentrações de 5, 10 e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que correspondem à baixa, média e alta concentração do intervalo linear da curva analítica, as quais foram analisadas em triplicata.

#### 5.1.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de três diferentes concentrações, baixa ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e alta ( $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A exatidão foi calculada por meio da Equação 1, em que C é a concentração média determinada experimentalmente, e CO é a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{CO} \times 100$$

Equação 1

### 5.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

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

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad \text{Equação 3}$$

Em que,  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e  $IC$  é a inclinação da curva de calibração.

## 5.2 **Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Com o objetivo de garantir a quantificação do MTX e 5-FLU nos sistemas desenvolvidos, e assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, um método analítico foi validado por CLAE.

A validação do método analítico para quantificação do MTX e 5-FLU foi avaliada respeitando os seguintes parâmetros: conformidade do sistema, especificidade/seletividade, linearidade, precisão intracorrída e intercorrída, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Os parâmetros empregados na metodologia analítica para quantificação dos fármacos, são apresentados na Tabela 1. O equipamento utilizado durante todo o ensaio foi um HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC, com detector UV-Vis.

**Tabela 1.** Parâmetros cromatográficos empregados na metodologia analítica.

| <b>Parâmetros cromatográficos</b> |                                                         |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Fase estacionária</b>          | Coluna HPLC Zorbax C18 250X4,6 MM; 5 µm                 |
| <b>Fase móvel</b>                 | Tampão acetato de amônio 50mM (pH 6,0); metanol (70:30) |
| <b>λ detecção</b>                 | 303 nm (MTX); 266 nm (5-FLU)                            |
| <b>Volume de injeção</b>          | 20µL                                                    |
| <b>Fluxo</b>                      | 1,0 mL/min                                              |
| <b>Temperatura</b>                | 25 °C                                                   |

### 5.2.1 Conformidade do sistema cromatográfico

A conformidade do sistema cromatográfico foi realizado através de cinco injeções da solução de MTX e/ou 5-FLU na concentração de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, preparada em fase móvel, a partir da solução estoque (100 µg.mL<sup>-1</sup>).

Os picos de absorção máxima do MTX e 5-FLU foram registrados, e com base nos picos cromatográficos de cada injeção para cada fármaco, foi avaliado o desvio padrão relativo percentual (DPR%) para: área, tempo de retenção (tR), fator de cauda (FC), número de pratos teóricos (N) e assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento.

Para assegurar a quantificação dos fármacos por CLAE, também foi avaliado a resolução entre as bandas do MTX e 5-FLU através do cálculo da resolução completa (Rs), que indica a qualidade da separação entre duas bandas cromatográficas (Equação 4).

$$Rs = 2 \times \frac{tr_2 - tr_1}{w_1 + w_2} \quad \text{Equação 4}$$

Em que, tR é o tempo de retenção e w é a largura do pico cromatográfico.

### 5.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através da obtenção de três curvas analíticas do MTX e/ou 5-FLU, e a partir da solução estoque para cada fármaco ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foram preparadas diluições com concentrações variando de 0,15 a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 5.2.3 Precisão

A repetibilidade ou precisão intracorrida foi avaliada a partir de três diluições da solução estoque de MTX e/ou 5-FLU, nas concentrações 1,0, 10 e  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondentes às concentrações baixa, média e alta do intervalo linear da curva analítica. As injeções foram realizadas no mesmo dia, sob condições experimentais idênticas, e os valores do DPR% foram calculados. Para a precisão intermediária ou intercorrida, foi analisada em dia diferente, por um segundo analista utilizando as mesmas condições experimentais.

### 5.2.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através de três injeções nas concentrações  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (baixa),  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (média) e  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (alta), a partir da solução estoque de MTX e 5-FLU ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A exatidão foi calculada por meio da Equação 1, apresentada anteriormente na seção 5.1.4.

### 5.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir de três curvas analíticas construídas e calculados utilizando as Equações 2 e 3, apresentadas previamente na seção 5.1.5.

### 5.2.6 Especificidade/Seletividade

Para avaliar a interferência dos polímeros e dos meios utilizados no ensaio de dissolução no comprimento de onda do 5-FLU e/ou MTX, a especificidade/seletividade foi analisada a partir da injeção do filtrado das nanopartículas sem fármaco e injeções da solução de 5-FLU ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) nos meios HCl/KCl (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8 e pH 7,4).

### 5.3 Caracterização do polímero Quitosana

#### 5.3.1 Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial ( $A_2$ )

A massa molar média e o segundo coeficiente virial da QS foi calculado pela técnica de espalhamento de luz estático usando um equipamento Zetasizer Nano Series (Nano - ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), com o auxílio do software Zetasizer Nano ZS v7.11.

A QS foi dispersa na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em ácido acético  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , mantida sob agitação mecânica durante 24 horas. A partir dessa dispersão, realizou-se diluições em diferentes concentrações ( $0,1\text{--}0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), as quais foram analisadas através da equação de Rayleigh, que descreve a intensidade de luz espalhada a partir de uma partícula em solução. Os índices de refração diferencial ( $dn/dc$ ) utilizados para as medidas foram de  $0,181 \text{ mL.g}^{-1}$  para a QS, o tolueno previamente filtrado (PTFE,  $0,2 \mu\text{m}$ ) como padrão interno do equipamento e a água purificada filtrada em membrana de acetato de celulose  $0,2 \mu\text{m}$ , e usada como branco. Para cada concentração, a intensidade de espalhamento ( $Kc/R\theta$ ) foi medida em triplicata.

### 5.4 Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas

#### 5.4.1 Análise do potencial zeta em função do pH

A relação entre o valor de pH e a densidade de carga (potencial zeta) das soluções de QS, TPP e 5-FLU foi avaliado através da titulação isoelétrica (ácido-base), usando o equipamento Zetasizer Nano-ZS<sup>®</sup> (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) acoplado ao autotitulador MPT-2. O TPP e 5-FLU foram dispersos em água purificada e a QS em solução de ácido acético  $0,1 \text{ M}$ , todos na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Para cada amostra a titulação isoelétrica foi realizada em triplicata, utilizando-se HCl  $0,5 \text{ M}$ , NaOH  $0,05 \text{ M}$  e  $0,5 \text{ M}$ . A curva de titulação variou dos valores de pH 3,0 a 8,0 para a QS e o TPP, e valores de pH 3,0 a 10,0 para o 5-FLU (valor de pH acima do seu  $pK_a \sim 8,0$ ), com aumento de  $0,6 \pm 0,2$  unidades por medida.

### 5.5 Preparo das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

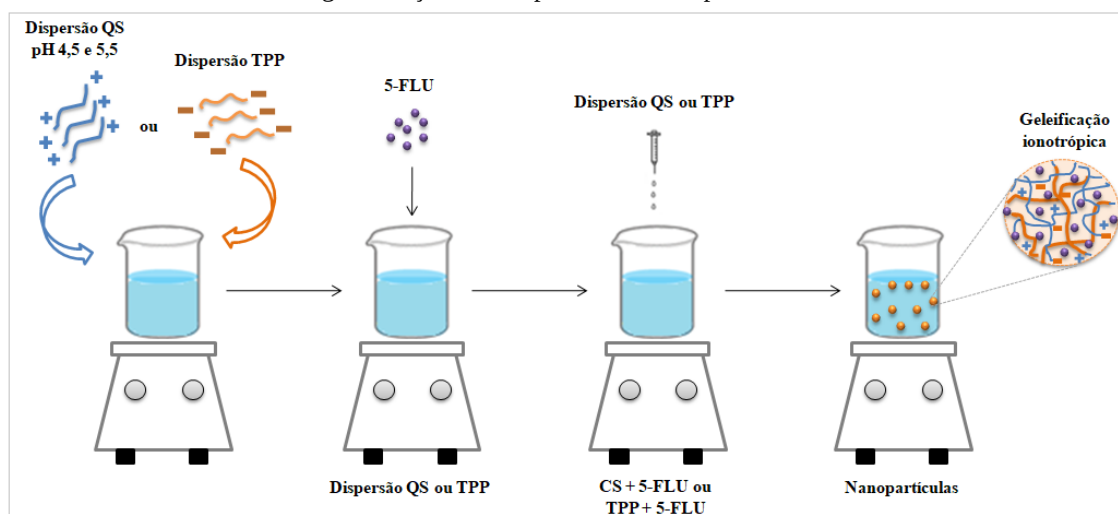
As nanopartículas poliméricas foram obtidas por meio da técnica de geleificação ionotrópica através da reticulação do polímero catiônico QS com o poliânion TPP, segundo o método proposto por Calvo e colaboradores (1997), com algumas modificações (CALVO et al., 1997).

Foram avaliadas a influência de variáveis como as proporções de massa polimérica, o pH e a ordem da adição dos componentes na formação das nanopartículas poliméricas.

A QS foi dispersa em solução de ácido acético 1% (v/v), na concentração de  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , mantida sob agitação mecânica durante 24 horas a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Após a completa dispersão da QS, a solução foi filtrada (membrana de acetato de celulose  $0,45 \mu\text{m}$ ) e o pH foi ajustado para 4,5 e 5,5 com solução de hidróxido de sódio  $0,1\text{M}$ . O TPP e 5-FLU foram dispersos em água purificada nas concentrações de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Para a obtenção das nanopartículas compostas por QS e TPP utilizou-se dois modos de preparo a) a adição lenta da dispersão de QS sobre a de TPP e b) a adição lenta da dispersão de TPP sobre a de QS, sob agitação magnética durante 30 minutos. Diferentes proporções de massa de QS/TPP foram testadas. As nanopartículas contendo fármaco foram obtidas nas mesmas condições citado anteriormente, sendo o 5-FLU previamente adicionado à dispersão de QS ou TPP (Figura 9).

**Figura 9.** Representação esquemática do processo de obtenção das nanopartículas pelo método de geleificação ionotrópica. Fonte: Próprio autor



## 5.6 Caracterização físico-química das nanopartículas QS/TPP/5-FLU

### 5.6.1 Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI)

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade (PDI) das nanopartículas em dispersão foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*). As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Series (Nano - ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C em um ângulo de detecção de 173°. As medidas foram realizadas em triplicata, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

### 5.6.2 Análise do potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi determinado através da mobilidade eletroforética das partículas usando o equipamento Zetasizer Nano Series (Nano - ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C em um ângulo de detecção de 173°. As medidas foram realizadas em triplicata cada uma das amostras, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

### 5.6.3 Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

Os métodos de ultracentrifugação e de filtração-ultracentrifugação foram usados e comparados para determinar a eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas poliméricas. No primeiro método, uma alíquota das dispersões de nanopartículas foi ultracentrifugada (ThermoScientific) a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,22 µm e a concentração de fármaco livre analisada por espectrofotometria de UV-Vis a 266 nm. No segundo método, 1,0 mL das dispersões de nanopartículas foram adicionadas no filtro Amicon Ultra 15 (Millipore, 50 kDa) e foram centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 min. A concentração de fármaco livre foi analisada como descrito anteriormente, todas as

análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada através da Equação 5.

$$EE\% = \frac{\text{massa total de 5-FLU adicionada} - \text{massa de 5-FLU livre no sobrenadante}}{\text{massa total de 5-FLU adicionada}} \times 100$$

#### 5.6.3.1 Estudos para otimizar a eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

Visando maximizar a eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas, diferentes variáveis foram exploradas, como segue:

##### 5.6.3.1.1 *Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU*

O efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU foi avaliado, em que o fármaco (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) foi solubilizado em solução de NaCl 0,1 M antes da sua adição na dispersão de QS durante o preparo das nanopartículas.

##### 5.6.3.1.2 *Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação*

As nanopartículas foram obtidas com a mistura de QS (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) e 5-FLU (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) sem adição de TPP, usando diferentes proporções de massa (QS/5-FLU).

##### 5.6.3.1.3 *Efeito do aumento do tempo de interação entre o fármaco e a quitosana na eficiência de encapsulação do 5-FLU*

A fim de aumentar a interação entre o fármaco e a QS, o 5-FLU (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) foi adicionado à dispersão de QS (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) e mantido sob agitação magnética durante 30 minutos antes da adição do TPP (1,0 mg.mL<sup>-1</sup>).

##### 5.6.3.1.4 *Efeito do pH da solução de 5-FLU na eficiência de encapsulação*

Para avaliar a influência do pH na eficiência de encapsulação, o pH da solução do fármaco foi ajustado para 9 com solução de hidróxido de sódio 0,1M a fim de aumentar a densidade de cargas para a obtenção das nanopartículas.

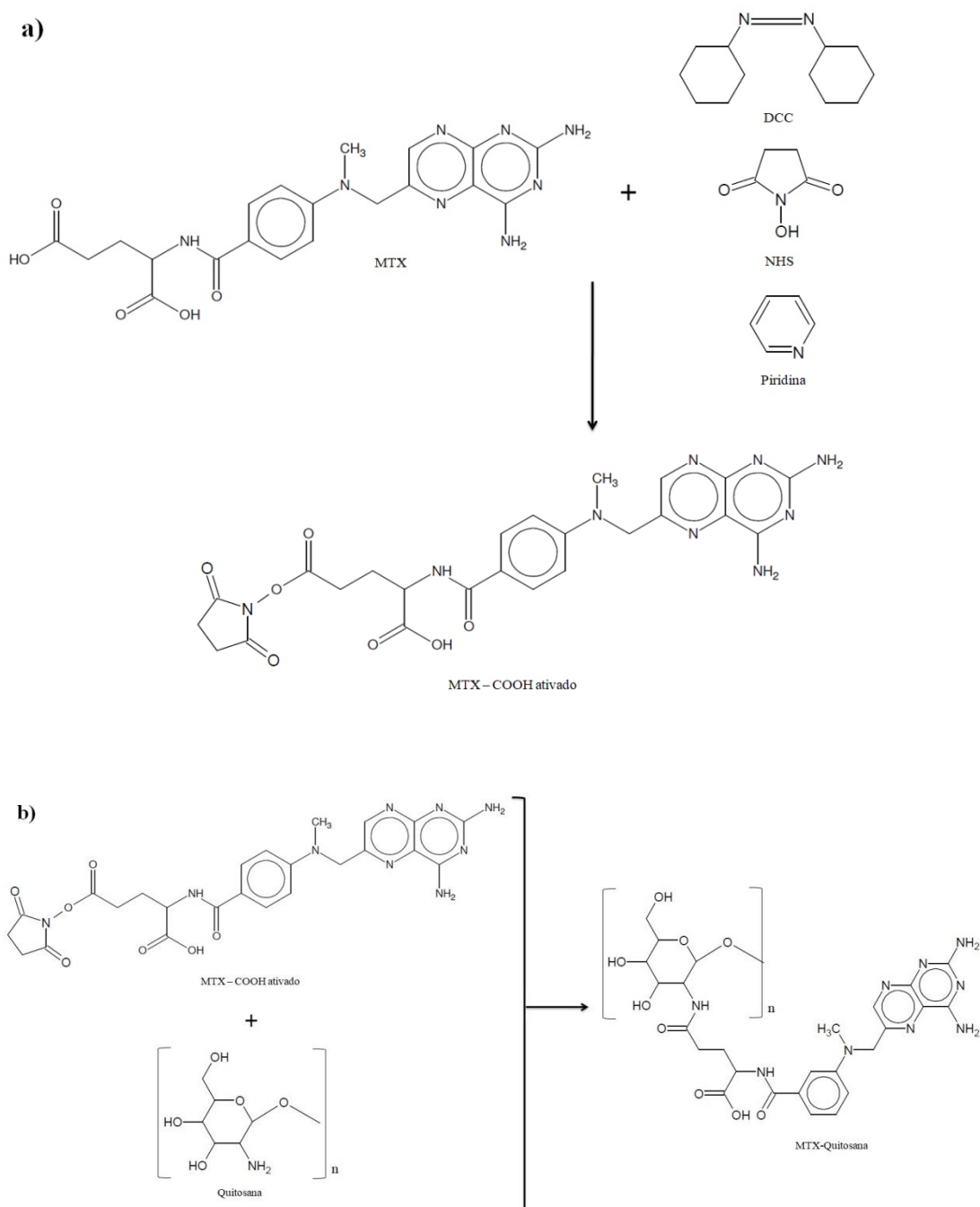
#### 5.6.4 Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

A morfologia das NPs foi analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento ZEISS, modelo SIGMA, em colaboração com o Instituto de Física de São Carlos (USP). A dispersão de nanopartícula foi diluída na proporção 1:30 (v/v) em uma dispersão de Tween 20 (0,5%-v/v), para evitar a aglomeração das partículas durante o processo de secagem. O material foi disposto sobre suporte metálico e seco em temperatura ambiente durante três dias. Após a secagem, o suporte foi revestido com material condutor (Carbono). A partir das imagens, o software *Image J* foi utilizado para medir o tamanho das nanopartículas.

### 5.7 **Síntese da quitosana funcionalizada com metotrexato**

A síntese para a formação da QS funcionalizada com MTX ocorreu em duas etapas. A primeira etapa consistiu na reação entre o MTX com os DCC, NHS e depois com o catalisador piridina para tornar os grupos carboxílicos do MTX mais reativos (Figura 10. a). Em seguida, o MTX já acoplado com NHS reage com a QS em uma reação de condensação para a formação de uma ligação amida (reação entre o grupo carboxílico do MTX ativado e os grupos amina primária da QS) (Figura 10. b).

**Figura 10.** Representação esquemática do processo de funcionalização da QS com MTX: a) síntese do MTX ativado; b) síntese do acoplamento da QS com MTX.



### 5.7.1 Síntese do MTX com N-hidroxisuccinimida (NHS) e N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

O MTX ativado foi preparado segundo o método proposto por Wang e colaboradores (2011), com algumas modificações (WANG et al., 2011). MTX (4,5 g, 10 mmol) e DCC (2,1 g, 10 mmol) foram dispersos em 50 mL de dimetilformamida

(DMF), sob agitação magnética durante 18 h à 4 °C. Em seguida, NHS (1,2 g, 10 mmol) e 0,5 mL de piridina foram adicionados à mistura acima, mantendo a agitação por 6 h à 4 °C. A diciclohexilureia precipitada foi removida através de filtração e o produto final foi evaporado usando um rotaevaporador (60 °C, 100 rpm) para obtenção do MTX ativado.

### 5.7.2 *Síntese de acoplamento da QS com MTX ativado*

Diferentes graus de funcionalização foram obtidos com o aumento da proporção molar do MTX em relação à QS (Tabela 2). A QS (0,5 g) foi dispersa em 100 mL de solução de ácido acético 1% (v/v) pH 4,5. O MTX ativado com NHS foi disperso em 50 mL de DMF e adicionado lentamente à dispersão de QS, mantendo a reação sob agitação durante 48 h à 4 °C. O precipitado foi removido por centrifugação (10 min, 3500 rpm) e lavado com DMF, acetona e éter dietílico, respectivamente. A suspensão resultante foi dispersa em 30 mL de água purificada e dialisada (membrana de diálise, 12-14 kDa, Sigma-Aldrich) contra solução de ácido acético 1% (v/v) (pH 4,5) e água purificada durante 48 h (para remoção do MTX livre), e por fim liofilizado por 24 h (Micro Modulyo 115, Thermo Scientific).

**Tabela 2.** Síntese do acoplamento da quitosana com metotrexato ativado em diferentes graus de funcionalização.

| Proporções (molar e/ou massa) | Graus de Funcionalização |          |          |
|-------------------------------|--------------------------|----------|----------|
|                               | QS-MTX-1                 | QS-MTX-2 | QS-MTX-3 |
| QS (mols)                     | 1                        | 1        | 1        |
| MTX ativado (mols)            | 250                      | 350      | 550      |
| QS (g)                        | 0,500                    | 0,500    | 0,500    |
| MTX ativado (g)               | 0,543                    | 0,761    | 1,207    |

## 5.8 Caracterização da síntese quitosana funcionalizada com metotrexato

### 5.8.1 Determinação do rendimento bruto da síntese de acoplamento QS-MTX

Após a liofilização das amostras (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram medidas as respectivas massas para a determinação da porcentagem de rendimento da síntese de acoplamento QS-MTX em diferentes graus de funcionalização, a partir da Equação 6:

$$RE (\%) = \frac{\text{massa final} \times 100}{\text{massa inicial}} \quad \text{Equação 6}$$

### 5.8.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão da QS, MTX e QS funcionalizada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram determinadas em um aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific<sup>®</sup> acoplado à um microscópio óptico. Capilares de vidro foram preenchidos com as amostras e submetidos a aquecimento com uma temperatura de 10 °C/min. A temperatura na qual a amostra começa a fundir na parede do tubo e a temperatura na qual torna-se completamente líquida, é definida como faixa de fusão.

### 5.8.3 Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX

O teor do MTX nos conjugados QS-MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram determinados por meio do método cromatográfico validado no item 5.2. As amostras foram precisamente pesadas e diluídas em HCl 0,1 M na concentração de 25 µg.mL<sup>-1</sup> para determinar a concentração do MTX conjugada nos compostos. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 5.8.4 Análise do potencial zeta QS-MTX conjugados

O potencial zeta do MTX, QS e da QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram determinados através da mobilidade eletroforética das partículas usando o equipamento Zetasizer Nano Series (Nano - ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C em um ângulo de detecção de 173°. As soluções de MTX, QS e QS-MTX conjugados

na concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram solubilizadas em HCl 0,1 M e preparadas a partir de uma solução estoque ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As medidas foram realizadas em triplicata, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

#### 5.8.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia por IV da QS, MTX e QS funcionalizada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foi realizada em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier-VERTEX 70 (BRUKER), abrangendo uma região de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , 64 scans. Utilizou-se o acessório ATR, pelo método de reflexão total atenuada.

#### 5.8.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras (QS; MTX; QS-MTX-1; QS-MTX-2; QS-MTX-3) foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  obtidos em um espectrômetro Bruker® Avance III HD 600, utilizando-se solventes deuterados no preparo das amostras ( $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  e  $\text{DMSO}-d_6$ ). Os deslocamentos químicos foram reportados em partes por milhão ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) foram mostradas em Hertz (Hz).

#### 5.8.7 DSC

As análises de DSC da QS, MTX e QS funcionalizada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram realizadas através de um calorímetro exploratório diferencial, a uma razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , sob atmosfera inerte de gás nitrogênio ( $50 \text{ mL}/\text{min}$ ), na faixa de aquecimento de  $25$  a  $200^\circ\text{C}$ . Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio contendo aproximadamente  $5 \text{ mg}$  de amostra e como referência foi utilizado um cadinho de alumínio vazio.

#### 5.8.8 TG/DTG

As curvas de termogravimetria (TG) e derivada termogravimétrica (DTG) da QS, MTX e QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram registradas em um analisador termogravimétrico, modelo TA SDT 2960 (TA

Instruments). Todas as análises foram conduzidas em uma faixa de temperatura de 25 a 700°C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min<sup>-1</sup>, a taxa de aquecimento de 20°C/minuto.

### 5.9 Desenvolvimento das nanopartículas funcionalizadas com MTX

As nanopartículas de QS/TPP/5-FLU, utilizando QS funcionalizada com MTX, foram obtidas por meio da técnica de geleificação ionotrópica. Durante o preparo destas nanopartículas foram utilizadas QS não funcionalizada e QS funcionalizada com MTX na proporção 1:1 m/m QS/QS-MTX.

### 5.10 Caracterização físico-química das nanopartículas funcionalizadas com MTX

#### 5.10.1 *Análise do diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI)*

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade (PDI) das nanopartículas funcionalizadas com MTX foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*), conforme descrito anteriormente na seção 5.6.1.

#### 5.10.2 *Análise do potencial zeta*

O potencial zeta das nanopartículas funcionalizadas com MTX foi determinado usando o equipamento Zetasizer Nano Series, conforme descrito na seção 5.6.2.

#### 5.10.3 *Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%)*

Para determinar a EE%, 1,0 mL das dispersões de nanopartículas foram adicionadas no filtro Amicon Ultra 15 (Millipore, 50 kDa) e foram centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 min. A concentração de fármaco livre foi determinado em HPLC, em 266 nm, conforme metodologia obtida e validada no item 5.2, e todas as análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada através da Equação 7.

$$EE\% = \frac{\text{massa total de 5 - FLU adicionada} - \text{massa de 5 - FLU livre no sobrenadante}}{\text{massa total de 5 - FLU adicionada}} \times 100$$

## 5.11 Estudo das propriedades mucoadesivas

### 5.11.1 Estudo in vitro de interação entre mucina e nanopartículas

A fim de avaliar a capacidade mucoadesiva das nanopartículas desenvolvidas, a interação entre a mucina e as nanopartículas foi determinada a partir da análise do potencial zeta. Soluções de mucina em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram dispersas em fluido gástrico simulado (HCl/KCl pH 1,2) e fluido colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8). Em seguida, as nanopartículas foram adicionadas às soluções de mucina, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 1 hora, usando banho termostático. O potencial zeta das amostras foi determinado usando o equipamento Zetasizer Nano - ZS, e os resultados comparados com os valores de potencial zeta sem adição de mucina. As análises foram realizadas em triplicata.

## 5.12 Desenvolvimento das nanopartículas incorporadas em micropartículas baseadas em amido resistente/pectina

### 5.12.1 Preparo da dispersão de amido resistente e pectina para obtenção das micropartículas

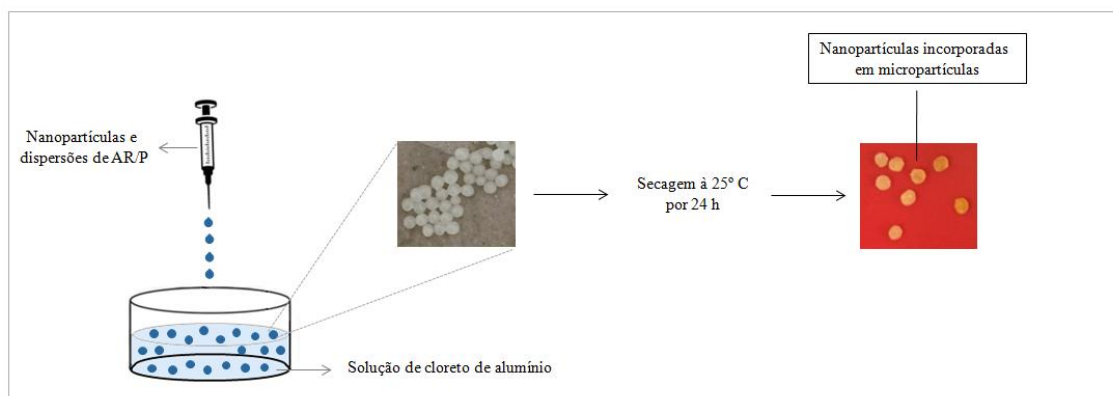
De acordo com o procedimento proposto por Meneguín e colaboradores (2014), dispersões aquosas de AA e pectina foram preparadas, separadamente, na concentração de 5%, sob agitação magnética por 30 min (MENEGUÍN; CURY; EVANGELISTA, 2014). Em seguida, as dispersões de AA foram submetidas à autoclavação (121°C) por 120 min, enquanto as dispersões de pectina permaneceram sob agitação magnética durante o mesmo período de tempo, para completa dispersão desse polissacarídeo. Ao final do período de autoclavação, a AA gelatinizada foi resfriada (30°C) sob agitação magnética e, então, misturada com a dispersão de pectina na proporção de 1:4 (m/m).

Para o processo de retrogradação, as dispersões foram submetidas conjuntamente a ciclos térmicos alternados de temperatura (4°C e 30°C) por 16 dias, sendo 2 dias em cada temperatura.

#### 5.12.2 *Desenvolvimento das micropartículas carregadas com nanopartículas*

A dispersão de NPs obtidas anteriormente foram dispersas nas dispersões de AR/pectina nas proporções de NP:AR/P dispersão 1:1; 1:2 e 1:4 (v/v) (aumentando a proporção da dispersão de polímero em relação a dispersão de nanopartícula), sob agitação magnética. Em seguida, a dispersão polimérica carregada com as NPs foram gotejadas através de seringa e agulha de irrigação sem bisel 23G 1" (0,6 x 25 mm) em uma solução de cloreto de alumínio (5%; m/v), mantidas em banho de gelo e sob agitação magnética por 10 min. Em seguida, as MPs foram separadas por filtração e secas em estufa com circulação forçada de ar por 24 h (Figura 11).

**Figura 11.** Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P.



#### 5.12.3 *Rendimento (%)*

Para a determinação do rendimento do processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas, estas foram secas até peso constante em dessecador contendo sílica gel, sob vácuo. Desta forma, o rendimento foi determinado como sendo a massa obtida de micropartículas secas dividida pela soma das massas dos polímeros e fármaco utilizados na sua obtenção, através da Equação 8:

$$R(\%) = \frac{m_m}{m_p + m_f} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Em que:  $m_m$  = massa de MP secas,  $m_p$  = massa de polímero e  $m_f$  = massa de fármaco.

#### 5.12.4 Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas

Uma massa conhecida das MPs secas foram pesadas, colocadas em 5 mL de água e trituradas em Ultra-turrax (Turratex TE-102, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 24.000 rpm por 10 min. Para garantir a extração máxima do fármaco, as amostras foram mantidas em agitação vigorosa durante 2 horas. Em seguida, as amostras foram filtradas e o 5-FLU quantificado usando espectrofotometria UV-VIS em 266 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 5.12.5 Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (FEG-MEV)

A análise morfológica das micropartículas carregadas com nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-MEV) em equipamento Inspect F50. Para avaliar a estrutura interna, as micropartículas foram congeladas com nitrogênio líquido e quebradas, em seguida dispostas sobre fita dupla face. O software *Image J* foi utilizado para medir o diâmetro das micropartículas.

### 5.13 Estudo de dissolução do 5-FLU

#### 5.13.1 Estudo de solubilidade do 5-FLU

A solubilidade do 5-FLU foi determinada em fluido gástrico simulado (HCl/KCl pH 1,2), fluido intestinal simulado (tampão fosfato pH 7,4) e fluido colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8) (USP, 2011). 5-FLU foi adicionado em excesso aos diferentes meios testados, a fim de garantir a saturação do meio, e mantido sob agitação mecânica por 48 horas. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm durante 20 min e

o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ . Este sobrenadante foi diluído e analisado pelo método cromatográfico previamente obtido e validado (item 6.2), e a massa de fármaco foi quantificada a partir da equação da reta em cada meio testado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5.13.2 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-FLU

O ensaio de liberação *in vitro* do 5-FLU foi realizado em dissolutor SR-8 Plus Hanson Research<sup>®</sup>, utilizando o aparato II (pá), sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de  $37 \pm 0,4$  °C. Conforme as condições *sink*, um volume da dispersão de nanopartículas e uma massa de micropartículas contendo nanopartículas correspondente a 1,0 mg de 5-FLU foram adicionados em uma membrana de diálise (MWCO = 10 kDa) e, incubados nos meios de dissolução. Foram utilizados diferentes meios, visando mimetizar as variações de pH que ocorre ao longo do TGI: fluido gástrico simulado (HCl/KCl pH 1,2) durante 2 horas, fluido intestinal simulado (tampão fosfato pH 7,4) durante 4 horas e fluido colônico simulado (tampão fosfato pH 6,8) durante 6 horas. Alíquotas (1 mL) foram retiradas nos tempos pré-determinados (com reposição imediata do meio à mesma temperatura), filtradas em membrana de acetato de celulose 0,22  $\mu\text{m}$  e a quantidade de fármaco liberada foi quantificada pelo método analítico de CLAE (item 6.2) em 266 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5.13.3 Análise dos mecanismos de liberação *in vitro* do 5-FLU

Os dados de liberação *in vitro* foram tratados com diferentes modelos matemáticos (Baker-Lonsdale, Primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e Hixson-Crowell) para avaliação de qual melhor representa o mecanismo envolvido no processo de liberação do fármaco.

### **5.14 Estudos de biodistribuição *in vivo* por imagem óptica de pequenos animais**

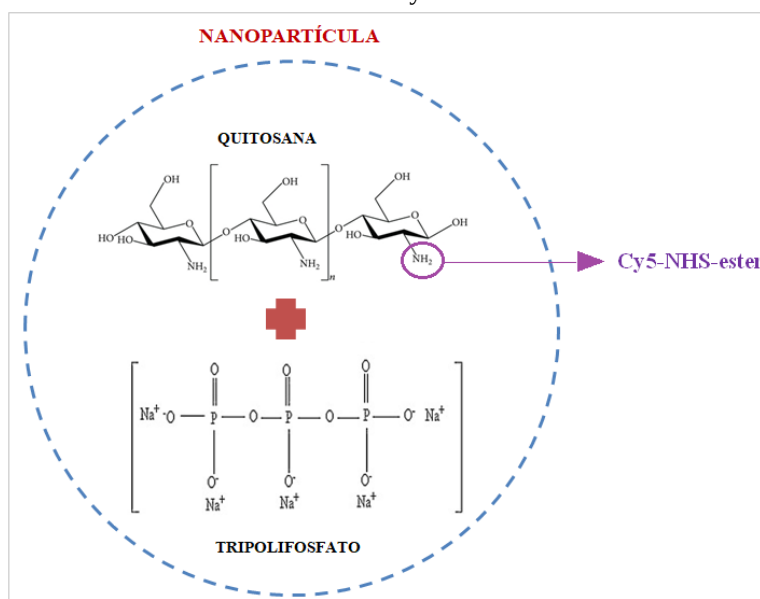
Os estudos de biodistribuição *in vivo* foram realizados no Instituto Australiano de Bioengenharia e Nanotecnologia da Universidade de Queensland, na Austrália, sob a supervisão do Prof. Dr. Kristofer J. Thurecht, durante o período de estágio no exterior (BEPE), financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número processo 2017/25846-0).

### 5.15 Síntese de marcação da quitosana com Cy5

A quitosana foi marcada com corante fluorescente Cianina 5 éster de amina (Cy5-NHS-éster) através da reação dos grupos amino primários da quitosana com grupos éster NHS-ativado do corante (Figura 12). A quitosana (160 mg) foi dissolvida em 32 mL de ácido acético a 1% (v/v), e o valor do pH foi ajustado para 6,5 usando hidróxido de sódio 0,1 M. Posteriormente, DMSO (1,3 mL) contendo 7,54 mg de Cy5-NHS-éster foi adicionado para reagir com o quitosana, sob agitação magnética durante 12 h, em temperatura ambiente. Após a reação, as moléculas livres do corante foram removidas através de diálise (tubo de diálise, MWCO = 10 kDa) usando água e metanol, durante 3 dias, e depois finalmente secas por liofilização.

A eficiência de marcação foi determinada utilizando espectrofotometria UV-vis (Nanodrop 2000C, Thermo Scientific) após dissolução da quitosana marcada com Cy5 em uma mistura 10:90 de DMSO e ácido acético 1% (v/v). A absorbância de Cy5-NHS-éster à 649 nm foi comparada com uma curva de calibração produzida usando uma série de concentrações conhecidas de Cy5-NHS-éster na mesma mistura de solução, na faixa linear entre 1,0 e 40,0 µg/mL. Todas as medidas UV-vis foram realizadas em triplicata.

**Figura 12.** Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da quitosana com Cy5.



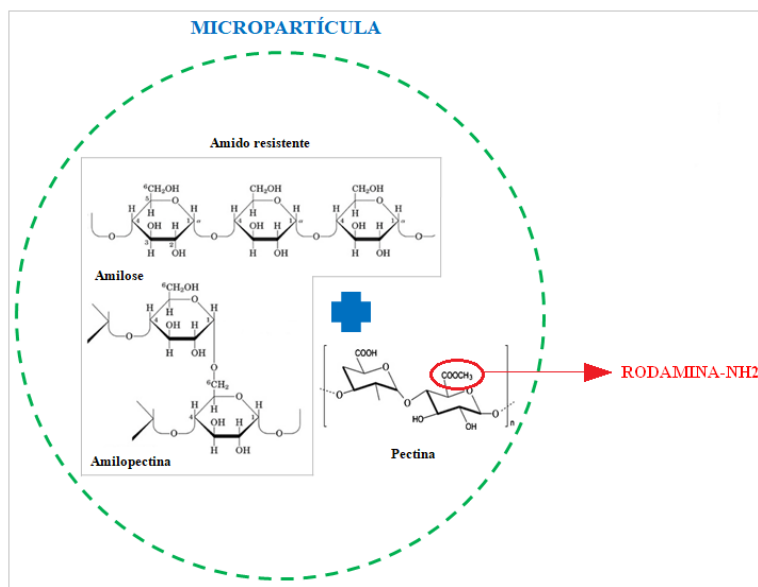
### 5.16 Síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH<sub>2</sub>

A blenda de AR/P foi marcada com corante fluorescente Rodamina-NH<sub>2</sub> (N-(6-Aminohexil) Rodamina 6G-Amida bis(trifluoroacetato)) através da química de carbodiimida, para ligar os grupos amina (-NH<sub>2</sub>) da rodamina com grupos carboxílicos (-COOH) da pectina (Figura 13).

A blenda de AR/P (100 mg) foi dissolvida em 10 ml de água. Em seguida, adicionou-se EDC (10 mg) e NHS (10 mg) para ativar o ácido carboxílico da pectina, e a mistura foi mantida sob agitação durante 12 h. Rodamina-NH<sub>2</sub> (3 mg dissolvida em tampão acetato pH 3,0), foi adicionada e a reação foi agitada durante 48 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi dialisada durante 3 dias utilizando um tubo de diálise (MWCO = 10 kDa), seguido de liofilização.

A eficiência de marcação foi determinada utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 2000C, através da comparação da absorbância de Rodamina-NH<sub>2</sub> em 528 nm com a curva de calibração produzida, no intervalo linear de 1,0 a 35 µg/mL. Todas as medidas UV-vis foram realizadas em triplicata.

**Figura 13.** Ilustração esquemática dos grupos funcionais utilizados na síntese de marcação da blenda de AR/P com o corante Rodamina-NH<sub>2</sub>.



### 5.17 Síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH<sub>2</sub>

A blenda de AR/P foi marcada com corante fluorescente BDP FL amina através da reação dos grupos amino de BDP com grupos carboxílicos da pectina. Para tanto, o AR/P (100 mg), foi dissolvido em 10 mL de água, e em seguida EDC (10 mg) e NHS (10 mg) foram adicionados, e a mistura foi mantida sob agitação durante 12 h. BDP FL amina (2 mg) dissolvida em água Milli-Q, foi adicionado e a reação foi mantida em agitação por 48 h em temperatura ambiente. A reação foi dialisada em tubo de diálise (MWCO = 10 kDa) utilizando água Milli-Q, durante 3 dias, e depois seca por liofilização.

O teor de BDP-NH<sub>2</sub> foi determinado utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000C, através da comparação da absorbância do BDP FL amina em 503 nm com a curva de calibração produzida no intervalo linear de 1,0 a 35 µg/mL. Todas as medidas UV-vis foram realizadas em triplicata.

### 5.18 Preparo das nanopartículas

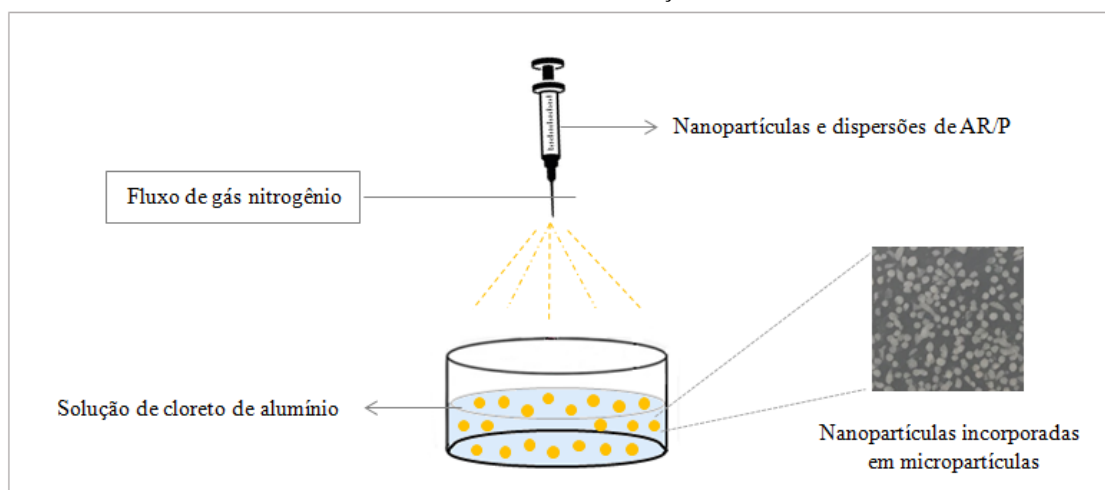
Para os estudos de biodistribuição *in vivo*, foram preparadas as nanopartículas de QS/TPP obtidas pelo método de geleificação ionotrópica usando as proporções de 4:1 (QS/TPP), conforme descrito anteriormente (seção 6.5).

### 5.19 Preparo das micropartículas carregadas com nanopartículas

As micropartículas de AR/P foram preparadas usando o método de geleificação ionotrópica, usando a proporção 1:4 (v/v) da dispersão de nanopartículas em relação a dispersão de AR/P (proporção com maior eficiência de encapsulação de nanopartículas nas micropartículas, item 6.10.2).

Para tal, as nanopartículas foram misturadas com a dispersão de AR/P, e em seguida essa mistura foi adicionada em solução de cloreto de alumínio (5%; m/v) usando uma seringa com uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min. O método de aerossolização foi usado para reduzir o tamanho das micropartículas. Para tanto, um fluxo de gás nitrogênio foi adicionado na frente da agulha para atomizar a solução e obter partículas menores (Figura 14).

**Figura 14.** Processo de obtenção das nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P usando o método de aerossolização.



#### 5.19.1 Determinação do tamanho das micropartículas

O tamanho das micropartículas foi determinado através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) a 25 ° C, com um ângulo de espalhamento de 173°.

#### 5.19.2 Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas

A eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas foi determinada por espectroscopia UV-vis (espectrofotômetro Nanodrop 2000C, Thermo Scientific). Uma quantidade conhecida de micropartículas foram degradadas em solução tampão de fosfato (pH 7,4) sob agitação vigorosa, seguida de centrifugação (10.000 RCF) durante 5 min. A concentração de 5-FLU no sobrenadante foi determinada por espectroscopia UV-vis em 266 nm, baseado na curva de calibração.

#### 5.19.3 Imagem confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas

A imagem de micropartículas carregadas com nanopartículas, foi realizada no Núcleo Australiano de Nanofabricação de Queensland, usando um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss 710 (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com lasers de hélio-néon e argônio. As soluções de micropartículas foram colocadas em placas, e

imagens foram adquiridas usando o objetivo de 40x. O sinal de Cy5 foi excitado usando a linha de laser de 633 nm, e a emissão de fluorescência foi coletada entre 638 e 759 nm. As imagens de Z-stack foram reconstruídas como modelos tridimensionais usando a função de visualizador 3D embutido no Zen Software (Carl Zeiss, Alemanha).

#### 5.19.4 Avaliação da biodistribuição in vivo das nanopartículas e das micropartículas carregadas com nanopartículas através de imagem óptica de pequenos animais

Neste estudo, um total de 20 camundongos Balb-c (fêmeas 17-22 g, oito semanas) foram utilizados, e todos os animais foram alimentados com uma dieta de baixa fluorescência uma semana antes da administração oral das amostras para minimizar o sinal de fluorescência de fundo proveniente do alimento digerido.

Os 20 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: um grupo de nanopartículas marcadas com Cy5 (8 ratos), um grupo de micropartículas carregadas com nanopartículas marcadas com Cy5 (8 ratos) e um grupo controle que recebeu uma solução de salina (4 ratos). Amostras (0,2 mL de nanopartículas e/ou micropartículas carregadas com nanopartículas suspensas em água) foram administradas por via oral (gavagem). Para avaliar o comportamento da biodistribuição de nanopartículas, bem como micropartículas carregadas com nanopartículas, dois ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, em cada tempo de 0,5; 2; 6 e 24 h após a administração oral (ou um único animal para o grupo controle para gerar fluorescência de fundo). Os TGI e os principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) de todos os animais foram removidos após eutanásia, e imagens foram imediatamente adquiridas.

O experimento com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Queensland, em conformidade com as diretrizes do Código de Prática Australiano para o cuidado e uso de animais para fins científicos (AEC:AIBN/CAI/530/15/ARC/NHMRC).

#### 5.19.5 Protocolo de aquisição de imagem

As imagens foram adquiridas usando um Bruker Carestream MSFX PRO (Bruker / CareStream, Rochester, NY) em conjunto com Bruker Carestream Imaging Software MI. As imagens de fluorescência foram coletadas com excitação/emissão a  $630 \pm 10/700 \pm 17,5$  nm (sinal de quitosana marcado com Cy5), 4 x 4 binning, f-stop

2,80, FOV 190 mm e 60 s de tempo de aquisição. As imagens de raios X também foram adquiridas usando as seguintes configurações do instrumento: f-stop 2,80, filtro de raios X 0,2 mm, FOV 190 mm e tempo de aquisição de 10 s.

Todas as imagens foram processadas usando o programa Image-J executando o plug bioformats. As imagens de fluorescência eram de cor falsa e cobertas por imagens de raios-X.

## **5.20 Análise estatística**

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

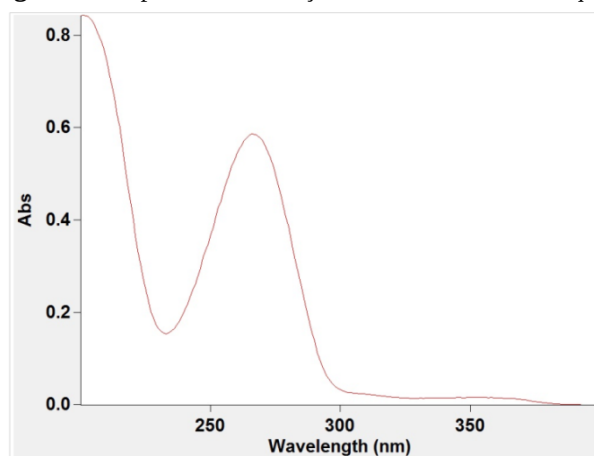
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do 5-FLU por espectrofotometria na região do ultravioleta

#### 6.1.1 *Determinação do espectro de absorção do 5-FLU na região do UV-Vis*

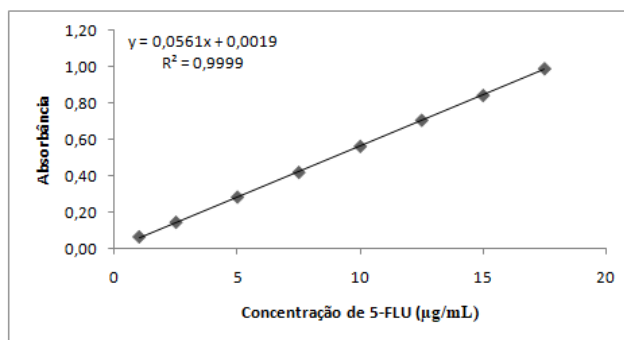
O espectro de absorção do 5-FLU em meio aquoso, foi obtido por espectrofotometria UV-vis. O pico de absorção máxima em 266 nm, foi selecionado para as análises quantitativas do fármaco (Figura 15).

**Figura 15.** Espectro de absorção do 5-FLU em meio aquoso.



#### 6.1.2 *Linearidade*

A curva analítica do 5-FLU foi construída com base no valor da absorbância em função da concentração do fármaco (Figura 16). A linearidade foi confirmada pelo coeficiente de correlação ( $r^2$ ), estando de acordo com o preconizado pela ANVISA, comprovando a linearidade do método para o intervalo estabelecido (BRASIL, 2017).

**Figura 16.** Curva analítica do 5-FLU obtido por espectrofotometria UV-vis.

### 6.1.3 Precisão

A Tabela 3 apresenta os resultados de precisão intracorrida e intercorrida. O método proposto é preciso para a quantificação do 5-FLU, uma vez que os valores do D.P.R% foram menores que 5% (BRASIL, 2017).

**Tabela 3.** Dados de precisão intracorrida e intercorrida do 5-FLU.

| Intracorrida                                      |                                                        |      |        | Intercorrida                                           |      |        |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------|--------|--------------------------------------------------------|------|--------|
| Concentração<br>teórica<br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | Concentração<br>experimental<br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | DP   | D.P.R% | Concentração<br>experimental<br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | DP   | D.P.R% |
| 5                                                 | 5,09                                                   | 0,03 | 1,44   | 4,96                                                   | 0,09 | 0,78   |
| 10                                                | 10,13                                                  | 0,02 | 0,97   | 10,56                                                  | 0,06 | 1,39   |
| 15                                                | 15,47                                                  | 0,05 | 1,23   | 15,71                                                  | 0,13 | 1,05   |

### 6.1.4 Exatidão

Conforme a Tabela 4, os valores obtidos para exatidão demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a quantificação do 5-FLU, já que os valores estão dentro da faixa de 80 a 120% (BRASIL, 2017).

**Tabela 4.** Resultados obtidos para a exatidão.

| Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Exatidão % |
|------------------------------------------------|------------|
| 5                                              | 101,29     |
| 10                                             | 99,17      |
| 15                                             | 102,06     |

#### 6.1.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

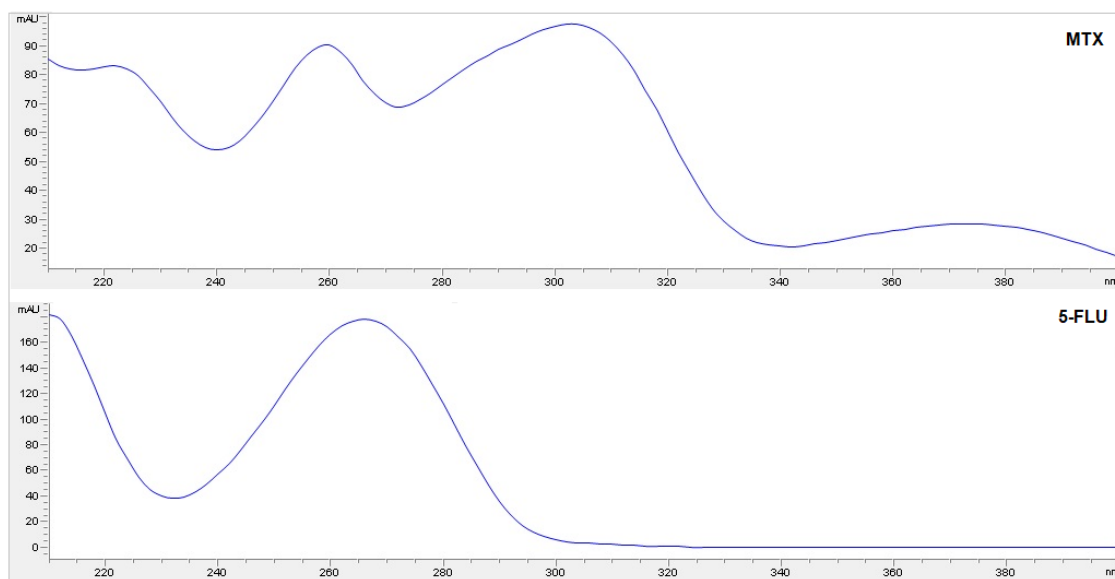
Os valores obtidos para LD e LQ foram 0,202 e 0,639  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, demonstrando que a metodologia é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações do 5-FLU em meio aquoso.

### 6.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do MTX e 5-FLU por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

#### 6.2.1 Determinação do espectro de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU em fase móvel

Os espectros de absorção do MTX e 5-FLU na região do UV, obtidos em fase móvel tampão acetato de amônio:metanol (70:30), com o comprimento de onda de máxima absorção em 303 e 266 nm, respectivamente, estão representados na Figura 17.

**Figura 17.** Espectros de absorção na região do UV do MTX e 5-FLU.



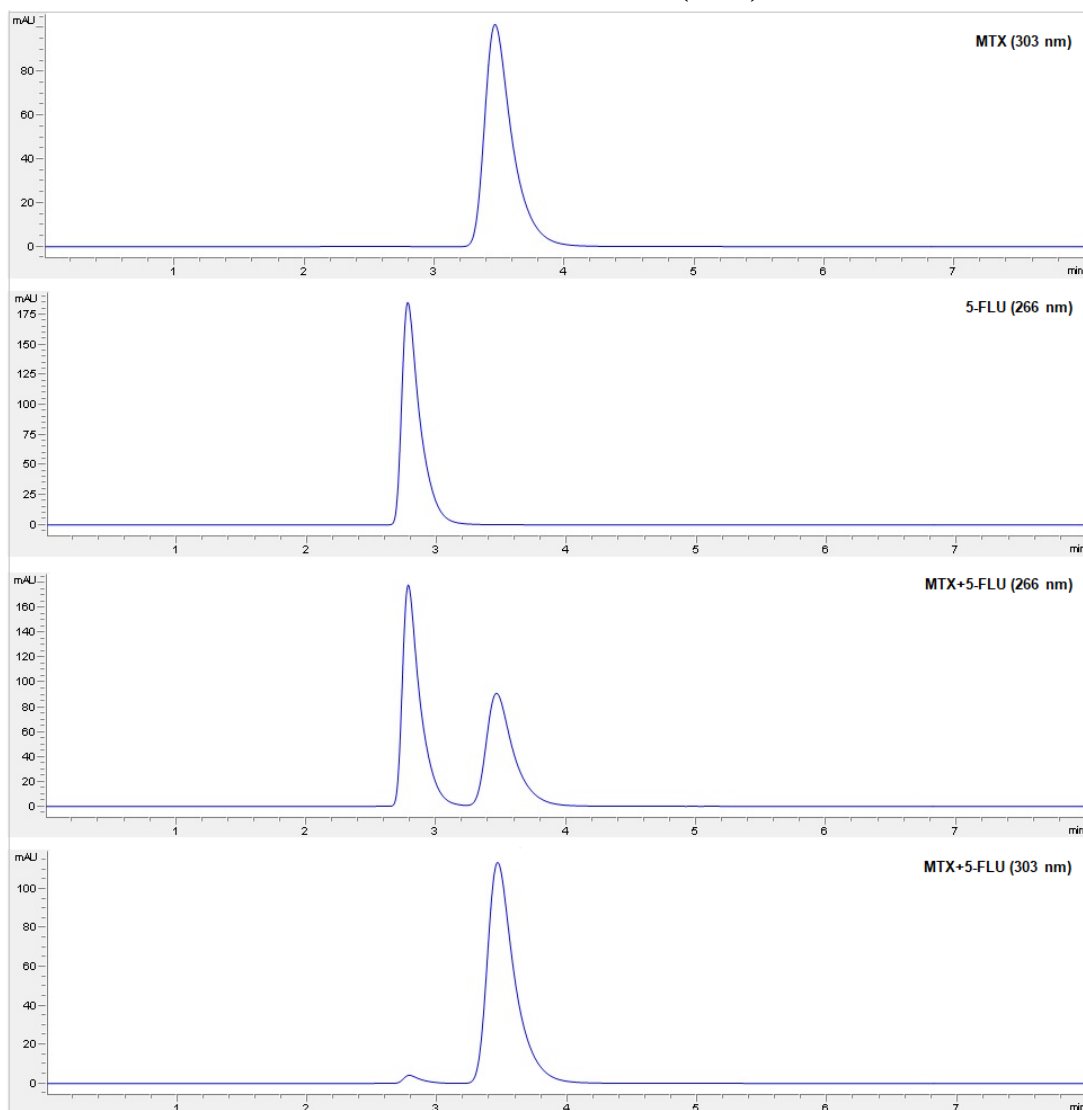
### 6.2.2 Conformidade do sistema cromatográfico

Para demonstrar a resolução e a simetria do pico, os cromatogramas correspondentes ao MTX e 5-FLU, assim como do MTX+5-FLU (quantificados juntos) estão expostos na Figura 18.

Além disso, foi avaliado a resolução entre as bandas cromatográficas do MTX e 5-FLU, e o valor obtido para o cálculo da resolução foi de 1,26, indicando a qualidade da separação entre as bandas cromatográficas do MTX e 5-FLU, uma vez que valores maiores que 1,25 (ou 1,5) são preconizados para a resolução completa. Desta forma, estes resultados demonstram que os fármacos MTX e 5-FLU podem ser quantificados juntos, uma vez que os cromatogramas não apresentaram interferência, quando os fármacos foram quantificados em conjunto por CLAE.

Posteriormente, foi analisado a conformidade do método cromatográfico do MTX e 5-FLU, e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e 6, respectivamente.

**Figura 18.** Cromatogramas do MTX, 5-FLU e MTX+5-FLU ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtidos em fase móvel tampão acetato de amônio e metanol (70:30).



Conforme as Tabelas 5 e 6, as médias dos valores dos fatores de assimetria e de cauda foram menores do que o limite preconizado de 2,0 para o MTX e o 5-FLU. O número de pratos teóricos obtidos para o 5-FLU foi superior a 2000 conforme preconizado, no entanto os valores encontrados para o MTX ficaram bem próximos a este valor, 1922.

Além disso, os valores de D.P.R% se encontram abaixo de 2% demonstrando precisão entre os valores de  $t_R$  e área dos picos cromatográficos para o MTX e 5-FLU (BRASIL, 2017; USP, 2011). Estes resultados indicam que o método desenvolvido é adequado para a quantificação do MTX e 5-FLU por CLAE.

**Tabela 5.** Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do MTX.

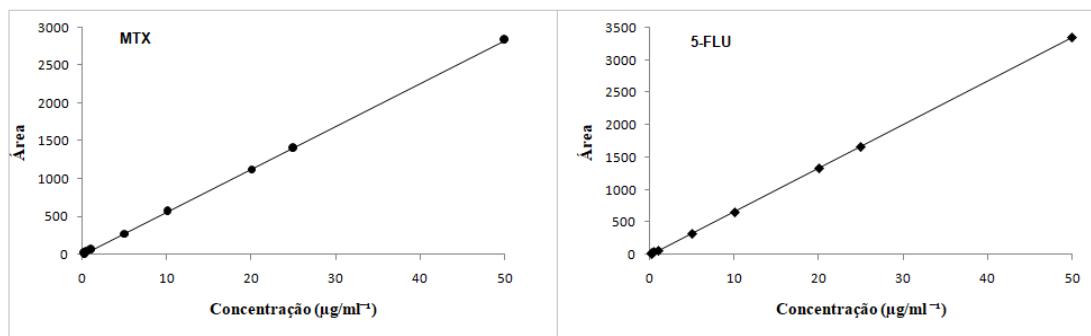
| Injeções       | Área     | tR    | Simetria do<br>pico 10% | Fator de<br>cauda | Nº de pratos<br>teóricos |
|----------------|----------|-------|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| 1              | 1403,26  | 3,457 | 1,462                   | 1,542             | 1925                     |
| 2              | 1406,75  | 3,457 | 1,485                   | 1,569             | 1896                     |
| 3              | 1400,79  | 3,451 | 1,486                   | 1,592             | 1891                     |
| 4              | 1409,42  | 3,454 | 1,471                   | 1,546             | 1912                     |
| 5              | 1400,55  | 3,450 | 1,507                   | 1,588             | 1986                     |
| <b>Média</b>   | 1404,154 | 3,454 | 1,482                   | 1,567             | 1922                     |
| <b>DP</b>      | 3,869    | 0,003 | 0,017                   | 0,023             | 38,216                   |
| <b>D.P.R %</b> | 0,275    | 0,091 | 1,161                   | 1,470             | 1,988                    |

**Tabela 6.** Parâmetros da conformidade do método cromatográfico desenvolvido para determinação do 5-FLU.

| Injeções       | Área     | tR    | Simetria do<br>pico 10% | Fator de<br>cauda | Nº de pratos<br>teóricos |
|----------------|----------|-------|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| 1              | 1661,67  | 2,775 | 1,770                   | 1,849             | 2229                     |
| 2              | 1659,35  | 2,774 | 1,745                   | 1,827             | 2229                     |
| 3              | 1651,29  | 2,771 | 1,802                   | 1,894             | 2278                     |
| 4              | 1666,61  | 2,772 | 1,828                   | 1,839             | 2177                     |
| 5              | 1666,72  | 2,772 | 1,818                   | 1,915             | 2188                     |
| <b>Média</b>   | 1661,128 | 2,773 | 1,793                   | 1,865             | 2220,2                   |
| <b>DP</b>      | 6,355    | 0,002 | 0,034                   | 0,038             | 39,996                   |
| <b>D.P.R %</b> | 0,383    | 0,062 | 1,920                   | 2,026             | 1,801                    |

### 6.2.3 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método analítico mostrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo de concentrações específico (BRASIL, 2017). As curvas analíticas foram construídas para MTX e 5-FLU (Figura 19), a partir da média dos valores das áreas obtidas em função da concentração de fármaco.

**Figura 19.** Curva analítica do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE.

Os dados obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas do MTX e 5-FLU estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados das curvas analíticas obtidas por CLAE.

| Parâmetros                        | MTX    | 5-FLU  |
|-----------------------------------|--------|--------|
| <b>Coefficiente linear</b>        | 56,633 | 67,053 |
| <b>Intercepto</b>                 | -1,191 | -6,696 |
| <b>Coefficiente de correlação</b> | 0,999  | 0,999  |

Conforme a Tabela 7, os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) obtidos para MTX e 5-FLU estão de acordo com o preconizado pela ANVISA, confirmando a linearidade do método para o intervalo estabelecido.

#### 6.2.4 Precisão

A precisão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas produzidas para uma mesma amostra (BRASIL, 2017).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para a precisão intracorrida e intercorrida para o MTX e 5-FLU.

**Tabela 8.** Dados de precisão intracorrida e intercorrida do MTX e 5-FLU quantificados por CLAE.

| Amostras | Intracorrida                                   |                                                     |      |         | Intercorrida                                        |      |         |
|----------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------|---------|-----------------------------------------------------|------|---------|
|          | Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Concentração experimental ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | DP   | D.P.R % | Concentração experimental ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | DP   | D.P.R % |
| MTX      | 1                                              | 1,04                                                | 0,01 | 0,72    | 1,05                                                | 0,00 | 0,40    |
|          | 10                                             | 10,11                                               | 0,03 | 0,31    | 10,11                                               | 0,01 | 0,05    |
|          | 25                                             | 24,81                                               | 0,09 | 0,36    | 24,77                                               | 0,05 | 0,19    |
| 5-FLU    | 1                                              | 1,08                                                | 0,02 | 1,44    | 1,06                                                | 0,01 | 1,16    |
|          | 10                                             | 9,70                                                | 0,04 | 0,38    | 9,61                                                | 0,02 | 0,20    |
|          | 25                                             | 24,91                                               | 0,07 | 0,29    | 23,83                                               | 0,14 | 0,59    |

O método desenvolvido para a quantificação do MTX e 5-FLU é preciso, uma vez que os valores de D.P.R% foram menores que 5%, conforme os limites aceitáveis pela ANVISA (BRASIL, 2017).

#### 6.2.5 Exatidão

Exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em relação ao valor teórico real (BRASIL, 2017).

Os valores obtidos no teste de exatidão, demonstram que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação do MTX e 5-FLU (Tabela 9), já que os valores de exatidão estão dentro da faixa de 80 a 120%, conforme recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2017).

**Tabela 9.** Resultados obtidos para a exatidão do método analítico para quantificação do MTX e 5-FLU.

| Amostras | Concentração teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Exatidão (%) |
|----------|------------------------------------------------|--------------|
| MTX      | 1                                              | 104,92       |
|          | 10                                             | 101,07       |
|          | 25                                             | 99,09        |
| 5-FLU    | 1                                              | 105,91       |
|          | 10                                             | 96,07        |
|          | 25                                             | 95,30        |

#### 6.2.6 *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do fármaco presente na amostra que o método consegue detectar, porém não necessariamente quantificado com exatidão, enquanto que o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de fármaco presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método desenvolvido (BRASIL, 2017).

Os valores de LD e LQ obtidos, demonstram a capacidade da metodologia desenvolvida de detectar e quantificar baixas concentrações de MTX e 5-FLU (Tabela 10).

**Tabela 10.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do MTX e 5-FLU por CLAE.

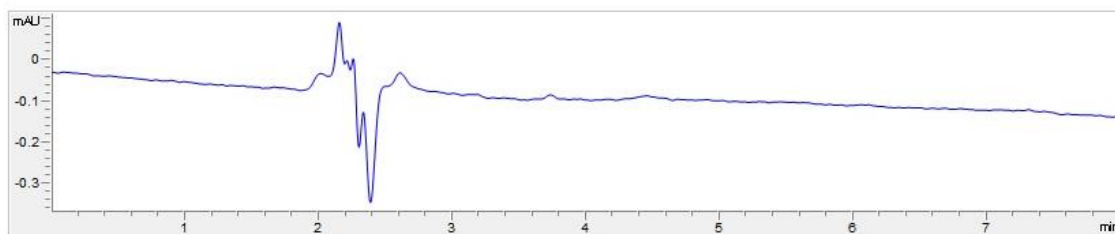
| Parâmetros                                        | MTX   | 5-FLU |
|---------------------------------------------------|-------|-------|
| Limite de detecção ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )      | 0,106 | 0,163 |
| Limite de quantificação ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | 0,353 | 0,544 |

#### 6.2.7 *Especificidade/Seletividade*

A especificidade/seletividade baseia-se na capacidade do método analítico quantificar exatamente uma substância na presença de outros compostos, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

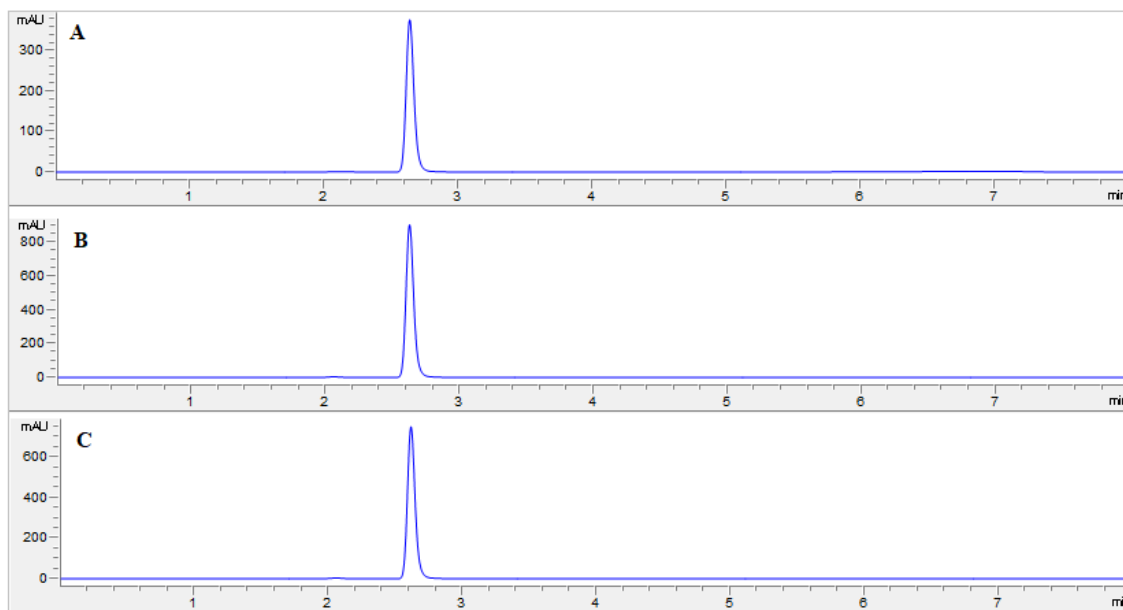
Conforme a Figura 20, não foi observado qualquer tipo de interferência dos polímeros QS e TPP no tR do 5-FLU, demonstrando que o método é seletivo e específico.

**Figura 20.** Cromatograma do sobrenadante das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP).



Os cromatogramas das soluções de 5-FLU ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtidos nos meios HCl/KCl (pH 1,2) e tampão fosfato (pH 6,8 e pH 7,4) demonstraram que não há nenhuma interferência no tR do fármaco para todos os meios analisados (Figura 21).

**Figura 21.** Cromatogramas das soluções de 5-FLU em: (A) HCl/KCl pH 1,2, (B) tampão fosfato pH 6,8 e (C) tampão fosfato pH 7,4.



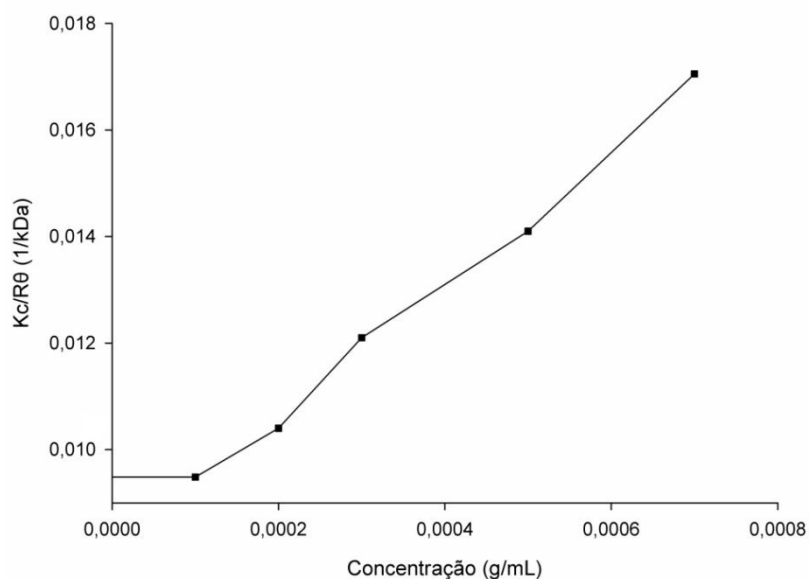
### 6.3 Caracterização do polímero Quitosana

### 6.3.1 Determinação da massa molar e segundo coeficiente virial ( $A_2$ )

A massa molar dos polímeros está relacionada ao tamanho da cadeia polimérica e pode influenciar a formação das nanopartículas através de uma série de fatores, como o tamanho e forma da partícula, eficiência de encapsulação, taxas de liberação do fármaco e na capacidade mucoadesiva do sistema (GUPTA, 2016).

A massa molar média da QS foi obtida a partir da construção do gráfico de Debye, o qual relaciona concentração vs intensidade de espalhamento ( $Kc/R\theta$ ), sendo que a intensidade de luz espalhada através da partícula proporcional à sua concentração (Figura 22). A massa molar da QS disponível comercialmente está compreendido entre 50-200 kDa (Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/48869?lang=en&region=US>> Acesso em: 31 de Mar. de 2017). Neste estudo, a QS utilizada no desenvolvimento das nanopartículas apresentou massa molar média de  $104,50 \pm 2,12$  kDa, sendo classificada de baixa massa molar. Estudos relatam que a QS de baixa massa molar apresenta características promissoras para a formação de partículas menores e esféricas, comparado com a QS de média e alta massa molar (ING et al., 2012; KATAS; ALPAR, 2006; WU et al., 2005). A massa molar média da QS também é um importante parâmetro para os cálculos de síntese de acoplamento da quitosana, realizados neste trabalho.

**Figura 22.** Gráfico de Debye.



O segundo coeficiente virial ( $A_2$ ) é obtido a partir da equação da reta do gráfico de Debye, que descreve a força de interação entre o polímero e o solvente (interações polímero-polímero e polímero-solvente) (RODEMBUSCH, 2001). Para a QS o valor de  $A_2$  foi positivo ( $0,004255 \pm 9.27.10^{-5} \text{ mL.mol/g}^2$ ), indicando uma forte interação polímero-solvente, o que significa que o solvente escolhido é adequado para a solvatação das cadeias poliméricas. Por outro lado, se o  $A_2$  apresentar valor negativo significa que está ocorrendo forte interação inter e intramolecular, o que pode contribuir para agregação (MURPHY, 1997; RODEMBUSCH, 2001).

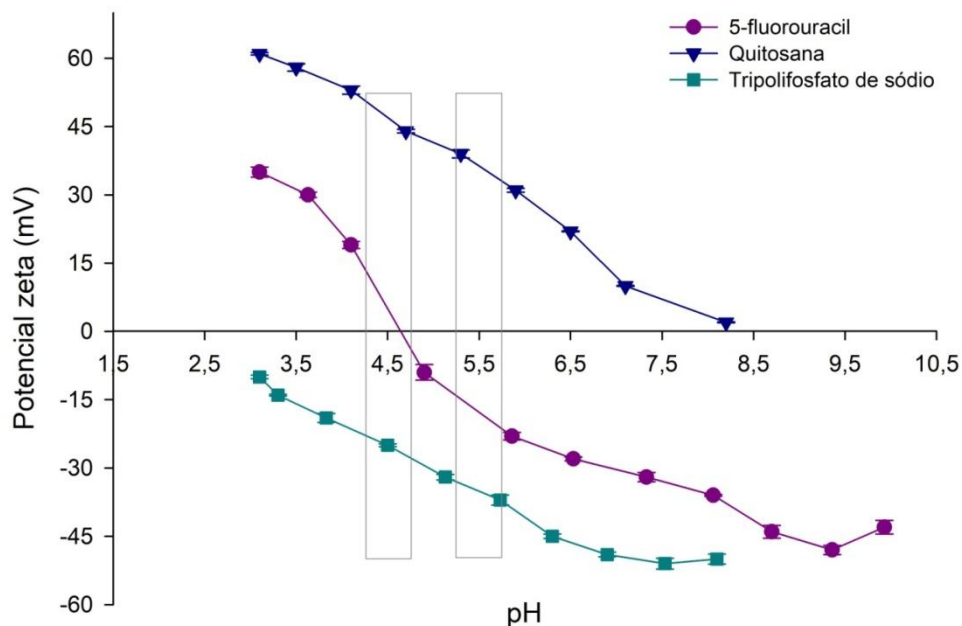
Desta forma, a escolha do solvente adequado pode minimizar a agregação intermolecular, favorecendo para que os grupamentos amina da quitosana estejam mais disponíveis para interação eletrostática durante a formação das nanopartículas (VALENTE et al., 2006).

## **6.4 Otimização das condições para o desenvolvimento das nanopartículas**

### **6.4.1 Análise do potencial zeta em função do pH**

As nanopartículas preparadas pelo método de geleificação ionotrópica são formadas através das interações eletrostáticas entre íons de fosfato do TPP carregados negativamente e grupos amino da quitosana carregados positivamente (RÁZGA et al., 2016). Desta maneira, analisou-se a influência do potencial zeta da QS, TPP e 5-FLU em função do pH do meio, para avaliar a melhor faixa de pH que os componentes da formulação apresentam elevada densidade de cargas para a formação das NPs (Figura 23).

**Figura 23.** Influência do potencial zeta em função do pH do 5-fluorouracil, quitosana e tripolifosfato de sódio.



A QS apresentou uma alta densidade de carga para os valores de pH entre 3,5 e 5,5, com valores de potencial zeta entre +58 mV e +40 mV, enquanto que a partir do pH 6,0 houve uma redução da densidade de carga da QS, atingindo valores de +10 mV para pH 7,0. Essa redução dos valores de potencial zeta é devido aos valores de pH acima do pKa da QS (pKa 6,3), em que ocorre a diminuição do grau de protonação dos grupamentos amino primários da QS, podendo favorecer a agregação das partículas durante o preparo das NPs (BHUMKAR; POKHARKAR, 2006).

O TPP apresentou valores de potencial zeta na faixa de -25 mV e -45 mV para valores de pH 4,5 e 6,5, respectivamente. Abaixo do valor de pH 4, houve uma redução da densidade de carga negativa do TPP, o que diminui sua capacidade de reticulação.

Já o 5-FLU apresentou valores de potencial zeta praticamente neutro a pH 4,5 e um valor potencial zeta cerca de -15 mV a pH 5,5. Além disso, é possível observar um aumento da carga negativa do 5-FLU com o aumento dos valores de pH, devido ao valor de pKa do 5-FLU (~8,0)

A partir dos resultados, o intervalo de pH de 4,5 e 5,5 foi escolhido para o desenvolvimento das nanopartículas, visto que um potencial zeta relativamente alto foi obtido para a QS nesta faixa, favorecendo a reticulação com as cargas opostas do TPP. Além disso, nesta faixa de pH o fármaco apresentou valores de potencial zeta quase

nulos, e também uma densidade de carga negativa, que pode levar à uma complexação com as cargas positivas da quitosana durante a formação das NPs.

### 6.5 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

Durante o processo de complexação entre QS e TPP, diversos fatores físico-químicos e parâmetros como concentração polimérica, pH e carregamento com fármaco podem afetar as propriedades das nanopartículas, tais como tamanho de partícula, PDI e potencial zeta.

Na fase preliminar de desenvolvimento, otimizamos as condições de obtenção das nanopartículas variando somente as proporções de QS em relação ao TPP, a fim de avaliar a interação da QS com TPP na formação das nanopartículas, sem a adição de fármaco. O preparo das amostras foi realizado em pH 4,5, e a massa polimérica total foi a mesma para todas as proporções testadas de QS/TPP.

Para isso, os parâmetros avaliados foram diâmetro médio, PDI, potencial zeta e a aparência macroscópica da dispersão segundo a seguinte classificação visual: dispersão límpida (L), dispersão opalescente (O) ou formação de agregado (A). Os resultados estão dispostos na Tabela 11.

**Tabela 11.** Avaliação da influência da variação de massa de quitosana no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco.

| Proporções (m/m) |     | Diâmetro médio    | PDI               | Potencial zeta     | Classificação |
|------------------|-----|-------------------|-------------------|--------------------|---------------|
| QS               | TPP | (nm)              |                   | (mV)               | visual        |
| 1                | 1   | -                 | $\geq 1,000$      | -                  | A             |
| 2                | 1   | -                 | $\geq 1,000$      | -                  | A             |
| 2,5              | 1   | $347,53 \pm 3,53$ | $0,429 \pm 0,03$  | $+ 19,50 \pm 1,40$ | O             |
| 3                | 1   | $214,96 \pm 4,98$ | $0,409 \pm 0,07$  | $+ 24,06 \pm 2,43$ | O             |
| 3,5              | 1   | $239,16 \pm 2,41$ | $0,280 \pm 0,005$ | $+ 27,30 \pm 2,60$ | O             |
| 4                | 1   | $201,46 \pm 2,96$ | $0,450 \pm 0,02$  | $+ 30,06 \pm 0,70$ | O             |
| 6                | 1   | $236,76 \pm 3,25$ | $0,477 \pm 0,005$ | $+ 31,50 \pm 4,47$ | L             |

Para as amostras contendo QS/TPP 1:1 e 2:1, foi observada a formação de agregados de partículas, detectado visualmente através da formação de precipitados.

O aumento da proporção de QS resultou na formação de nanopartículas (característica opalescente), provavelmente devido à maior concentração polimérica no sistema e, conseqüentemente, um maior número de grupamentos amino da QS, carregados positivamente disponíveis para o processo de reticulação com TPP. Essas partículas apresentaram diâmetro médio entre 201,46 a 347,53 nm, com valores de PDI entre 0,28 a 0,45, demonstrando a homogeneidade na distribuição de tamanho. Observou-se ainda, que o aumento da proporção da QS, promoveu um aumento nos valores de potencial zeta, que variou entre + 19,50 a + 31,50 mV, devido à maior densidade de cargas positivas.

A partir da proporção de QS/TPP 6:1, houve a formação de uma solução límpida, possivelmente devido ao excesso da QS. Conseqüentemente, a quantidade de TPP não foi suficiente para reticular completamente as cadeias de QS, resultando em uma menor quantidade de partículas no meio (HASSANI et al., 2015).

Esses resultados demonstram que a variação da proporção de massa da QS influenciou na formação das nanopartículas. Comportamento semelhante foi relatado por Sreekumar e colaboradores (2018), em que os autores observaram que o principal fator que influenciou o diâmetro médio das partículas foi a concentração de QS (SREEKUMAR et al., 2018).

Em seguida, com base nesses resultados, foram selecionadas as amostras que apresentaram característica opalescente, a fim de avaliar a influência do aumento da proporção de massa do TPP (1,25). Os resultados do diâmetro médio, PDI, potencial zeta e a aparência macroscópica da dispersão estão representados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Avaliação da influência do aumento da proporção de massa de TPP no diâmetro médio, PDI, potencial zeta e na aparência macroscópica das nanopartículas, sem adição de fármaco.

| Proporções (m/m) |      | Diâmetro médio | PDI          | Potencial zeta | Classificação |
|------------------|------|----------------|--------------|----------------|---------------|
| QS               | TPP  | (nm)           |              | (mV)           | visual        |
| 2,5              | 1,25 | 297,26 ± 2,47  | 0,453 ± 0,03 | + 15,86 ± 1,53 | O             |
| 3                | 1,25 | 372,43 ± 6,08  | 0,359 ± 0,04 | + 17,13 ± 1,45 | O             |
| 3,5              | 1,25 | 335,16 ± 4,44  | 0,452 ± 0,08 | + 16,73 ± 0,96 | O             |
| 4                | 1,25 | 242,80 ± 2,07  | 0,318 ± 0,09 | + 23,46 ± 1,79 | O             |

O aumento da proporção de TPP aos sistemas selecionados promoveu um aumento no diâmetro médio das partículas, exceto para a amostra 2,5:1,25 QS/TPP. Por outro lado, a aparência opalescente de todas as amostras foi mantida. O mesmo comportamento foi observado por Tiğli Aydin e Pulat (2012) e Hassani e colaboradores (2015), em que o aumento da proporção de TPP resultou em partículas com diâmetros maiores (HASSANI et al., 2015; TIĞLI AYDIN; PULAT, 2012).

Observou-se ainda, que para as amostras contendo QS/TPP nas proporções 2,5:1,25, 3:1,25 e 3,5:1,25 (exceto para 4:1,25), houve uma redução nos valores de potencial zeta (valores abaixo de +18 mV), devido a maior concentração de íons fosfato carregados negativamente. Consequentemente, essa densidade de carga reduzida pode favorecer a agregação das partículas, resultando em sistemas menos estáveis.

Desta forma, as proporções de massa QS/TPP é um parâmetro fundamental para formação de nanopartículas, uma vez que afeta a eficiência de reticulação QS/TPP.

Para a incorporação do fármaco, foram selecionadas as amostras com maior proporção de QS em relação ao TPP (2,5:1, 3:1, 3,5:1 e 4:1), as quais apresentaram tamanhos nanométricos, homogeneidade na distribuição de tamanho, elevado potencial zeta e a característica visualmente opalescente. Além disso, a amostra 4:1,25 também foi escolhida por apresentar essas mesmas propriedades desejáveis.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do pH e a ordem da adição dos componentes na formação das nanopartículas. Desta maneira, as nanopartículas foram obtidas utilizando valores de pH 4,5 e 5,5 da dispersão de QS (visto que a QS apresentou elevada densidade de carga positiva), e através de duas metodologias diferentes: i) 5-FLU adicionado na solução de QS, ii) 5-FLU adicionado na solução de TPP.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, quando o 5-FLU foi adicionado na solução de QS em pH 4,5, resultou na obtenção de partículas com diâmetro médio entre 122,2 a 149,1 nm, e o PDI variou de 0,24 a 0,35, demonstrando homogeneidade na distribuição de tamanho, além de elevado valores de potencial zeta (+21,6 a +34,3 mV).

Por outro lado, a adição do 5-FLU na solução de TPP em pH 4,5, promoveu um aumento no diâmetro médio das partículas (262,6 a 301,5 nm) bem como nos valores de PDI (0,68 a 0,89), demonstrando heterogeneidade na distribuição do tamanho de partículas e, indicando sistemas polidispersos. Embora em pH 4,5 o 5-FLU apresentou valor de potencial zeta praticamente neutro, a adição do 5-FLU na solução de TPP pode

ter levado a diminuição da densidade de carga negativa do TPP e, assim reduziu a força repulsiva eletrostática entre as partículas, favorecendo a agregação. Li e colaboradores (2011) observaram que a dissolução de 5-FLU e leucovorina na solução de TPP resultou na diminuição do valor de pH e, conseqüentemente, na densidade de carga negativa da solução de TPP (LI et al., 2011).

Em relação ao potencial zeta, as amostras em que o 5-FLU foi adicionado na solução de QS apresentaram valores entre +23,7 e +35,3 mV, e para as amostras que o fármaco foi adicionado na solução de TPP, os valores encontrados foram entre +21,6 e +34,3 mV, indicando uma discreta diminuição no potencial zeta (Tabela 13).

Além disso, foi observado que o pH final para todas as amostras não alterou e manteve-se próximo à 4,5, preservando as características favoráveis para a formação das nanopartículas.

**Tabela 13.** Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 4,5 (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Proporções QS:TPP:5-<br>FLU (m/m/m) | Adição 5-<br>FLU | Diâmetro médio<br>(nm) | PDI               | Potencial zeta<br>(mV) | pH<br>final |
|-------------------------------------|------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------|
| 2,5:1:1                             | F+QS             | 124,7 $\pm$ 1,60       | 0,245 $\pm$ 0,008 | + 23,7 $\pm$ 1,00      | 4,57        |
| 3:1:1                               | F+QS             | 122,2 $\pm$ 0,60       | 0,278 $\pm$ 0,003 | + 29,3 $\pm$ 1,72      | 4,56        |
| 3,5:1:1                             | F+QS             | 139,4 $\pm$ 2,23       | 0,299 $\pm$ 0,009 | + 31,9 $\pm$ 1,99      | 4,62        |
| 4:1:1                               | F+QS             | 155,0 $\pm$ 4,95       | 0,350 $\pm$ 0,037 | + 35,3 $\pm$ 3,00      | 4,54        |
| 4:1,25:1                            | F+QS             | 149,1 $\pm$ 0,75       | 0,303 $\pm$ 0,001 | + 33,6 $\pm$ 1,65      | 4,58        |
| 2,5:1:1                             | F+TPP            | 262,6 $\pm$ 2,28       | 0,779 $\pm$ 0,103 | + 21,6 $\pm$ 2,10      | 4,59        |
| 3:1:1                               | F+TPP            | 277,2 $\pm$ 4,90       | 0,874 $\pm$ 0,010 | + 27,1 $\pm$ 2,17      | 4,56        |
| 3,5:1:1                             | F+TPP            | 297,1 $\pm$ 3,55       | 0,895 $\pm$ 0,059 | + 29,9 $\pm$ 2,10      | 4,61        |
| 4:1:1                               | F+TPP            | 301,5 $\pm$ 4,20       | 0,683 $\pm$ 0,030 | + 34,3 $\pm$ 3,19      | 4,63        |
| 4:1,25:1                            | F+TPP            | 292,3 $\pm$ 1,27       | 0,745 $\pm$ 0,058 | + 31,9 $\pm$ 2,70      | 4,57        |

Para as nanopartículas obtidas em pH 5,5, o mesmo comportamento foi observado quando o fármaco foi adicionado na solução de TPP, apresentando valores de PDI acima de 0,5, caracterizando sistemas polidispersos. Além disso, ao adicionar o 5-FLU na solução de TPP também ocorreu um aumento no diâmetro médio das partículas, comparado com as amostras em que o fármaco foi incorporado na QS.

Segundo Li e colaboradores (2011), a geleificação ionotrópica é baseada em dois principais grupos de interação iônica: uma forte interação iônica entre os grupamentos amina da QS e os grupamentos fosfato do TPP e uma fraca interação entre os grupamentos amino da QS e o fármaco e, portanto, a incorporação e concentração do fármaco pode reduzir a interação entre a QS e TPP (LI et al., 2011).

Neste sentido, esses resultados podem estar relacionados pelo fato de que em pH 5,5, o 5-FLU está carregado negativamente, e ao adicioná-lo na solução de TPP, o 5-FLU promove sítios adicionais de interação eletrostática devido o predomínio de cargas negativas no sistema. Assim, as cargas negativas do 5-FLU reduziu a capacidade de interação entre a QS e TPP durante o processo de reticulação, promovendo a formação de uma malha menos compacta e, conseqüentemente partículas maiores e heterogêneas.

Por outro lado, em pH 5,5 ocorreu uma redução nos valores de potencial zeta para todas as amostras (5-FLU+QS e 5-FLU+TPP). Essa redução no potencial zeta pode ser atribuído à uma menor densidade de cargas positivas da QS neste pH, o que representa um menor número de grupamentos amina protonados. Além disso, o 5-FLU e o TPP apresentaram uma maior densidade de carga negativa neste pH, contribuindo também para a redução dos valores de potencial zeta (Tabela 14).

Consequentemente, valores reduzidos de potencial zeta provocam a redução da repulsão eletrostática entre as partículas, contribuindo para sua agregação.

Considerando essas informações, conclui-se que o método em que o 5-FLU foi adicionado na solução de QS foi o mais adequado para obtenção das nanopartículas para ambos os valores de pH, visto que para todas as amostras as partículas apresentaram menor diâmetro médio e principalmente homogeneidade na distribuição de tamanhos.

Portanto, esses dados indicam que a ordem de adição dos componentes influenciou a formação das nanopartículas obtidas por geleificação ionotrópica.

Em seguida, foi avaliado a influência dos valores de pH 4,5 e 5,5 para as amostras F+QS, durante a formação das nanopartículas.

Conforme as Tabelas 13 e 14, os resultados mostraram que o diâmetro médio das nanopartículas estava entre 122,2 a 155,0 nm em pH 4,5, enquanto que em pH 5,5 o diâmetro médio variou de 181,3 a 261,1 nm. Enquanto que os valores de PDI para ambos pH (4,5 e 5,5), mostraram homogeneidade na distribuição de tamanho das partículas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Hassani e colaboradores (2015) e Tiğli Aydin e Pulat (2012) (HASSANI et al., 2015; TIĞLI AYDIN; PULAT, 2012).

Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que a medida que o pH da dispersão de QS aumenta, o grau de protonação na superfície da partícula é reduzido, diminuindo a repulsão eletrostática entre as partículas, resultando na agregação das partículas (HASSANI et al., 2015).

**Tabela 14.** Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e pH final das nanopartículas preparadas em diferentes proporções de QS/TPP/5-FLU em pH 5,5 (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Proporções QS:TPP:5-<br>FLU (m/m/m) | Adição 5-<br>FLU | Diâmetro médio<br>(nm) | PDI               | Potencial zeta<br>(mV) | pH<br>final |
|-------------------------------------|------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------|
| 2,5:1:1                             | F+QS             | 210,6 $\pm$ 2,23       | 0,218 $\pm$ 0,017 | + 14,1 $\pm$ 1,35      | 5,59        |
| 3:1:1                               | F+QS             | 181,3 $\pm$ 1,53       | 0,209 $\pm$ 0,011 | + 14,7 $\pm$ 0,58      | 5,58        |
| 3,5:1:1                             | F+QS             | 185,8 $\pm$ 1,30       | 0,220 $\pm$ 0,017 | + 17,2 $\pm$ 0,65      | 5,60        |
| 4:1:1                               | F+QS             | 261,1 $\pm$ 2,82       | 0,226 $\pm$ 0,003 | + 20,3 $\pm$ 0,64      | 5,63        |
| 4:1,25:1                            | F+QS             | 208,3 $\pm$ 0,61       | 0,174 $\pm$ 0,002 | + 19,0 $\pm$ 1,06      | 5,56        |
| 2,5:1:1                             | F+TPP            | 548,0 $\pm$ 5,62       | 0,664 $\pm$ 0,020 | + 14,5 $\pm$ 0,06      | 5,57        |
| 3:1:1                               | F+TPP            | 326,5 $\pm$ 4,38       | 0,778 $\pm$ 0,105 | + 15,6 $\pm$ 0,80      | 5,56        |
| 3,5:1:1                             | F+TPP            | 297,0 $\pm$ 4,12       | 0,612 $\pm$ 0,097 | + 18,3 $\pm$ 0,12      | 5,59        |
| 4:1:1                               | F+TPP            | 309,5 $\pm$ 1,75       | 0,682 $\pm$ 0,106 | + 21,6 $\pm$ 0,76      | 5,62        |
| 4:1,25:1                            | F+TPP            | 315,9 $\pm$ 5,03       | 0,562 $\pm$ 0,070 | + 18,9 $\pm$ 1,11      | 5,59        |

Em relação ao potencial zeta, os valores encontrados para pH 4,5 variaram entre +21,6 a +34,3 mV, enquanto que para o pH 5,5 os valores foram entre +14,1 e +20,3 mV, ocorrendo uma redução no potencial zeta no pH 5,5 como visto anteriormente.

Elevado valores de potencial zeta são desejáveis, uma vez que a carga superficial das partículas desempenha um papel importante na sua estabilidade física (HASSANI et al., 2015; PARVEEN; SAHOO, 2010). É importante destacar também que o potencial zeta positivo pode favorecer a interação com a membrana celular que apresenta característica aniônica, contribuindo para a adesão/internalização das partículas à superfície celular (LI et al., 2011).

Assim, considerando a importância do pH no processo de geleificação ionotrópica, o pH 4,5 foi selecionado sendo o mais adequado para a formação das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU.

## **6.6 Avaliação da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU**

Visando otimizar as condições para determinar a eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas poliméricas, duas metodologias diferentes foram avaliadas: ultracentrifugação e filtração-centrifugação. Além disso, considerando a influência das cargas superficiais no processo de complexação, que está relacionada com o pH do meio da dispersão, o efeito do pH também foi avaliado na eficiência de encapsulação do 5-FLU. Os resultados estão representados na Tabela 15.

Observou-se que para as amostras avaliadas pelo método de ultracentrifugação, a EE% variou de 4,94 a 6,96%; 4,58 a 7,06% para pH 4,5 e 5,5 ( $p > 0,05$ ), respectivamente. Utilizando o método filtração-centrifugação, os valores de EE% obtidos ficaram entre 12,24 a 23,58% em pH 4,5, e 12,45 a 13,64% para pH 5,5.

Essa diferença na EE% do 5-FLU nas nanopartículas ocorreu provavelmente pelo fato que pelo método de ultracentrifugação foi utilizado uma velocidade alta durante a centrifugação, para garantir a precipitação das nanopartículas. Esse processo pode ter levado ao cisalhamento de um maior número de partículas, resultando em uma maior liberação do fármaco para o meio sobrenadante e, conseqüentemente sua determinação.

Em relação ao método filtração-centrifugação não há a necessidade de uma centrifugação potente, uma vez que a filtração ajuda no processo de separação das nanopartículas, podendo-se assim utilizar uma centrifugação mais branda.

Desta maneira, este método foi considerado mais adequado para a determinação da EE% de nanopartículas poliméricas, sendo o método escolhido para as demais análises.

**Tabela 15.** Avaliação da eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 e 5,5, utilizando os métodos de ultracentrifugação e filtração-centrifugação (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Proporções QS:TPP:5-<br>FLU (m/m/m) | pH da dispersão<br>de QS | EE%<br>(ultracentrifugação) | EE% (filtração-<br>centrifugação) |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 2,5:1:1                             | 4,5                      | 4,94 $\pm$ 1,14             | 12,24 $\pm$ 0,15                  |
| 3:1:1                               | 4,5                      | 6,66 $\pm$ 3,12             | 15,77 $\pm$ 1,75                  |
| 3,5:1:1                             | 4,5                      | 5,83 $\pm$ 2,19             | 13,02 $\pm$ 1,55                  |
| 4:1:1                               | 4,5                      | 7,24 $\pm$ 4,37             | 23,58 $\pm$ 3,87                  |
| 4:1,25:1                            | 4,5                      | 6,96 $\pm$ 1,28             | 21,40 $\pm$ 0,09                  |
| 2,5:1:1                             | 5,5                      | 4,58 $\pm$ 0,34             | 12,57 $\pm$ 2,96                  |
| 3:1:1                               | 5,5                      | 6,40 $\pm$ 1,57             | 12,91 $\pm$ 1,43                  |
| 3,5:1:1                             | 5,5                      | 6,01 $\pm$ 1,32             | 12,45 $\pm$ 0,19                  |
| 4:1:1                               | 5,5                      | 6,31 $\pm$ 0,99             | 13,02 $\pm$ 1,44                  |
| 4:1,25:1                            | 5,5                      | 7,06 $\pm$ 1,03             | 13,64 $\pm$ 1,78                  |

Com base nestes resultados e considerando a EE% obtido por filtração-centrifugação, foi observada uma maior associação de 5-FLU para as amostras com maiores concentrações de QS em pH 4,5 ( $p < 0,05$ ) (4:1:1 e 4:1,25:1).

A maior concentração de QS fornece um maior número de sítios positivos disponíveis para a reticulação com o TPP, bem como o menor pH promove a protonação do grupo amino primário na cadeia CS, resultando no aumento da densidade elétrica e interação eletrostática com os grupos fosfato do TPP. Essas propriedades em conjunto favoreceram para a formação de uma rede mais compacta durante o processo de reticulação e, portanto em um maior aprisionamento do 5-FLU. Além disso, esses resultados revelam que o pH da dispersão da QS também influenciou na EE% das nanopartículas.

#### 6.6.1 Otimização da eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

A eficiência de encapsulação do 5-FLU representa um grande desafio, uma vez que é um fármaco extremamente hidrossolúvel, o que pode dificultar seu aprisionamento no interior de nanopartículas poliméricas pelo método de geleificação

ionotrópica. Assim, o efeito de diferentes variáveis foram avaliadas a fim de aumentar a eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas.

#### 6.6.1.1 1. Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU

A presença de eletrólitos na formação das nanopartículas pode promover uma mudança na força iônica do meio, reduzindo as interações intramoleculares e, conseqüentemente, favorecendo as interações eletrostáticas intermoleculares, o que resulta em um aumento da eficiência de complexação polímero-polímero (KUTSCHER et al., 2015).

Neste sentido, foi avaliado o aumento da força iônica na eficiência de encapsulação do 5-FLU das nanopartículas preparadas na presença de NaCl 0,1 M.

**Tabela 16.** Efeito do aumento da força iônica na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas usando NaCl 0,1 M em pH 4,5 (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Proporções QS:TPP:5-FLU<br>(m/m/m) | EE%              |
|------------------------------------|------------------|
| 2,5:1:1                            | 10,46 $\pm$ 0,14 |
| 3:1:1                              | 9,40 $\pm$ 0,97  |
| 3,5:1:1                            | 12,01 $\pm$ 2,28 |
| 4:1:1                              | 11,21 $\pm$ 2,43 |
| 4:1,25:1                           | 10,35 $\pm$ 1,56 |

O aumento da força iônica durante o preparo das nanopartículas não aumentou a eficiência de encapsulação do 5-FLU, e os valores encontraram-se entre 9,40 e 12,01%, menores quando comparados com os resultados anteriores ( $p < 0,05$ ) (Tabela 16). Resultado semelhante foi relatado por Kutscher e colaboradores (2015), em que nanocomplexos preparados na ausência de NaCl apresentaram maior carregamento de ciprofloxacina comparado com os nanocomplexos preparados com NaCl (KUTSCHER et al., 2015).

### 6.6.1.2 2. Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação

Apesar do 5-FLU apresentar baixa densidade de cargas em pH 4,5, foi avaliado se existe interação/complexação entre a QS e o fármaco, o que pode auxiliar no entendimento da organização estrutural do sistema durante a formação das nanopartículas.

A Tabela 17 mostra os resultados da eficiência de encapsulação das nanopartículas obtidas com a mistura de QS e 5-FLU sem adição de TPP. Além disso, a fim de confirmar se houve interação QS-5-FLU o diâmetro médio, PDI e potencial zeta também foram avaliados.

**Tabela 17.** Efeito da complexação entre QS e 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média  $\pm$  DP, n = 3).

| <b>Proporções QS:5-<br/>FLU (m/m/m)</b> | <b>Diâmetro<br/>médio (nm)</b> | <b>PDI</b>        | <b>Potencial zeta<br/>(mV)</b> | <b>EE %</b>      |
|-----------------------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------|
| <b>2,5:1</b>                            | 232,9 $\pm$ 44,41              | 0,871 $\pm$ 0,074 | + 30,3 $\pm$ 2,62              | 7,27 $\pm$ 1,25  |
| <b>3:1</b>                              | 393,1 $\pm$ 17,10              | 0,957 $\pm$ 0,075 | + 32,6 $\pm$ 3,42              | 10,89 $\pm$ 1,02 |
| <b>3,5:1</b>                            | 216,4 $\pm$ 34,22              | 0,844 $\pm$ 0,046 | + 34,7 $\pm$ 3,61              | 9,59 $\pm$ 0,73  |
| <b>4:1</b>                              | 387,6 $\pm$ 29,80              | 0,880 $\pm$ 0,061 | + 35,9 $\pm$ 1,77              | 11,21 $\pm$ 1,09 |

Para nanopartículas compostas por QS-5-FLU, os valores obtidos de EE% variaram entre 7,27 a 12,39% ( $p > 0,05$ ), indicando que houve interação/complexação entre a QS e o 5-FLU. Além disso, os sistemas desenvolvidos a partir de QS-5-FLU apresentaram diâmetro médio entre 216,4 e 393,1 nm, revelando a formação de nanopartículas, apesar da obtenção de sistemas polidispersos devido aos elevados valores de PDI (acima de 0,8). Essas nanopartículas apresentaram elevada carga positiva, valores entre +30,3 e +37,4 mV, devido somente à presença da QS no sistema.

Esses resultados demonstram que houve interação/complexação entre a QS e o 5-FLU e, consequentemente, formação de nanopartículas. Embora o 5-FLU apresentou valor de potencial zeta praticamente neutro em pH 4,5, e a interação entre policação e poliânion ocorrer principalmente através da interação eletrostática, provavelmente outros tipos de interações supramoleculares tais como, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas devem estar envolvidos na formação deste sistema.

Adicionalmente, a forte interação entre a QS e o 5-FLU contribuiu para a formação das nanopartículas, uma vez que a adição do fármaco na QS foi a condição mais favorável para a obtenção de nanopartículas mais homogêneas, como visto nos dados anteriores (item 6.5).

#### 6.6.1.3 3. Efeito do aumento do tempo de interação entre o fármaco e a quitosana na eficiência de encapsulação do 5-FLU

Considerando a complexação entre o 5-FLU e a QS, foi avaliado o aumento do tempo de interação entre o fármaco e o polímero na eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas. Para isso, durante o preparo das nanopartículas o 5-FLU foi mantido sob agitação magnética por 30 min com a QS, antes da adição do TPP.

**Tabela 18.** Efeito do aumento do tempo de interação do 5-FLU com a quitosana na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média  $\pm$  DP, n=3).

| Proporções QS:TPP:5-FLU<br>(m/m/m) | EE%              |
|------------------------------------|------------------|
| 2,5:1:1                            | 9,26 $\pm$ 0,54  |
| 3:1:1                              | 10,13 $\pm$ 0,44 |
| 3,5:1:1                            | 11,27 $\pm$ 2,59 |
| 4:1:1                              | 12,08 $\pm$ 1,48 |
| 4:1,25:1                           | 12,76 $\pm$ 2,43 |

Como mostrado na Tabela 18, as nanopartículas apresentaram valores de EE% entre 9,26 e 12,76% ( $p > 0,05$ ), indicando que um tempo maior de agitação não afetou na eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas.

#### 6.6.1.4 4. Efeito do pH da solução de 5-FLU na eficiência de encapsulação

Considerando o valor de pKa do 5-FLU ( $\sim 8,0$ ) e os dados do item 6.4.1, o pH da solução do fármaco foi ajustado para 9 a fim de aumentar a densidade de cargas, tornando o 5-FLU mais negativo. O predomínio das cargas negativas na molécula do 5-FLU pode favorecer a interação eletrostática com a QS, o que pode levar ao aprisionamento do fármaco no sistema. Desta maneira, o efeito do pH da solução de 5-

FLU e, conseqüentemente, o aumento da interação eletrostática entre o 5-FLU e a QS foram avaliados na eficiência de encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas.

**Tabela 19.** Efeito do pH 9 da solução 5-FLU na eficiência de encapsulação das nanopartículas preparadas em pH 4,5 (média  $\pm$  DP, n = 3).

| Proporções QS:TPP:5-FLU<br>(m/m/m) | EE %             |
|------------------------------------|------------------|
| 2,5:1:1                            | 16,37 $\pm$ 0,09 |
| 3:1:1                              | 14,21 $\pm$ 0,35 |
| 3,5:1:1                            | 16,12 $\pm$ 1,65 |
| 4:1:1                              | 15,30 $\pm$ 1,47 |
| 4:1,25:1                           | 16,23 $\pm$ 1,78 |

Dentre as variáveis avaliadas para aumentar a eficiência de encapsulação do 5-FLU, o efeito do pH da solução 5-FLU foi a que possibilitou uma melhor incorporação do fármaco para as amostras (2,5:1:1; 3:1:1 e 3,5:1:1), demonstrando um pequeno aumento nos valores para 16,37%, 14,21% e 16,12%, respectivamente, comparado aos resultados anteriores demonstrados na Tabela 19. No entanto, para as amostras com proporções de 4:1:1 e 4:1,25:1, não houve aumento na eficiência de encapsulação do 5-FLU, e os valores encontrados foram 15,30 e 16,23%.

Com base na análise dos resultados, as variáveis propostas neste estudo para o aumento da eficiência de encapsulação não promoveram maior aprisionamento do 5-FLU nas nanopartículas, visto que o maior valor alcançado foi de 16,37%. Provavelmente, isto se deve ao fato do 5-FLU ser um fármaco hidrossolúvel, o que dificulta sua incorporação em sistemas hidrofílicos, podendo escapar para o meio de reticulação por ter uma maior afinidade pela água.

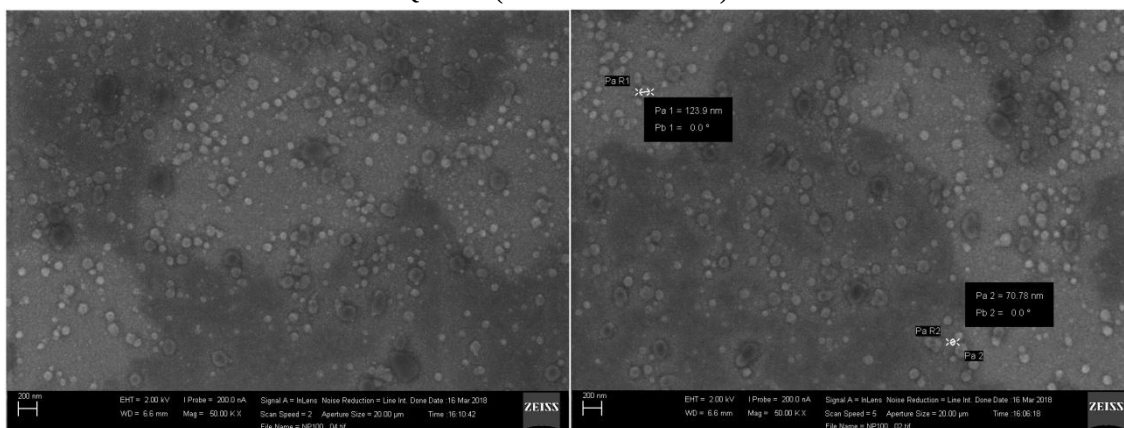
Portanto, para posterior caracterização do sistema e continuidade dos estudos, foi selecionada a amostra com proporções de 4:1:1 (QS/TPP/5-FLU), a qual possibilitou uma melhor encapsulação do 5-FLU nas nanopartículas (23,58%).

## 6.7 Análise de morfologia das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) é uma técnica muito utilizada para caracterização estrutural de materiais sólidos, considerados micro e nanoestruturados, a qual fornece imagens de alta resolução e aparência tridimensional, resultante da grande profundidade de campo (GAUMET et al., 2008).

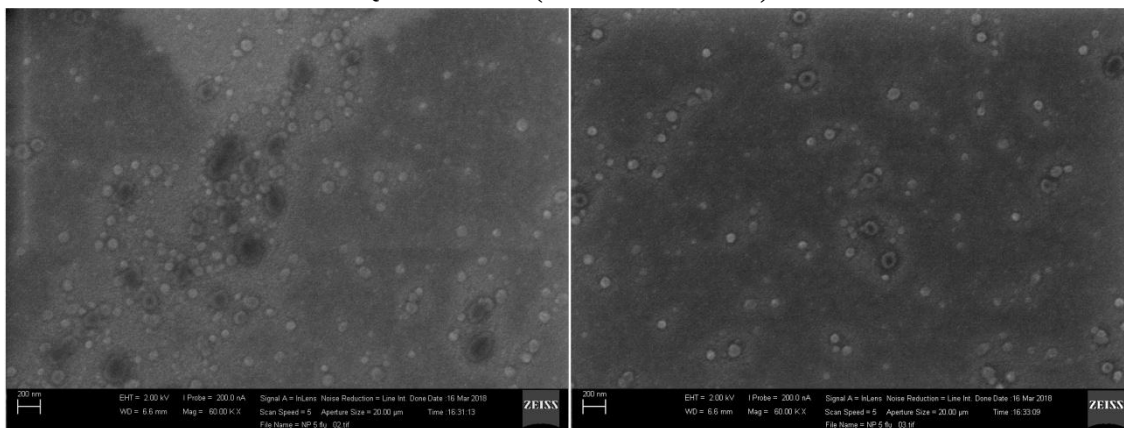
Na análise de MEV-FEG é possível observar que as nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP), sem adição do 5-FLU apresentaram tamanho nanométrico, corroborando com os dados de DLS, e forma esférica (Figura 24).

**Figura 24.** Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas sem fármaco na proporção 4:1 QS/TPP (aumento de 50.000x).



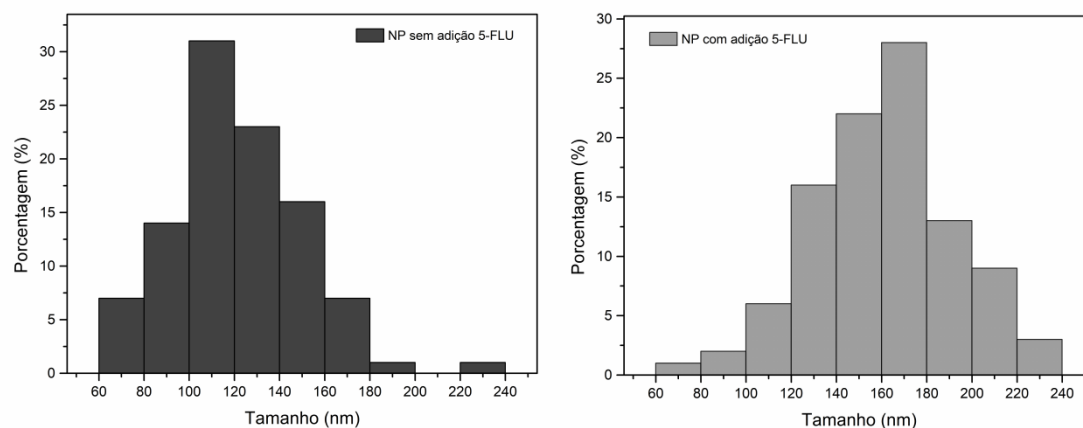
Para as nanopartículas contendo fármaco (proporção 4:1:1 QS/TPP/5FLU) as fotomicrografias mostraram que a incorporação do 5-FLU às nanopartículas não alterou a sua forma esférica bem como o tamanho, que se manteve nanométrico (Figura 25).

**Figura 25.** Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG das nanopartículas com fármaco na proporção 4:1:1 QS/TPP/5-FLU (aumento de 60.000x).



A partir das imagens, realizou-se a medida do tamanho para uma população de 100 nanopartículas, e os perfis de distribuição de tamanho em função do percentual da amostra sem e com adição de 5-FLU estão apresentados na Figura 26.

**Figura 26.** Distribuição de tamanho das nanopartículas sem e com adição de 5-FLU.



As nanopartículas sem adição de fármaco apresentaram perfil de distribuição em que o tamanho das partículas variou entre 60 e 240 nm, com tamanho médio de  $122,10 \pm 28,78$  nm. As nanopartículas carregadas com 5-FLU apresentaram perfil de distribuição semelhante, com partículas na faixa de tamanho de 60 a 240 nm e tamanho médio de  $161,94 \pm 32,90$  nm. A incorporação do 5-FLU promoveu um aumento no tamanho médio das partículas, provavelmente devido às interações fármaco-polímero, uma vez que as moléculas de fármaco ocupam os espaços intersticiais da cadeia polimérica resultando na expansão da estrutura e, conseqüentemente, partículas com maior diâmetro.

É importante destacar que esses resultados revelam diâmetros menores para ambas as amostras que aqueles observados utilizando a técnica de DLS (item 6.5).

As medidas realizadas pela técnica de DLS correspondem ao diâmetro hidrodinâmico das partículas dispersas em meio líquido. Uma vez que as nanopartículas são compostas por polímeros hidrofílicos ionizáveis que sofrem intumescimento, promovendo assim a repulsão das cadeias poliméricas e dilatação da rede, os maiores diâmetros verificados na análise de DLS mostram-se coerentes.

## 6.8 Caracterização da síntese da quitosana funcionalizada com MTX

A conjugação do MTX com a QS ocorreu através da reação entre o grupo carboxílico do MTX ativado e os grupos amina primária da QS formando ligação amida, conforme Figura 10. O composto da síntese da QS-MTX foi obtido como um sólido de cor laranja, e posteriormente foi realizada a caracterização e confirmação da conjugação QS-MTX utilizando diferentes técnicas.

### 6.8.1 Determinação do rendimento bruto da síntese de conjugação QS-MTX

A determinação do rendimento bruto representa a porcentagem do produto da síntese de acoplamento QS-MTX usando diferentes graus de funcionalização. As amostras QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3 apresentaram valores de rendimento bruto de 5,53%, 12,91% e 24,52%, respectivamente.

### 6.8.2 Determinação da faixa de fusão

O ponto de fusão de um sólido é usado para avaliar a pureza de compostos e/ou também ajudar na sua identificação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O MTX apresentou faixa de fusão entre 176,0 – 183,0 °C, enquanto para a QS a faixa de fusão foi entre 266,0 – 275,0 °C. As amostras QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3 apresentaram faixa de fusão de 225,0 – 230,0 °C, 221,0 – 227,0 °C e 210,0 – 218,0 °C, respectivamente. Em relação ao fármaco livre é possível observar alterações nas temperaturas de fusão para os compostos de QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3, sendo que nas três amostras analisadas a faixa de fusão foram muito semelhantes, indicando que esse aumento no ponto de fusão pode estar relacionado com a conjugação com a QS.

### 6.8.3 Determinação do teor do MTX nos conjugados QS-MTX

O teor do MTX nas amostras QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3 foi 16,92, 27,52 e 30,89%, respectivamente, demonstrando que o conteúdo de MTX aumentou com o aumento da razão de MTX nos conjugados de QS-MTX.

#### 6.8.4 Análise do potencial zeta da QS-MTX conjugados

O potencial zeta do MTX, da QS bem como da QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) foram avaliados, com objetivo de investigar se houve alteração depois do processo de conjugação (Tabela 20).

**Tabela 20.** Potencial zeta do MTX, QS, QS-MTX conjugados (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) (média  $\pm$  DP).

| Amostras | Potencial zeta (mV) |
|----------|---------------------|
| QS       | + 28,37 $\pm$ 1,26  |
| MTX      | + 15,20 $\pm$ 1,71  |
| QS-MTX-1 | + 31,92 $\pm$ 1,60  |
| QS-MTX-2 | + 35,12 $\pm$ 1,90  |
| QS-MTX-3 | + 36,89 $\pm$ 1,59  |

A QS apresentou um valor de potencial zeta positivo (+ 28,3 mV), uma vez que em pH ácido ocorre a protonação dos grupamentos amino primários da QS, resultando numa maior densidade de carga como mencionado anteriormente (item 6.4.1). Para o MTX, o valor encontrado foi de + 15,3 mV devido o MTX estar na forma catiônica em pH ácido, baseado nos seus valores de pKa: 3,36; 4,70 e 5,71.

Após a síntese de conjugação entre QS-MTX, esses valores de potencial zeta aumentaram e permaneceram positivos, principalmente comparado com o fármaco, resultante da conjugação entre essas duas moléculas. Além disso, é possível observar que os valores de potencial zeta aumentaram com o aumento da concentração de MTX na conjugação com a QS.

#### 6.8.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia de absorção na região do IV é uma técnica analítica bastante empregada para identificação estrutural, fornecendo informações sobre a composição química, como grupos funcionais e tipos de ligações dos materiais. A absorção da radiação na região do IV ocorre através das ligações químicas, e a frequência de radiação absorvida corresponde a energia de transição da ligação ou grupo vibracional. Desta forma, as assinaturas vibracionais de ligações químicas devido a excitação de

transições vibracionais correspondem às bandas vibracionais de estiramento (deformações axiais) e dobramento (deformação angular) (FERREIRA et al., 2018).

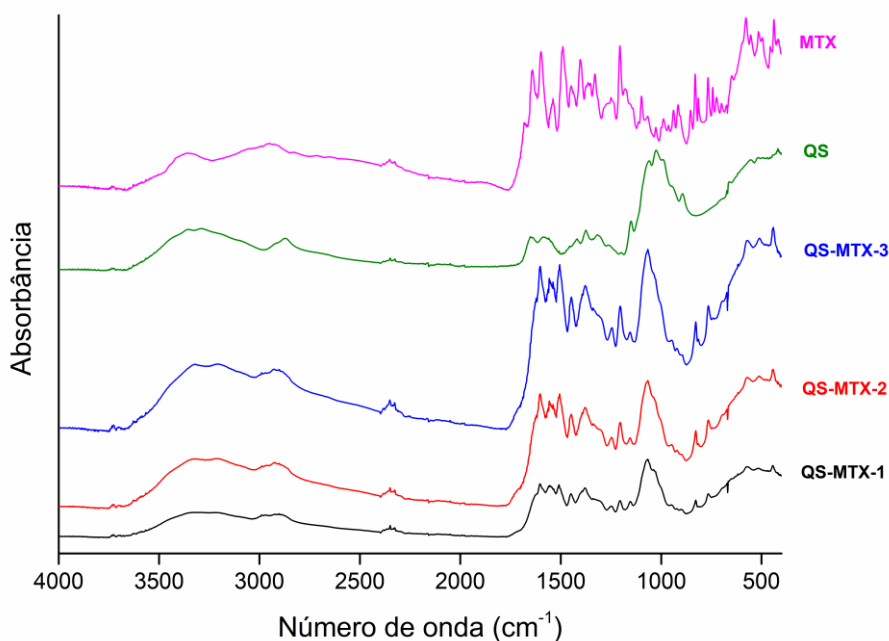
Os espectros do MTX, QS e QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3) estão representados na Figura 27.

Nos espectros do MTX, é possível observar as bandas largas entre  $3400\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento do grupo N–H da amina primária e do grupo OH da hidroxila do ácido carboxílico, além da banda característica a  $1638\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de estiramento C = C. A região de  $1641\text{ cm}^{-1}$ , indicou que a banda de estiramento C = O se sobrepôs à banda NH, que apareceu por volta de  $1608\text{ cm}^{-1}$  e, em  $1208\text{ cm}^{-1}$  a banda foi atribuída à absorção do estiramento C–N (AJMAL et al., 2015; CHADHA et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

O espectro do polímero QS apresentou bandas entre  $3500$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo OH, e as bandas em  $1680$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$  que correspondem, respectivamente, a vibração de estiramento (–CO)NH<sub>2</sub> da amida primária, e à deformação axial do grupamento NH<sub>2</sub>, além da banda em  $1078\text{ cm}^{-1}$  relacionado com a vibração de estiramento C–O (LEE et al., 2001; LI; HEIN; WANG, 2013).

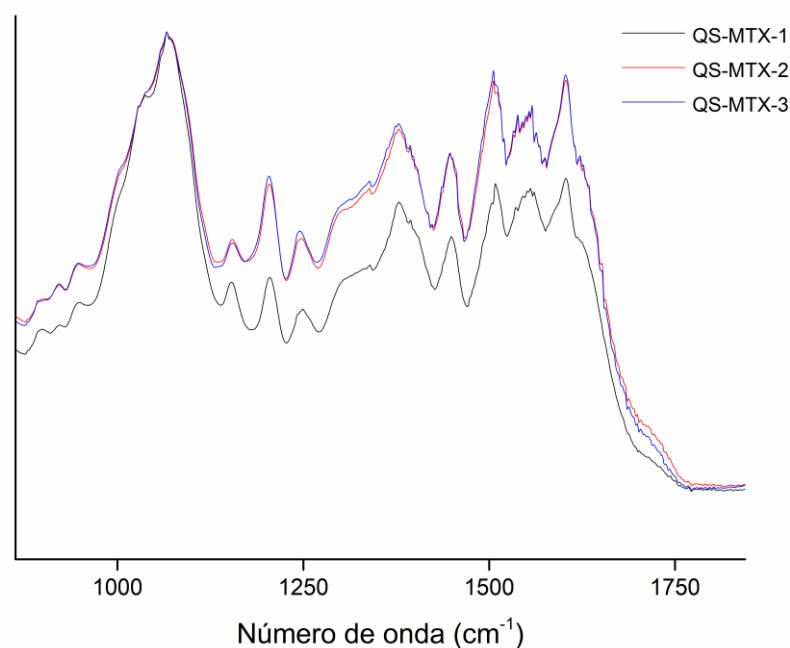
As comparações entre os espectros do MTX, QS e QS conjugada com MTX demonstraram que houve mudanças significativas nas posições das bandas IV. Os espectros da QS-MTX conjugados apresentaram a banda da amida na região de  $1565\text{ cm}^{-1}$ , e a banda em  $1558\text{ cm}^{-1}$  referente a N–H livre. Além disso, a banda na região de  $3500 - 3000\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento N–H e ao grupo OH tornou-se mais ampla, sugerindo que a ligação de hidrogênio foi aumentada entre a QS e o MTX. Essas alterações significativas indicam a formação de ligação amida entre o grupo carboxila do MTX e o grupo amino da QS.

**Figura 27.** Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do MTX, QS e QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3).



Para fazer uma análise comparativa entre as amostras da QS-MTX com diferentes graus de funcionalização, a fim de avaliar o efeito do aumento da concentração de MTX na conjugação com a QS, os espectros de IV foram ampliados na região de 1800 a 850 cm<sup>-1</sup> (Figura 28). Para as amostras QS-MTX-2 e QS-MTX-3 observou-se uma sobreposição das bandas enquanto que a intensidade para amostra QS-MTX-1 foi menor. Assim, a intensidade das bandas aumentou com o aumento do grau de funcionalização de MTX, ou seja, uma maior concentração de MTX na conjugação com a QS, indicando a mesma intensidade para os conjugados QS-MTX-2 e QS-MTX-3.

**Figura 28.** Espectros ampliados na região de 1800 a 850  $\text{cm}^{-1}$  do infravermelho da QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3).



#### 6.8.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se na absorção de radiação eletromagnética pela amostra na região de rádio frequência (a partir de um campo magnético aplicado). A absorção de determinada frequência é regida pelas características do spin nuclear dos átomos nas moléculas, assim como o ambiente em torno do átomo. Desta forma, se constitui uma técnica robusta na determinação estrutural de moléculas, fornecendo também informações sobre as interações/ligações formadas entre moléculas. Neste sentido, a modificação da superfície de nanopartículas (como a QS) com determinadas moléculas (por exemplo MTX) pode ser elucidada por RMN (FERREIRA et al., 2018; PAVIA et al., 2010).

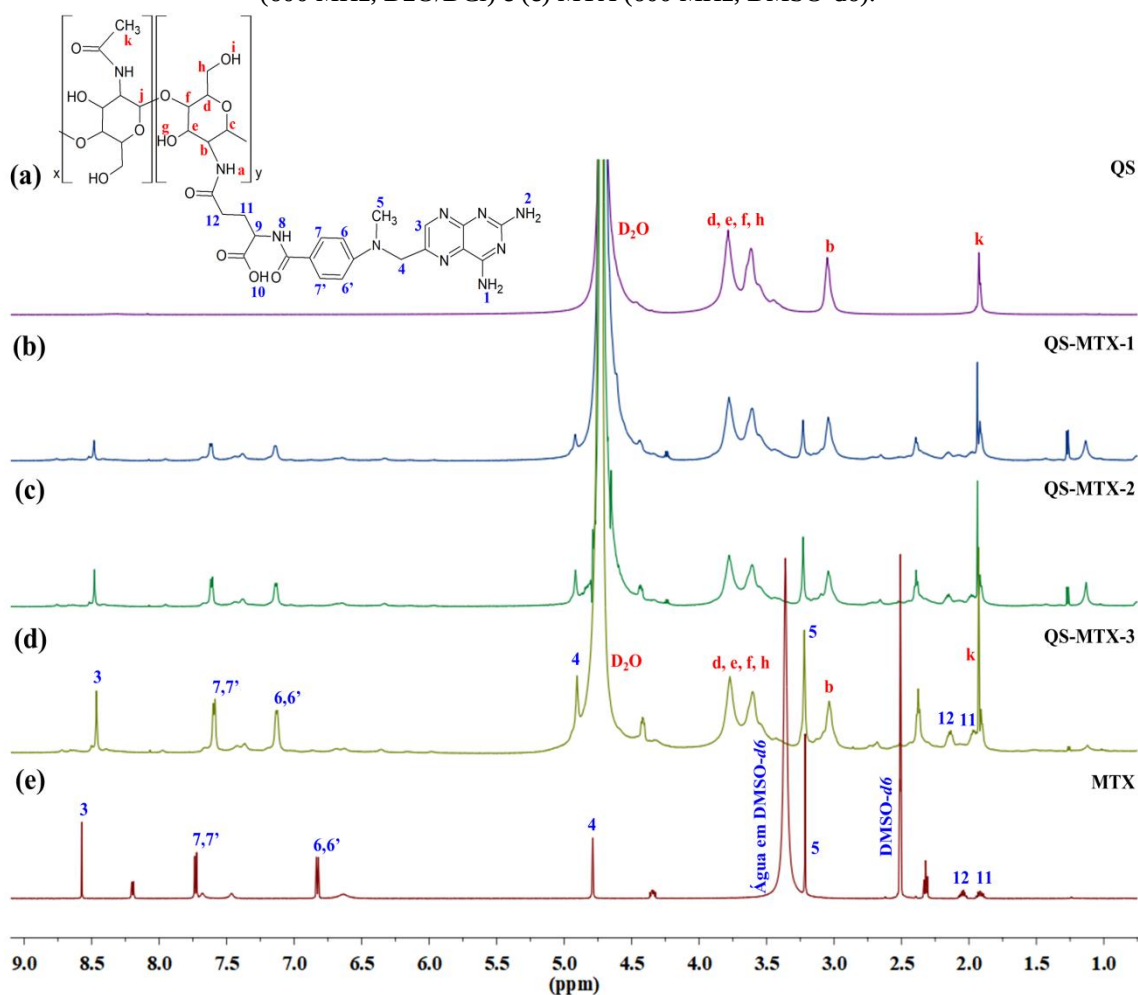
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  do polímero QS e do MTX estão apresentados na Figura 29 (a) e (e), respectivamente.

Os sinais detectados entre 3,78 e 3,43 ppm no espectro (a) podem ser atribuídos aos hidrogênios presentes no anel glucosamina da QS (Hd, He, Hf, Hh) (FERNANDEZ-MEGIA et al., 2005; JI et al., 2012). Além disso, são observados sinais em 1,93 e 3,05 ppm, atribuídos ao grupo de N-acetilglucosamina (Hk) e aos resíduos de glucosamina (Hb), respectivamente (KASAAI, 2010).

O espectro presente na Figura 29 (e) apresenta os sinais característicos do MTX entre 8,57 ppm, referente ao anel pterina (H3), assim como em 6,82 ppm, referente aos hidrogênios presentes no anel benzeno (H6,6' e H7,7') (ASHWANIKUMAR et al., 2014; WANG et al., 2011).

Com a finalidade de identificar as possíveis modificações da QS com MTX, utilizando diferentes concentrações de MTX, também foram obtidos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de acordo com a Figura 29 (b-d), correspondendo as amostras QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3, respectivamente.

**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  das amostras (a) QS, (b) QS-MTX-1, (c) QS-MTX-2, (d) QS-MTX-3 (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ ) e (e) MTX (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).



Os hidrogênios característicos das aminas ligadas aos anéis pterina (H1 e H2) geralmente aparecem em torno de 6,65 ppm como pode ser observado na Figura 29 (e), no entanto, com baixa intensidade, o que dificulta sua visualização nos espectros

correspondentes das amostras de QS modificadas com MTX. O hidrogênio H3 do anel pterina corresponde a um singlete atribuído ao sinal em 8,48 ppm. Os hidrogênios H4 e H5 ligados ao carbono da amina terciária correspondem aos singletos observados em 4,43 e 3,23 ppm, respectivamente. Os hidrogênios do anel fenila (H6,6' e H7,7') correspondem aos dubletos detectados em 7,13 e 7,61 ppm, respectivamente. Sinais multipletos atribuídos aos hidrogênios alquílicos (H11 e H12) são observados em 2,15 e 1,98 ppm, respectivamente.

É importante ressaltar que, à medida que a concentração de MTX aumenta na reação de funcionalização com QS, um aumento gradual na intensidade dos sinais correspondentes ao MTX pode ser detectado nos espectros (a-d). Desta forma, a partir da análise dos sinais detectados nos espectros e, de acordo com os procedimentos de purificação realizados, pode-se sugerir que o MTX foi conjugado à QS nas amostras QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3.

Os sinais correspondentes aos hidrogênios da QS também são observados nos espectros (b-d). Os hidrogênios atribuídos à boa parte do anel glucosamina da QS são detectados entre 3,78 e 3,43 ppm (Hd, He, Hf, Hh). Além disso, os sinais característicos do grupo N-acetilglucosamina (Hk) e também o resíduo de glucosamina (Hb), são observados em 3,05 e 1,93 ppm, respectivamente. É importante observar que os sinais correspondentes à QS nos espectros (b-d) não apresentaram distintos deslocamentos químico quando comparados à QS pura. Os sinais dos hidrogênios das funções ácido carboxílico (H10) e da função amida (Ha) formada a partir da conjugação do MTX com a QS não foram detectados nos espectros (b-d) devido à labilidade destes hidrogênios, o que permite a troca com átomos de deutério do solvente utilizado na análise ou ainda com átomos de hidrogênio de moléculas de água que possam estar presentes. Portanto, apesar do hidrogênio da função amida (Ha) não ser detectado nos espectros, os demais sinais corroborados com os resultados de FTIR, indicam a formação dos compostos QS-MTX1, QS-MTX2 e QS-MTX3.

#### 6.8.7 DSC

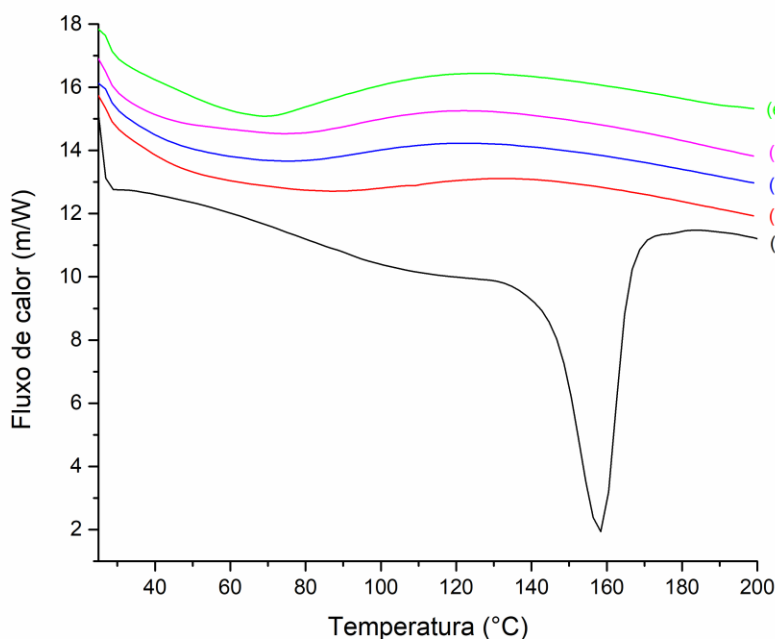
A calorimetria exploratória diferencial (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) é uma análise térmica baseada na medida da diferença do fluxo de calor entre uma determinada amostra e um material de referência, termicamente inerte. Esta técnica é muito empregada para a caracterização de materiais poliméricos, identificação

e transição de polimorfos, pureza de fármacos, bem como interações fármaco-excipiente (BHARVADA; SHAH; MISRA, 2015).

As curvas de DSC obtidas para a QS, MTX e QS conjugada com MTX (QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3 estão demonstrados na Figura 30. A curva do MTX exibiu apenas um pico endotérmico em 158,22 °C, atribuído ao seu ponto de fusão. Para a curva de DSC da QS, observou-se um evento endotérmico a 70,6 °C relacionado à evaporação de água quimicamente associada aos grupos hidrofílicos do polímero (SARMENTO et al., 2006).

Os compostos QS-MTX-1; QS-MTX-2 e QS-MTX-3, apresentaram evento endotérmico em torno de 90 °C, correspondente à evaporação de água, sem o aparecimento dos eventos térmicos característicos do MTX, indicando uma forte interação entre fármaco-polímero. Além disso, o desaparecimento de picos relacionados ao fármaco são indicativos que não tem nenhuma fração de fármaco livre (ausência de fármaco cristalino), o que confirma a purificação da síntese de QS-MTX, e garante a estabilidade térmica dos compostos.

**Figura 30.** Curvas de DSC do MTX (a), QS-MTX-1 (b), QS-MTX-2 (c), QS-MTX-3 (d) e da QS (e).



#### 6.8.8 TG/DTG

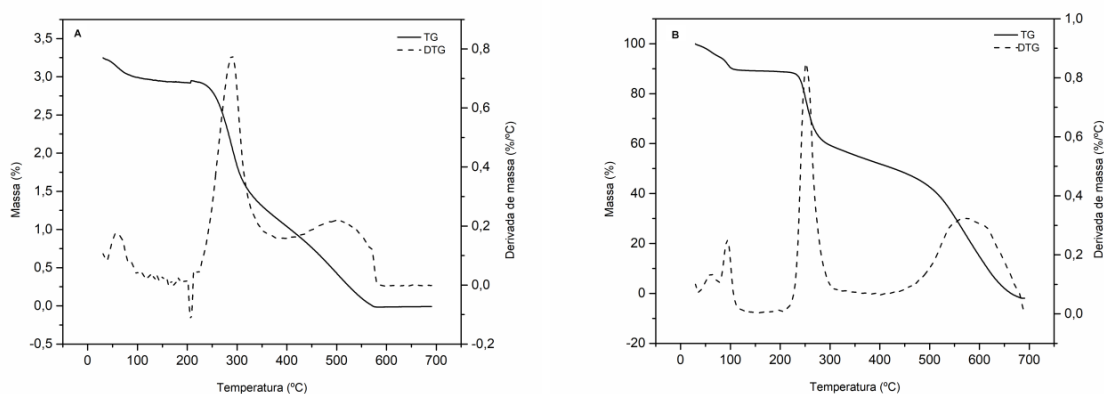
A análise de TG/DTG é uma outra ferramenta que pode ser utilizada para analisar a estabilidade e/ou propriedades térmicas de materiais, além de avaliar se houve

interação/formação de um novo material ou composto, através da variação de massa em função da temperatura. As curvas de TG/DTG da QS e MTX estão representados na Figura 31.

A QS apresentou um primeiro evento de perda de massa, representada por um pequeno pico na curva de DTG, em torno de 50 e 100 °C, que está relacionada com a perda das moléculas de água ligadas ao grupo amino e hidroxilas da QS. O segundo evento ocorreu numa faixa de temperatura em torno de 290 °C, atribuído à decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas das cadeias de QS, e o terceiro evento térmico representado por um pico largo na curva DTG, corresponde à degradação completa do polímero (MUKOMA; JOOSTE; VOSLOO, 2004).

Para o MTX, foi observado um primeiro evento na faixa de temperatura entre 50 e 100 °C, relacionado com a perda de água. O aparecimento do segundo evento em torno de 252 °C corresponde ao ponto de fusão. A partir desse evento, encontra-se uma perda de massa contínua, que é atribuído aos estágios de degradação/descarboxilação do MTX (CHAKRABORTY et al., 2013).

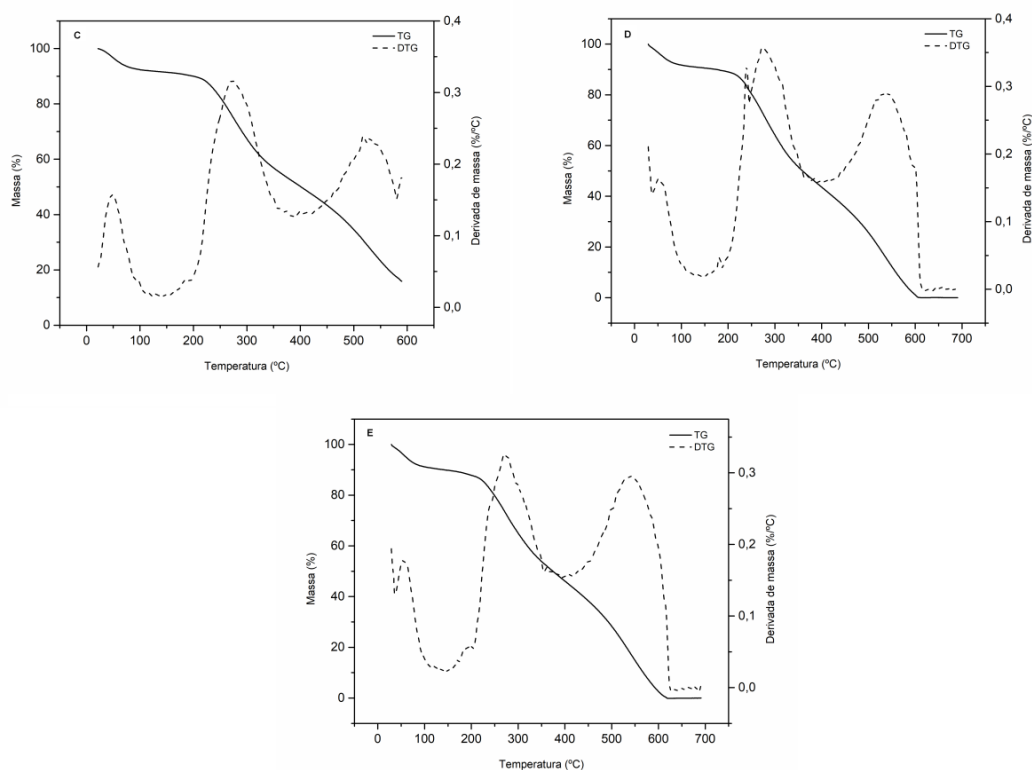
**Figura 31.** Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS (A) e MTX (B).



Conforme a Figura 32, as amostras da QS-MTX conjugados demonstraram comportamento intermediário entre a QS e o MTX, com três eventos de perda de massa. A amostra composta por QS-MTX-1 revelou um comportamento mais próximo da QS, deslocando-se para direita, observado em função de DTG. A QS-MTX-2 e QS-MTX-3 apresentaram comportamento muito semelhante (as curvas de DTG se sobrepõem),

demonstrando uma maior perda de massa em relação a QS-MTX-1. Portanto, esses resultados sugerem que a conjugação da QS-MTX de fato ocorreu.

**Figura 32.** Curvas de perda de massa (TG) e de derivada da perda de massa (DTG) da QS-MTX conjugados, QS-MTX-1 (C), QS-MTX-2 (D) e QS-MTX-3 (E).



## 6.9 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas funcionalizadas com MTX

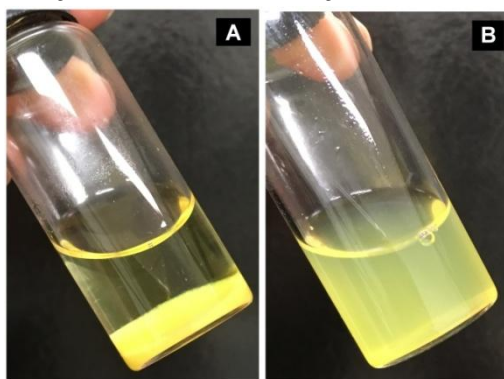
O MTX apresenta semelhança estrutural com o ácido fólico, o que permite seu transporte celular para as células tumorais, as quais superexpressam receptores de folato (ASHWANIKUMAR et al., 2014). Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema nanocarreador que apresente capacidade de se ligar ao receptor de folato, possibilitando o seu direcionamento para as células tumorais.

Inicialmente, as nanopartículas usando QS funcionalizada com MTX obtida no item 6.8, foram preparadas pelo método de geleificação ionotrópica. No entanto, durante o preparo das nanopartículas usando QS-MTX na mesma proporção testada anteriormente 4:1:1 (QS/TPP/5-FLU), houve a formação de agregados caracterizada por um sobrenadante límpido e um precipitado volumoso (Figura 33 A). O comportamento

observado provavelmente se deve ao número insuficiente de grupamentos amino da QS disponíveis para complexação com TPP, já que parte desses grupamentos estão ocupados pelo MTX. Dessa maneira, a fim de evitar a precipitação das partículas, foi utilizado uma mistura de QS não funcionalizada e QS funcionalizada com MTX (proporção 1:1 m/m) durante o preparo dessas nanopartículas. Contudo, durante a formação das nanopartículas usando a mistura de QS e QS-MTX, observou-se novamente a formação de precipitados (Figura 33 B), porém em menor quantidade.

Baseado no fato de que um menor número de grupamentos amina da QS estão disponíveis para interagir com os grupos fosfato do TPP, pois alguns destes sítios estão ocupados com o MTX através da conjugação, a concentração de TPP foi reduzida (4:0,7:1 QS/TPP/5-FLU) para obtenção das nanopartículas de QS/QS-MTX/TPP/5-FLU. Após os ajustes da concentração de TPP e o uso da mistura de QS e QS-MTX, as nanopartículas foram obtidas e caracterizadas quanto ao diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EE% (Tabela 21).

**Figura 33.** Nanopartículas obtidas usando QS funcionalizada com MTX (A) e nanopartículas obtidas usando mistura de QS não funcionalizada e QS funcionalizada com MTX (B).



As nanopartículas funcionalizadas com MTX apresentaram diâmetro médio de 376,4; 393,8 e 407,8 nm, com valores de PDI de 0,38; 0,41 e 0,40 para as amostras compostas por QS-MTX-1, QS-MTX-2 e QS-MTX-3, respectivamente. Apesar dessa alteração no tamanho e PDI, as partículas permaneceram na escala nanométrica e homogêneas (Tabela 21).

Provavelmente, a conjugação do MTX com a QS promoveu um aumento no tamanho e PDI das nanopartículas devido a ligação do fármaco na cadeia da QS, expandindo sua estrutura e, resultando em partículas maiores. Os valores de potencial

zeta continuaram positivos, variando de +31,6 a +26, 3 mV para nanopartículas funcionalizadas com MTX.

Em relação a EE% do 5-FLU nas nanopartículas funcionalizadas com MTX, os valores variaram de 15,71 a 18,23%, demonstrando que houve uma redução na EE% em comparação com as nanopartículas QS/TPP/5-FLU.

Assim, as nanopartículas funcionalizadas com MTX e encapsuladas com 5-FLU foram obtidas com sucesso pelo método de geleificação ionotrópica.

**Tabela 21.** Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EE% das nanopartículas preparadas utilizando QS-MTX conjugados.

| Amostras       | Diâmetro<br>médio (nm) | PDI           | Potencial zeta<br>(mV) | EE%          |
|----------------|------------------------|---------------|------------------------|--------------|
| NP-5-FLU-MTX-1 | 376,4 ± 1,60           | 0,382 ± 0,008 | + 31,6 ± 3,66          | 15,71 ± 1,12 |
| NP-5-FLU-MTX-2 | 393.8 ± 0.60           | 0,415 ± 0,003 | + 28,5 ± 2,81          | 16,44 ± 1,51 |
| NP-5-FLU-MTX-3 | 407.8 ± 0.75           | 0,402 ± 0,001 | + 26,3 ± 2,40          | 18,23 ± 0,97 |

## 6.10 Estudo das propriedades mucoadesivas

### 6.10.1 *Estudo in vitro de interação entre mucina e nanopartículas*

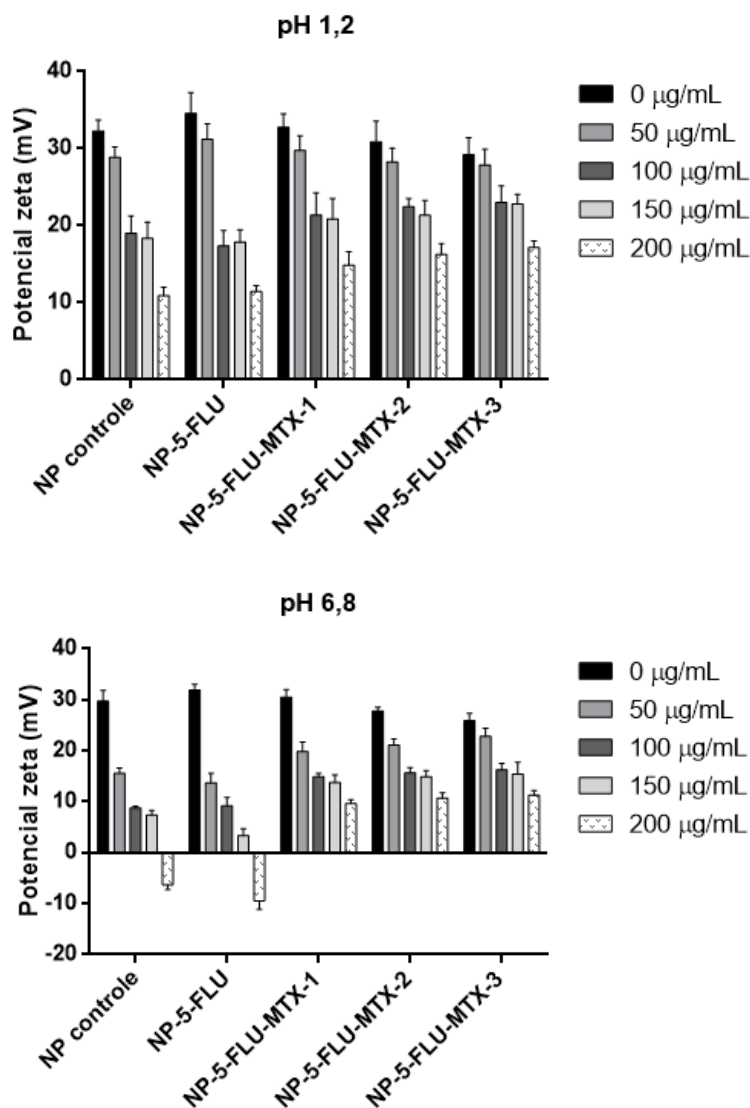
O processo de mucoadesão ocorre basicamente por meio de duas etapas, a primeira relacionada ao contato íntimo entre o sistema polimérico e a membrana biológica (muco) e na segunda etapa é estabelecida a interação entre o polímero e a mucina através de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (CARVALHO et al., 2010; HUA et al., 2015).

Neste sentido, a capacidade mucoadesiva das nanopartículas está relacionada, principalmente, às características dos polímeros, como massa molecular, hidrofília, grupos funcionais, porosidade, conformação espacial, grau de intumescimento, etc (CARVALHO et al., 2010; VARUM et al., 2008).

Neste trabalho, a mucoadesão foi avaliada a partir da adsorção das moléculas de mucina na superfície das nanopartículas através da variação do potencial zeta. Além disso, buscou-se avaliar a influência do pH do meio (gástrico e colônico) no processo de mucoadesão.

Para tanto, as nanopartículas sem funcionalização contendo ou não 5-FLU (NP controle e NP-5-FLU) e as nanopartículas funcionalizadas com MTX (NP-5-FLU-MTX-1, NP-5-FLU-MTX-2 e NP-5-FLU-MTX-3), foram selecionadas para avaliar a habilidade desses sistemas, baseados em QS, estabelecer interações *in vitro* com a mucina em meio ácido (HCl/KCl pH 1,2) e colônico (tampão fosfato pH 6,8).

**Figura 34.** Influência da adição de dispersões de mucina, em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) no potencial zeta das nanopartículas (média  $\pm$  DP,  $n = 3$ ).



Conforme a Figura 34, todas as amostras (NP controle, NP-5-FLU, NP-5-FLU-MTX-1, NP-5-FLU-MTX-2 e NP-5-FLU-MTX-3) apresentaram redução significativa nos valores de potencial zeta, a partir da adição de mucina na concentração de 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ), em meio ácido (pH 1,2). Além disso, observou-se que o potencial zeta reduziu com o aumento da quantidade de mucina adicionada ao meio.

Em tampão fosfato pH 6,8, ocorreu uma maior redução nos valores de potencial zeta para todas as amostras ( $p < 0,05$ ), em comparação ao pH 1,2, indicando uma maior adsorção de mucina à superfície das nanopartículas (Figura 34). Esse comportamento está relacionado à influência do pH no grau de ionização da mucina ( $pK_a = 2,6$ ), uma vez que em pH 6,8 os grupamentos siálicos das moléculas de mucina estão carregados negativamente, favorecendo a interação eletrostática com a quitosana. Assim, as nanopartículas desenvolvidas apresentaram maior capacidade de interagir com a mucina no valor de pH da região colônica.

Os resultados obtidos caracterizam que o processo de adsorção ocorreu principalmente por interações eletrostáticas, segundo a teoria eletrônica de atração de cargas opostas entre a matriz polimérica e componentes do muco (mucina). No entanto, outras interações supramoleculares, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas podem estar envolvidas no processo de consolidação da mucoadesão (CARVALHO et al., 2010; HUA et al., 2015).

Comparando-se as nanopartículas sem funcionalização (NP controle e NP-5-FLU) e as nanopartículas funcionalizadas com MTX (NP-5-FLU-MTX-1, NP-5-FLU-MTX-2 e NP-5-FLU-MTX-3), observou-se maior redução no potencial zeta para as nanopartículas sem funcionalização ( $p < 0,05$ ) (principalmente em pH 6,8, no qual os valores de potencial zeta foram negativos), indicando que a funcionalização com MTX reduziu a interação/adsorção com a mucina. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que nas nanopartículas funcionalizadas com MTX existe um menor número de sítios (grupamentos amina da QS) disponíveis para interação eletrostática com a mucina, resultando em uma menor quantidade de mucina adsorvida na superfície das nanopartículas.

Por outro lado, as nanopartículas funcionalizadas NP-5-FLU-MTX-1, NP-5-FLU-MTX-2 e NP-5-FLU-MTX-3 apresentaram comportamento semelhante na interação com a mucina ( $p > 0,05$ ), e os diferentes graus de funcionalização não influenciaram a adsorção de mucina em ambos meios (pH 1,2 e pH 6,8).

### 6.11 Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas

As micropartículas carregadas com nanopartículas de QS/TPP/5-FLU foram preparadas com diferentes proporções de dispersão de AR/P em relação à dispersão de nanopartículas (NP:AR/P dispersão 1:1; 1:2 e 1:4 v/v), com objetivo de avaliar a influência da concentração de AR/P na obtenção, forma e superfície das micropartículas, bem como o seu efeito protetor sobre as nanopartículas de 5-FLU.

#### 6.11.1 *Rendimento (%)*

O rendimento do processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas foi avaliado e os resultados estão apresentados na Tabela 22.

Os valores de rendimento para as amostras obtidas com as proporções de NP:AR/P 1:1; 1:2 e 1:4 foram de 46,74; 48,55 e 46,12%, respectivamente. Esses resultados indicam que o aumento da concentração polimérica de AR/P na obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas não influenciou no rendimento do processo (valores próximos), demonstrando que o método proposto é adequado para obtenção desses sistemas.

**Tabela 22.** Rendimento (%) do processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas com diferentes proporções de AR/P.

| NP:AR/P proporções | Rendimento (%) |
|--------------------|----------------|
| 1:1                | 46,74          |
| 1:2                | 48,55          |
| 1:4                | 46,12          |

#### 6.11.2 *Avaliação da eficiência de incorporação das nanopartículas nas micropartículas*

Conforme os resultados apresentados na Tabela 23, os valores de EE% do 5-FLU nas nanopartículas incorporadas em micropartículas compostas por NP:AR/P nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4 foram de 4,62, 6,67 e 11,41%, respectivamente. Esses valores reduzidos de EE% observados, provavelmente se deve à difusão do fármaco para a solução reticulante devido à sua elevada hidrofília. Além disso, os valores

corroboram aos encontrados por Ma e colaboradores (2015) em estudo com microcápsulas de quitosana-hipromelose carregadas com nanopartículas revestidas com Eudragit® S100 (cerca de 17,4%) (MA et al., 2015).

Dentre as amostras, as micropartículas obtidas com maior concentração de AR/P apresentaram maior EE%, indicando que o aumento da concentração polimérica favoreceu a incorporação das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU nas micropartículas, provavelmente devido à formação de uma estrutura mais empacotada fornecida pelas cadeias AR/P sobre as nanopartículas.

**Tabela 23.** Eficiência de encapsulação das nanopartículas nas micropartículas preparadas com diferentes proporções de AR/P.

| NP: AR/P proporções | EE (%) |
|---------------------|--------|
| 1:1                 | 4,62   |
| 1:2                 | 6,67   |
| 1:4                 | 11,41  |

#### 6.11.3 Análise de morfologia das micropartículas carregadas com nanopartículas (MEV-FEG)

Conforme a Figura 35, as análises de MEV-FEG revelaram que as micropartículas sem nanopartículas de QS/TPP/5-FLU apresentaram superfície mais homogênea e lisa, apesar de que uma superfície rugosa ter sido detectada em filmes de amido resistente/pectina desenvolvidos anteriormente (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014). O processo de reticulação e a velocidade de agitação pode ter gerado um efeito de polimento sobre a superfície das partículas (MENEGUIN et al., 2018).

A incorporação das nanopartículas de QS/TPP/5-FLU às micropartículas na concentração de 1:1 apresentaram uma superfície irregular, com uma menor cobertura, evidenciando as nanopartículas no interior das micropartículas. Provavelmente, essa menor concentração de AR/P foi responsável pela rugosidade da superfície das micropartículas devido à menor viscosidade da dispersão, o que deve conferir à gota uma menor resistência mecânica contra o impacto sofrido com a solução reticulante, originando partículas menos esféricas.

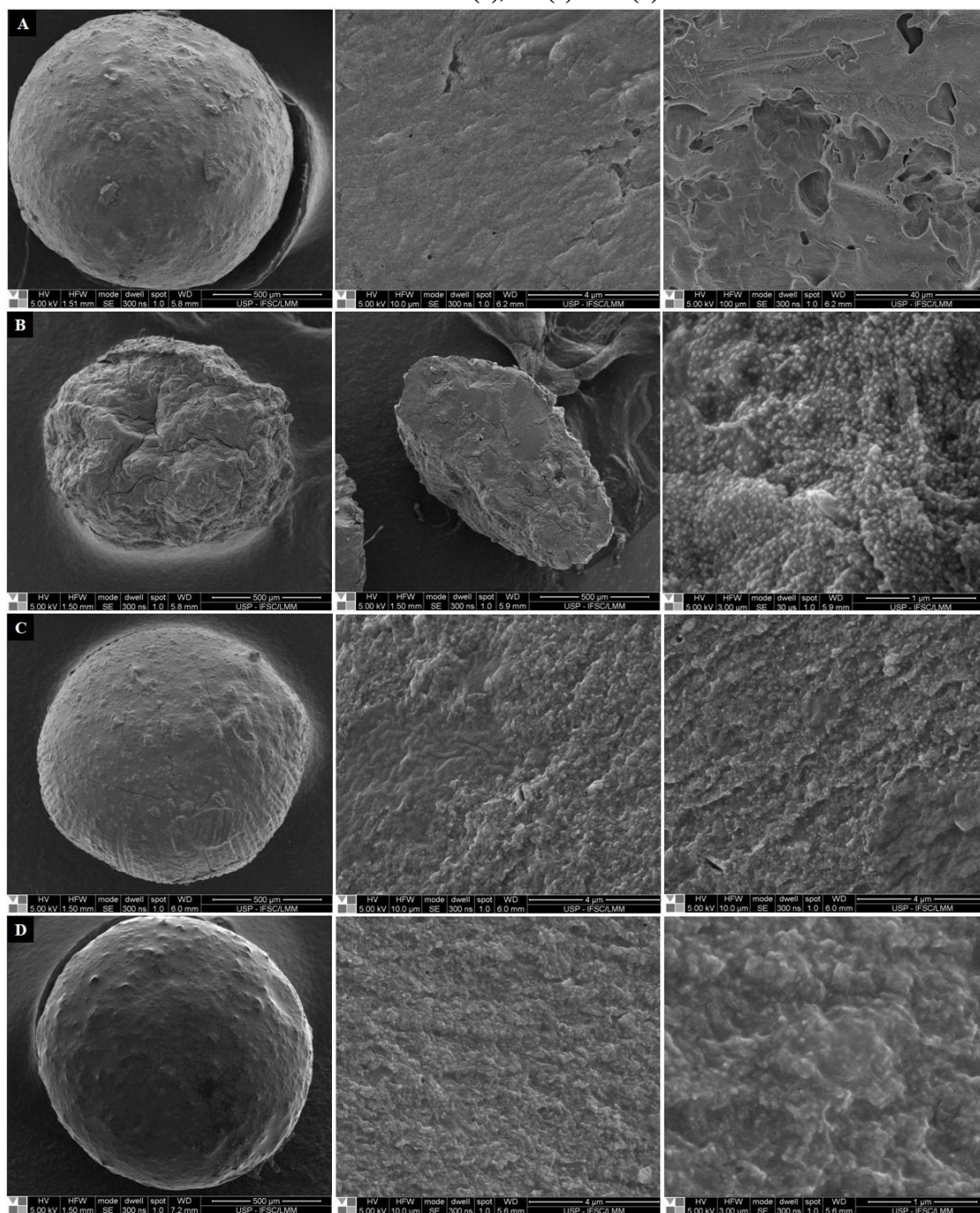
As micropartículas com concentração de 1:2 apresentaram uma superfície mais lisa, demonstrando a construção de estruturas mais densas, em relação à amostra com menor concentração de AR/P. Em relação às micropartículas obtidas com maior concentração polimérica (1:4), apresentaram uma superfície lisa e uma maior cobertura sobre as nanopartículas.

É possível observar ainda, que para as amostras 1:2 e 1:4, as micropartículas apresentaram formas mais circulares comparadas com a concentração 1:1, provavelmente devido à uma maior concentração polimérica, e consequentemente uma maior viscosidade da dispersão, o que garante à gota uma maior resistência durante a queda na solução reticulante, resultando em partículas mais circulares. Comportamento semelhante foi relatado por Meneguín e colaboradores (2018), em estudos com micropartículas de gelatina contendo insulina (MENEGUÍN et al., 2018).

Esses resultados confirmam que as nanopartículas de QS/TPP/5-FLU foram incorporadas nas MPs de AR/P com sucesso, e que a concentração polimérica de AR/P interfere no preparo destas MPs, uma vez que as maiores concentrações originam MPs mais esféricas e com uma melhor cobertura da dispersão AR/P. Essa maior cobertura de AR/P pode ser importante para conferir uma maior proteção das nanopartículas através do TGI, quando administradas oralmente.

Adicionalmente, a partir das fotomicrografias obtidas realizou-se a medida do diâmetro para as micropartículas sem nanopartículas e para as micropartículas carregadas com nanopartículas nas proporções NP:AR/P 1:1, 1:2 e 1:4, as quais apresentaram diâmetros de 1027, 822, 908 e 968  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**Figura 35.** Fotomicrografias representativa obtidas por MEV-FEG da superfície e corte transversal das micropartículas sem nanopartículas (a), micropartículas carregadas com nanopartículas nas proporções NP:AR/P 1:1 (b), 1:2 (c) e 1:4 (d).



## 6.12 Estudos de dissolução do 5-FLU

#### 6.12.1 Estudo de solubilidade do 5-FLU

A solubilidade do fármaco é um parâmetro determinante para o ensaio de dissolução *in vitro*, uma vez que é necessário trabalhar dentro das condições *sink* (volume de meio 10 vezes maior do que necessário para obter a saturação do fármaco). Assim, a solubilidade do 5-FLU foi determinada nos meios de dissolução, e os valores encontrados foram de 11,82, 11,77 e 11,41 mg.mL<sup>-1</sup> em HCl/KCl (pH 1,2), tampão fosfato (pH 6,8) e tampão fosfato (pH 7,4), respectivamente.

#### 6.12.2 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do 5-FLU

O ensaio de dissolução é uma etapa fundamental no desenvolvimento de novos sistemas de liberação, no qual permite prever o controle espacial e/ou temporal das taxas de liberação de fármacos podendo assim estabelecer uma futura correlação com o comportamento *in vivo* do sistema (MENEGUIN, 2016; TAJIRI et al., 2015).

Para o estudo de liberação *in vitro* do 5-FLU foram selecionadas as amostras: NP-5-FLU, baseado nos resultados de eficiência de encapsulação (item 6.6), NP-5-FLU-MTX-2 (considerando o grau intermediário de funcionalização) para avaliar a influência da funcionalização com MTX na liberação do 5-FLU e MP+NP-5-FLU para avaliar a influência da microencapsulação das nanopartículas na liberação do fármaco.

Os perfis de liberação em pH 1,2, pH 7,4 e pH 6,8, os quais simulam os principais valores de pH do TGI estão apresentados na Figura 36.

**Figura 36.** Perfis de liberação *in vitro* do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU) em comparação com o fármaco livre em meios ácido HCl/KCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 7,4.

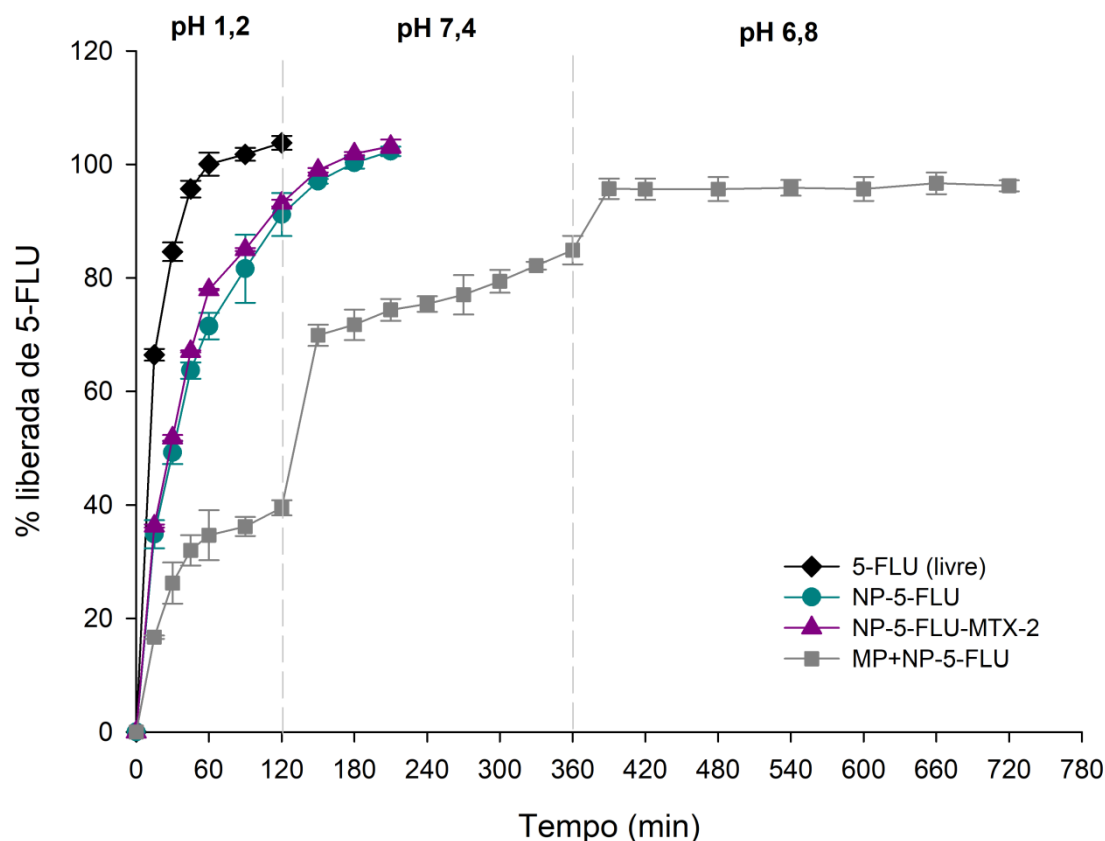


**Tabela 24.** Percentual de 5-FLU liberado em meio ácido pH 1,2 (15 e 120 min) e tampão fosfato pH 7,4 (30 e 240 min).

| Amostras      | Meio ácido (pH 1,2) |               | Tampão fosfato (pH 7,4) |               |
|---------------|---------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|               | 15 min              | 120 min       | 30 min                  | 240 min       |
| 5-FLU         | 66,44 ± 1,04        | 103,78 ± 1,22 | 102,03 ± 0,83           | 107,04 ± 1,46 |
| NP-5-FLU      | 34,82 ± 2,46        | 91,15 ± 3,79  | 97,01 ± 0,40            | 102,28 ± 0,83 |
| NP-5-FLU-MTX2 | 36,28 ± 0,27        | 93,16 ± 0,58  | 98,97 ± 0,38            | 103,19 ± 1,16 |
| MP+NP-5-FLU   | 16,70 ± 0,51        | 39,50 ± 0,17  | 69,89 ± 0,23            | 75,39 ± 0,10  |

Conforme a Figura 36, nos primeiros 15 min de ensaio (pH 1,2) foi observado uma redução (30%) das taxas de dissolução do 5-FLU a partir das nanopartículas NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2, em relação ao fármaco livre ( $p < 0,05$ ), o que se deve ao fato das moléculas de fármaco estarem imobilizadas na matriz polimérica da QS. Por outro lado, as nanopartículas NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2 apresentaram taxas de liberação

de 91,15 e 93,16%, respectivamente, ao término do estágio em meio ácido (120 min) (Tabela 24). Esse comportamento pode estar relacionado ao pH, uma vez que a QS é altamente solúvel em pH ácido e, ao entrar em contato com o meio ácido ocorre a protonação dos grupos amino primários da QS, promovendo a expansão da cadeia polimérica por repulsão eletrostática, o que favorece a difusão das moléculas de fármaco para o meio de dissolução.

Verificou-se, ainda, que as nanopartículas NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2 exibiram perfis de dissolução do 5-FLU semelhantes ( $p > 0,05$ ), demonstrando que a funcionalização das nanopartículas com MTX não influenciou na liberação do fármaco.

Por outro lado, as taxas de liberação do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5FLU) incorporadas em micropartículas de AR/P foram significativamente reduzidas, em comparação as nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2), demonstrando que a microencapsulação promoveu o controle das taxas de liberação, prolongando as taxas de liberação do 5-FLU até 420 min em pH 6,8.

Os percentuais de redução das taxas de liberação do 5-FLU foram de aproximadamente 53% em meio ácido pH 1,2 e 28% em tampão fosfato pH 7,4, evidenciando que a microencapsulação reduziu a liberação das nanopartículas principalmente em meio ácido. Esse comportamento provavelmente está relacionado a estrutura mais organizada e compacta do AR, alcançada após o processo de retrogradação por recristalização, dificultando a difusão das moléculas. Ao mesmo tempo, a pectina possui capacidade de formar uma camada viscosa que retarda a difusão do fármaco (MENEGUIN et al., 2018). Meneguín e colaboradores (2014) nos estudos de filmes de AR/P também observaram menores taxas de dissolução em meio ácido do que em tampão fosfato pH 7,4 (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014).

Assim, esses resultados indicam que as micropartículas de AR/P tem a capacidade de controlar a liberação de nanopartículas ao longo do TGI, demonstrando seu potencial para a liberação de fármacos na região colônica.

#### 6.12.3 Análise dos mecanismos de liberação in vitro do 5-FLU

A liberação de fármacos a partir de sistemas baseados em polímeros hidrofílicos pode ser governada através de diferentes mecanismos, como intumescimento, difusão do fármaco, erosão da matriz polimérica e/ou pela combinação desses mecanismos (MENEGUIN, 2016; PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Para avaliar os mecanismos envolvidos no processo de liberação do 5-FLU a partir dos sistemas desenvolvidos, os modelos matemáticos de Primeira Ordem, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Higuchi, Weibull e Korsmeyer-Peppas foram aplicados aos dados de liberação e os coeficientes de correlação ajustado ( $r^2$ ) foram determinados (Tabela 25).

**Tabela 25.** Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação do 5-FLU a partir das nanopartículas (NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2) e micropartículas carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU).

| Modelos                 |          | Amostras |                |             |
|-------------------------|----------|----------|----------------|-------------|
| matemáticos             |          | NP-5-FLU | NP-5-FLU-MTX-2 | MP+NP-5-FLU |
| <b>Primeira Ordem</b>   | <i>k</i> | 0,022    | 0,025          | 0,006       |
|                         | $r^2$    | 0,991    | 0,993          | 0,965       |
| <b>Hixson-Crowell</b>   | <i>k</i> | 0,006    | 0,007          | 0,002       |
|                         | $r^2$    | 0,973    | 0,979          | 0,947       |
| <b>Baker-Lonsdale</b>   | <i>k</i> | 0,002    | 0,002          | 0,001       |
|                         | $r^2$    | 0,992    | 0,990          | 0,954       |
| <b>Higuchi</b>          | <i>k</i> | 7,971    | 8,199          | 4,325       |
|                         | $r^2$    | 0,948    | 0,921          | 0,910       |
| <b>Weibull</b>          | <i>k</i> | 58,192   | 75,562         | 555,6       |
|                         | $r^2$    | 0,874    | 0,811          | 0,997       |
|                         | <i>b</i> | 5,107    | 9,922          | 321,1       |
| <b>Korsmeyer-Peppas</b> | <i>k</i> | 7,565    | 7,797          | 3,250       |
|                         | $r^2$    | 0,999    | 0,999          | 0,857       |
|                         | <i>n</i> | 0,557    | 0,563          | 0,575       |

De acordo com os valores do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), o modelo matemático que melhor se correlacionou com os dados de liberação do 5-FLU para as nanopartículas NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2 foi o de Korsmeyer-Peppas (Tabela 25).

O modelo Korsmeyer-Peppas baseia-se na Lei das Potências, o qual estabelece uma relação exponencial entre a liberação do fármaco com o tempo (Equação 9) (SÁBIO et al., 2019).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = Kt^n \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $Mt$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ,  $M_{\infty}$  é a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito,  $k$  é a constante cinética e  $n$  é o expoente de liberação.

De acordo com o expoente  $n$ , o qual determina o mecanismo de liberação do fármaco através da matriz polimérica, valores de  $n = 0,43$  indicam que a liberação é governada pela difusão Fickiana, no qual a liberação é controlada pela difusão das moléculas do fármaco segundo o gradiente de concentração. Os valores de  $0,43 < n < 0,85$  caracterizam transporte anômalo ou não-Fickiano, no qual os processos de difusão e intumescimento das cadeias poliméricas contribuem igualmente para a liberação do fármaco. Para  $n = 0,85$ , o mecanismo é classificado como transporte Caso II, no qual os processos de intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas limitam a liberação do fármaco. E valores de  $n > 0,85$  indicam mecanismo de transporte super Caso II, no qual ocorre aceleração das taxas de liberação, devido ao elevado estado de mobilidade das cadeias poliméricas ou ao processo de erosão da matriz polimérica (COSTA; LOBO, 2001; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Para as nanopartículas NP-5-FLU e NP-5-FLU-MTX-2 os valores de  $n$  foram 0,557 e 0,563, respectivamente, caracterizando transporte anômalo, no qual a liberação do 5-FLU foi governada pelo intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas e difusão do fármaco. Esses achados parecem ser consistentes, uma vez que a QS é um polímero hidrofílico com a capacidade de intumescer em meio ácido, o que leva à expansão das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a difusão das moléculas de fármaco (DUDHANI; KOSARAJU, 2010).

Por outro lado, as micropartículas carregadas com nanopartículas (MP+NP-5-FLU) apresentou melhor correlação ( $r^2$ ) com o modelo de Weibull, o qual relaciona exponencialmente a fração do fármaco liberado,  $Mt/M_{\infty}$ , em função do tempo  $t$ , de acordo com a Equação 10 (SÁBIO et al., 2019).

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação 10}$$

Em que  $a$  é o parâmetro de escala e  $b$  é o parâmetro de forma, e de acordo com o valor numérico de  $b$  a curva de liberação pode ser caracterizada como exponencial ( $b = 1$ ), sigmoidal ( $b > 1$ ) e parábola ( $b < 1$ ) (SÁBIO et al., 2019).

O expoente  $b$  também indica o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica, sendo que valores de  $b \leq 0,75$  indicam difusão Fickiana, para  $0,75 < b < 1$  caracteriza difusão Fickiana associada ao Caso II e  $b > 1$  envolve um mecanismo de liberação complexo (SÁBIO et al., 2019).

Conforme a Tabela 25, o valor de  $b$  foi maior que 1 para a amostra MP+NP-5-FLU, indicando que a liberação do 5-FLU ocorreu através de um mecanismo complexo, o qual envolve os processos de difusão, intumescimento e/ou erosão da matriz polimérica, contribuindo de forma semelhante para o controle da liberação do fármaco.

Portanto, a microencapsulação das nanopartículas em micropartículas de AR/P influenciou o mecanismo de liberação e, conseqüentemente promoveu uma mudança no perfil de liberação do 5-FLU, reduzindo as taxas de fármaco liberado principalmente em meio ácido.

### **6.13 Estudos de biodistribuição *in vivo* por imagem óptica de pequenos animais**

É de extrema importância que o desempenho biológico das nanopartículas incorporadas em sistemas microparticulados seja avaliado, por meio de um modelo que mimetize as condições fisiológicas do TGI. Desta maneira, o uso de ensaios de distribuição *in vivo*, por meio da técnica multiespectral de imagem de pequenos animais, permite elucidar a distribuição *in vivo* de nanopartículas e/ou micropartículas carregadas com nanopartículas após a administração oral, especialmente a distribuição e retenção das partículas nos diferentes segmentos do TGI.

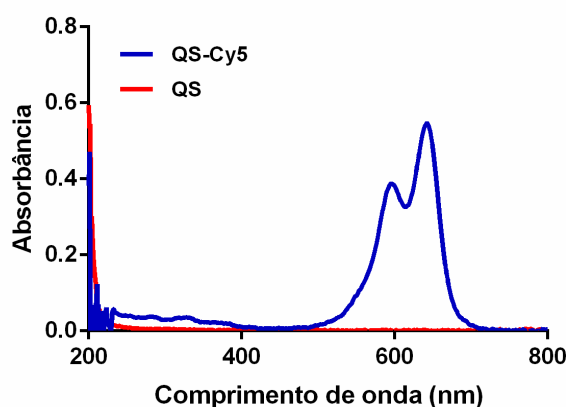
#### **6.13.1 Caracterização da síntese de marcação da quitosana com Cy5**

Com o objetivo de investigar a biodistribuição *in vivo* das nanopartículas incorporadas em micropartículas de amido resistente/pectina, foi necessário marcar as nanopartículas com um fluoróforo, para rastrear sua distribuição em cada seção do TGI do animal após a administração oral.

Para tanto, a quitosana foi marcada com Cy5-NHS-éster através da reação dos grupos NHS-éster ativados com aminas primárias para a formação de ligação amida. A síntese da quitosana marcada com Cy5 apresentou um rendimento de 77,95%.

A quitosana marcada com Cy5 foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis (Figura 37). Os resultados demonstraram que a quitosana não apresentou absorbância característica em 649 nm como esperado, enquanto que a quitosana marcada com Cy5 mostrou uma forte absorbância em 649 nm, o que corresponde à absorbância de Cy5, indicando que o marcador foi conjugado com sucesso à quitosana. Além disso, a quitosana marcada com Cy5 apresentou uma eficiência de marcação de 1%, equivalente a uma carga de conjugação de aproximadamente 10 µg de corante Cy5 por mg de quitosana, conforme determinado por espectrofotometria UV-vis.

**Figura 37.** Espectro de absorção da quitosana e quitosana marcada com Cy5 na região do UV.



#### 6.13.2 Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com rodamina-NH<sub>2</sub>

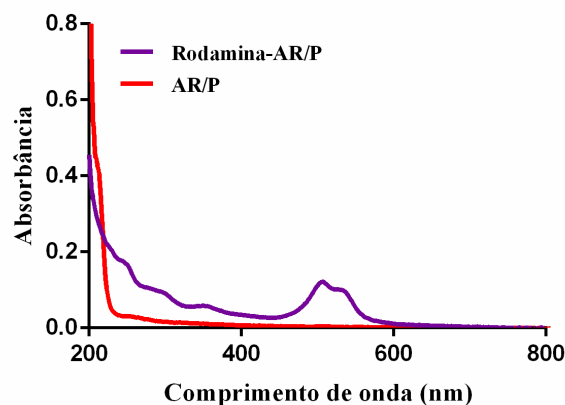
A marcação da blenda de AR/P (micropartículas) foi um grande desafio, uma vez que é necessário que a intensidade de fluorescência seja suficiente para permitir a detecção ao longo do TGI dos animais após a administração oral.

A blenda de AR/P foi marcada com Rodamina-NH<sub>2</sub> através da reação entre os grupos amino da Rodamina com grupos carboxílicos da pectina para a formação de ligação amida. O rendimento da síntese do AR/P marcado com rodamina-NH<sub>2</sub> foi de 81,05%.

A blenda de amido resistente/pectina marcada com rodamina-NH<sub>2</sub> foi também caracterizada através da comparação entre os espectros na região do UV-vis do AR/P e do AR/P marcados com rodamina-NH<sub>2</sub> (Figura 38). O AR/P não apresentou absorbância em 528 nm, enquanto o AR/P marcado com rodamina-NH<sub>2</sub> mostrou absorbância característica da rodamina neste comprimento de onda, confirmando a conjugação entre

o polímero e o corante. A eficiência de marcação da síntese do AR/P marcada com rodamina-NH<sub>2</sub> foi de 0,4%, calculada por espectrofotometria UV-vis.

**Figura 38.** Espectro de absorção do amido resistente/pectina e do amido resistente/pectina marcado com rodamina na região do UV.

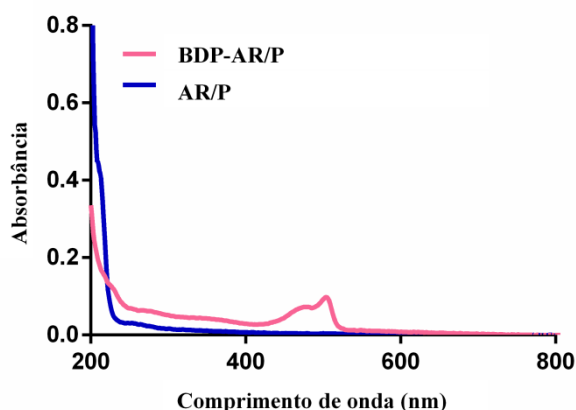


#### 6.13.3 *Caracterização da síntese de marcação da blenda de AR/P com BDP-NH<sub>2</sub>*

Do mesmo modo, o AR/P foi marcado com o corante BDP-NH<sub>2</sub> através da formação de ligação amida (reação entre os grupos amino do corante com grupos carboxílicos da pectina).

Os resultados obtidos para o rendimento da síntese foi de 73,9%. Conforme a Figura 39, o AR/P marcado com o BDP apresentou absorbância em 503 nm, que é atribuída ao pico característico para o corante BDP-NH<sub>2</sub>, enquanto que a blenda de AR/P não apresentou qualquer pico neste comprimento de onda. A eficiência de marcação do AR/P marcado com BDP-NH<sub>2</sub> foi de 0,6%, conforme determinada por espectrofotometria UV-vis.

**Figura 39.** Espectro de absorção do amido resistente/pectina e amido resistente/pectina marcado com o corante BDP na região do UV.



#### 6.13.4 Desenvolvimento e caracterização das micropartículas carregadas com nanopartículas usando o método de aerossolização

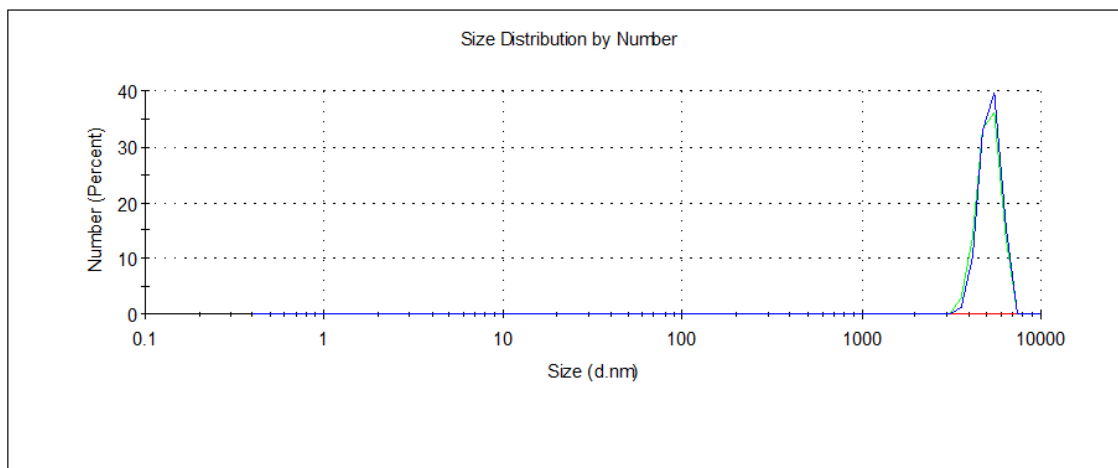
O tamanho das micropartículas é fundamental para estudos de biodistribuição *in vivo* para administração oral utilizando pequenos animais. Assim, as micropartículas obtidas anteriormente neste estudo, não puderam ser administradas aos camundongos devido ao grande tamanho (acima de 800  $\mu\text{m}$ , item 6.10.3). Para tanto, foi necessário reduzir o tamanho das micropartículas de AR/P usando o método de aerossolização.

As micropartículas de AR/P foram preparadas pela técnica de geleificação ionotrópica através da ligação iônica entre os grupos carboxílicos e os íons  $\text{Al}^{3+}$ , como visto anteriormente. Durante a preparação das micropartículas, observou-se que alguns parâmetros operacionais, como a vazão da seringa e o fluxo de nitrogênio, influenciaram no tamanho final dessas micropartículas. Quando a dispersão foi gotejada com menor fluxo de gás nitrogênio, formas irregulares como micropartículas com cauda foram obtidas, enquanto que a alta taxa de fluxo do injetor de seringa resultou em micropartículas com tamanho não homogêneo. Desta maneira, com o ajuste da vazão do injetor de seringa e do fluxo de gás nitrogênio, foi possível atingir partículas com tamanho reduzido e homogêneo.

Conforme a Figura 40, as medidas de DLS revelaram que o diâmetro das micropartículas foi estimado em torno de 10  $\mu\text{m}$  usando o método de aerossolização, indicando que não havia nanopartículas livres. Além disso, o método de aerossolização reduziu o tamanho das micropartículas comparado com as micropartículas obtidas anteriormente por gotejamento manual. A eficiência de encapsulação das nanopartículas

nas micropartículas através do método de aerossolização foi de 12,34%, e esses resultados foram similares aos observados para as micropartículas obtidas anteriormente (em torno de 11%).

**Figura 40.** Distribuição de tamanho das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) preparadas usando o método de aerossolização.



Durante a preparação das micropartículas marcadas com rodamina, observou-se que o corante foi removido para o sobrenadante da solução reticulante, quando a mistura de AR/P marcada com rodamina foi adicionada à solução de cloreto de alumínio.

Inicialmente, o tampão acetato (pH 3,0) usado para dissolver a rodamina durante a reação foi considerado o fator que poderia ter afetado a eficiência da conjugação entre o polímero e o corante, pelo fato de que o amido resistente apresenta baixa solubilidade em pH ácido (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014). Desta forma, o corante BDP-NH<sub>2</sub> foi escolhido como uma outra alternativa para superar este problema na síntese de marcação do AR/P.

Esperava-se que a marcação do AR/P fosse efetiva com a utilização de outro corante, no entanto, o BDP também foi removido para o sobrenadante da solução de cloreto de alumínio, como ocorrido anteriormente (Figura 41 A). Assim, a hipótese de que o pH ácido do tampão acetato estava interferindo na marcação entre o AR/P e a rodamina foi desconsiderada.

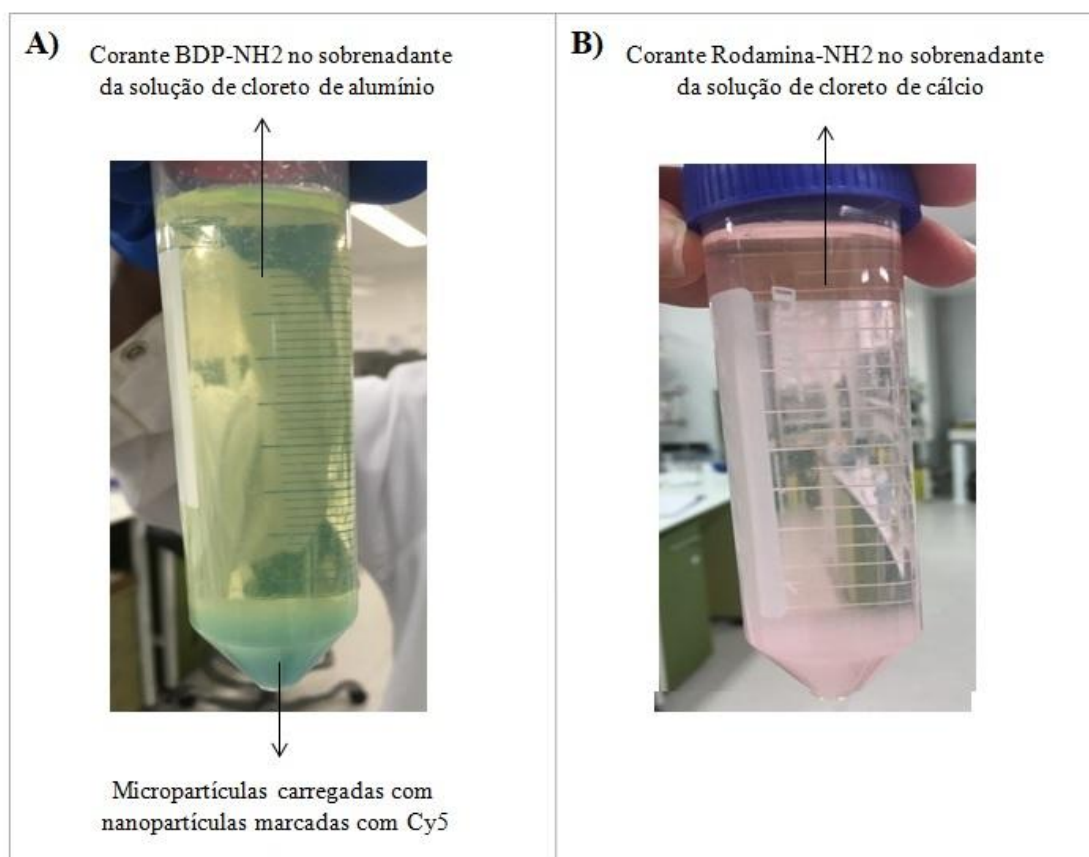
Por outro lado, estes resultados sugerem que a solução de cloreto de alumínio pode interagir com o corante, interferindo no sinal de fluorescência.

Neste sentido, para avaliar se o cloreto de alumínio interage com o corante rodamina, o cloreto de cálcio foi testado como outra solução reticulante na obtenção das micropartículas.

No entanto, os resultados demonstraram que o corante rodamina também foi removido para o sobrenadante da solução de cloreto de cálcio (Figura 41 B). Possivelmente, uma competição pode estar ocorrendo entre o agente reticulante e os corantes pelos grupos carboxílicos da pectina, impedindo uma conjugação efetiva.

Considerando que dois agentes de reticulação, bem como dois corantes foram testados, infelizmente as micropartículas de AR/P não foram capazes de serem marcadas de forma eficaz. Desta forma, os estudos de biodistribuição *in vivo* foram realizados utilizando QS marcada com Cy5 como marcador molecular.

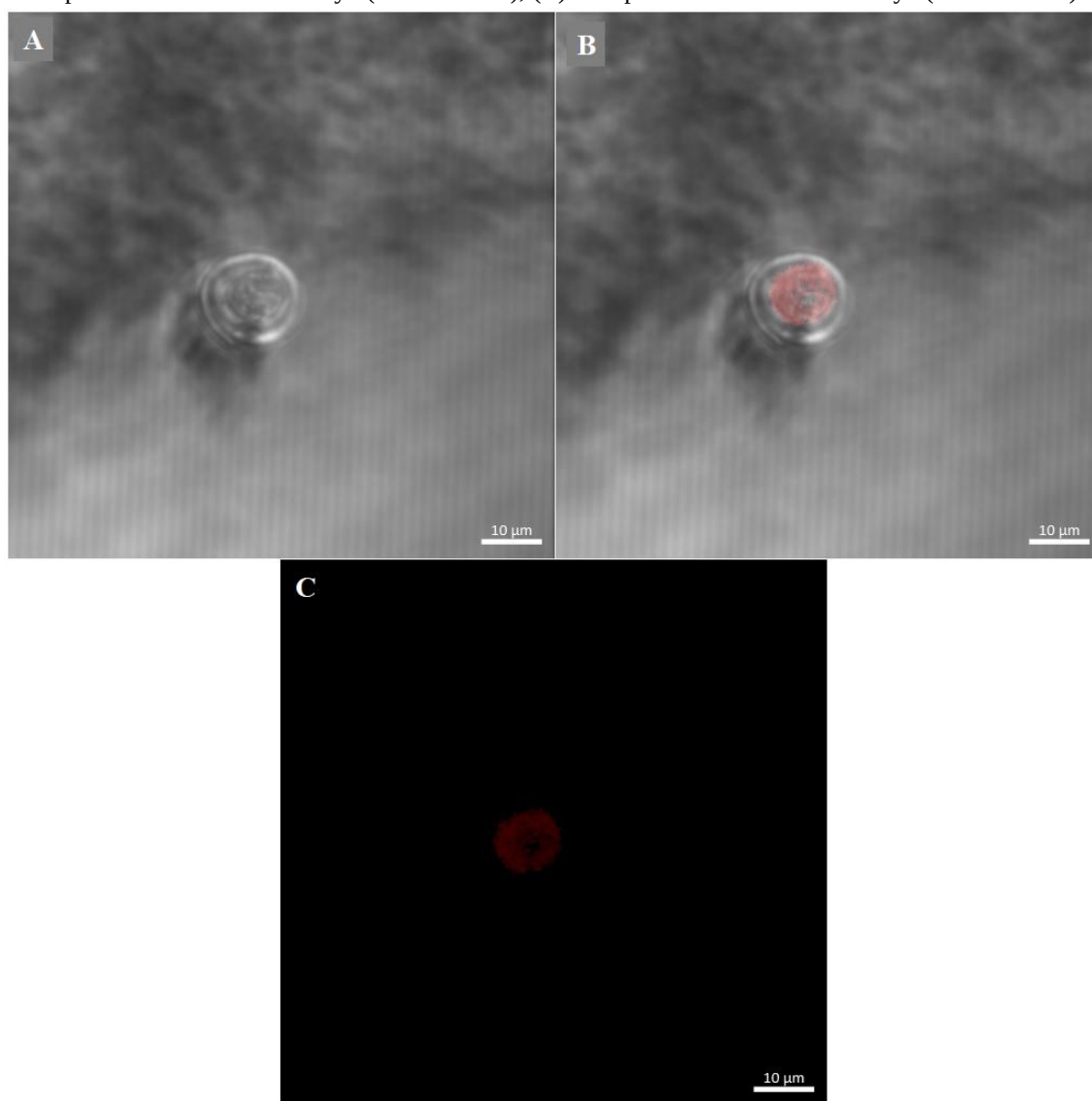
**Figura 41.** Os corantes BDP-NH<sub>2</sub> e Rodamina-NH<sub>2</sub> no sobrenadante da solução de cloreto de alumínio e cloreto de cálcio, respectivamente, após a formação das micropartículas de AR/P.



### 6.13.5 *Microscopia confocal das micropartículas carregadas com nanopartículas*

A imagem confocal de uma única micropartícula de AR/P mostrou que as nanopartículas foram incorporadas com sucesso na micropartícula usando o método de aerossolização, em que a cor vermelha indica o sinal do corante Cy5 conjugado no polímero de QS distribuído homogeneamente por toda a micropartícula (Figura 42). Adicionalmente, a forma esférica e o tamanho das micropartículas também foram confirmados usando imagem confocal, em que o tamanho foi estimado em 10  $\mu\text{m}$ , o que corrobora com os resultados obtidos com as medidas de DLS.

**Figura 42.** Imagem confocal: (A) micropartícula de AR/P; (B) micropartícula de AR/P carregada com nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha); (C) nanopartículas marcada com Cy5 (cor vermelha).



#### 6.13.6 Avaliação da biodistribuição *in vivo* de nanopartículas e micropartículas carregadas com nanopartículas por imagem óptica de pequenos animais

As tecnologias de imagem têm sido amplamente utilizadas na detecção e tratamento do câncer, bem como para rastrear agentes de contraste ou sistemas de liberação de fármacos *in vivo*. Existem diferentes tipos de técnicas de imagem, como ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de pósitrons (PET), ultra-som (US), tomografia computadorizada (TC), tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e imagem óptica de fluorescência (FUCHS, et al., 2015; SONAJE et al., 2010; THURECHT et al., 2010). A aplicação dessas tecnologias nos estudos de biodistribuição permite a detecção da imagem do animal vivo, em vários momentos após a administração do fármaco.

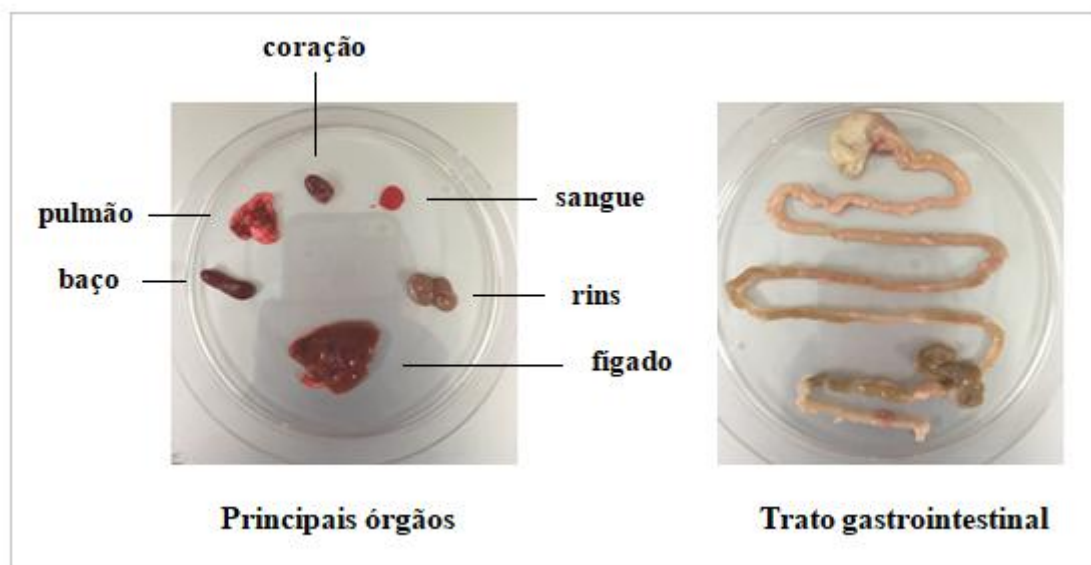
A imagem óptica por fluorescência representa uma ferramenta importante na avaliação da distribuição e acumulação sítio específica dos sistemas de liberação de fármacos em pequenos animais, devido aos benefícios da utilização de radiação não ionizante, boa resolução espacial e sensibilidade. Além disso, a principal vantagem dessa técnica, inclui a possibilidade de monitorar múltiplos corantes fluorescentes em um único sistema de liberação de fármacos, em que esses corantes podem ser conjugados quimicamente e/ou encapsulados fisicamente aos sistemas de liberação de fármacos (FUCHS et al., 2015; MA et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar a biodistribuição *in vivo* de nanopartículas incorporadas em micropartículas de AR/P durante a passagem pelo TGI superior e sua liberação direcionada ao cólon. Além disso, foi importante compreender o comportamento desses sistemas *in vivo* e comparar o acúmulo em diferentes partes do TGI após a administração oral.

Devido à dificuldade na marcação das micropartículas de AR/P, a QS marcada com Cy5 foi usada como meio de monitorar a liberação das nanopartículas no cólon, através do sinal fluorescente do Cy5. Desta forma, a biodistribuição *in vivo* das nanopartículas marcadas com Cy5 e das micropartículas carregadas com nanopartículas marcadas com Cy5 foram monitoradas utilizando imagem óptica multiespectral, ao longo do TGI após administração oral.

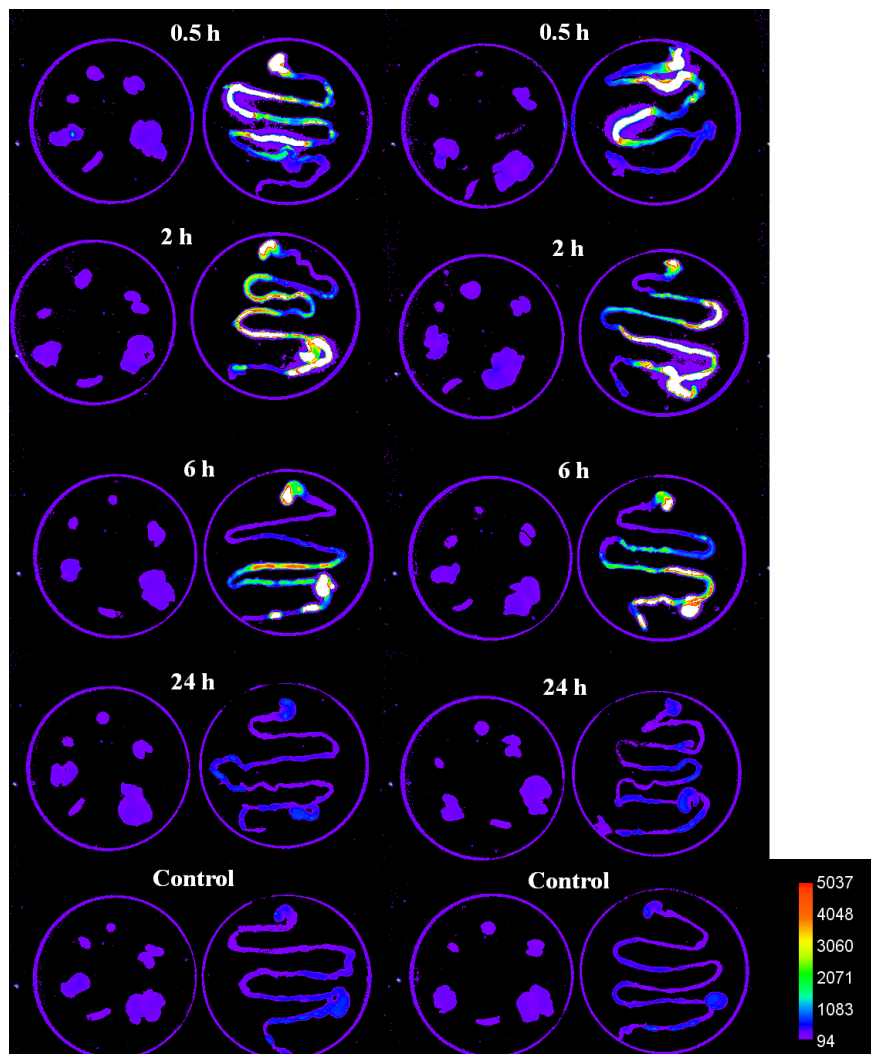
A Figura 43 representa a posição dos principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e do TGI mostrado nas Figuras 44 e 45.

**Figura 43.** Imagem representativa da posição dos principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e do TGI mostrado na Figura 44 e 45.



Conforme a Figura 44, os resultados demonstraram que o sinal de Cy5 a partir das nanopartículas foi mais intenso no estômago e no intestino delgado após 0,5 h da administração oral. Em 2 h, as nanopartículas estavam localizadas principalmente no estômago, no intestino delgado, no intestino grosso e no ceco. Ainda é possível observar um sinal de nanopartículas no estômago após 6 h, bem como um sinal elevado no trato gastrointestinal inferior (intestino grosso, ceco e cólon). Depois de 24 horas após a administração oral, nenhum sinal de Cy5 foi encontrado a partir das nanopartículas nos camundongos, demonstrando depuração do sistema. Além disso, as nanopartículas não apresentaram sinal de Cy5 em nenhum dos principais órgãos.

**Figura 44.** Biodistribuição *in vivo* das nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após a administração oral e os animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa).



Para as micropartículas carregadas com nanopartículas, o sinal de Cy5 foi observado no estômago e no intestino delgado em 0,5 h após a administração oral (Figura 45). Em 2 h e 6 h, o sinal de Cy5 foi detectado no estômago, intestino grosso (sinal mínimo) e ceco. Após 24 h, nenhum sinal foi mensurável a partir das micropartículas carregadas com nanopartículas, indicando depuração.

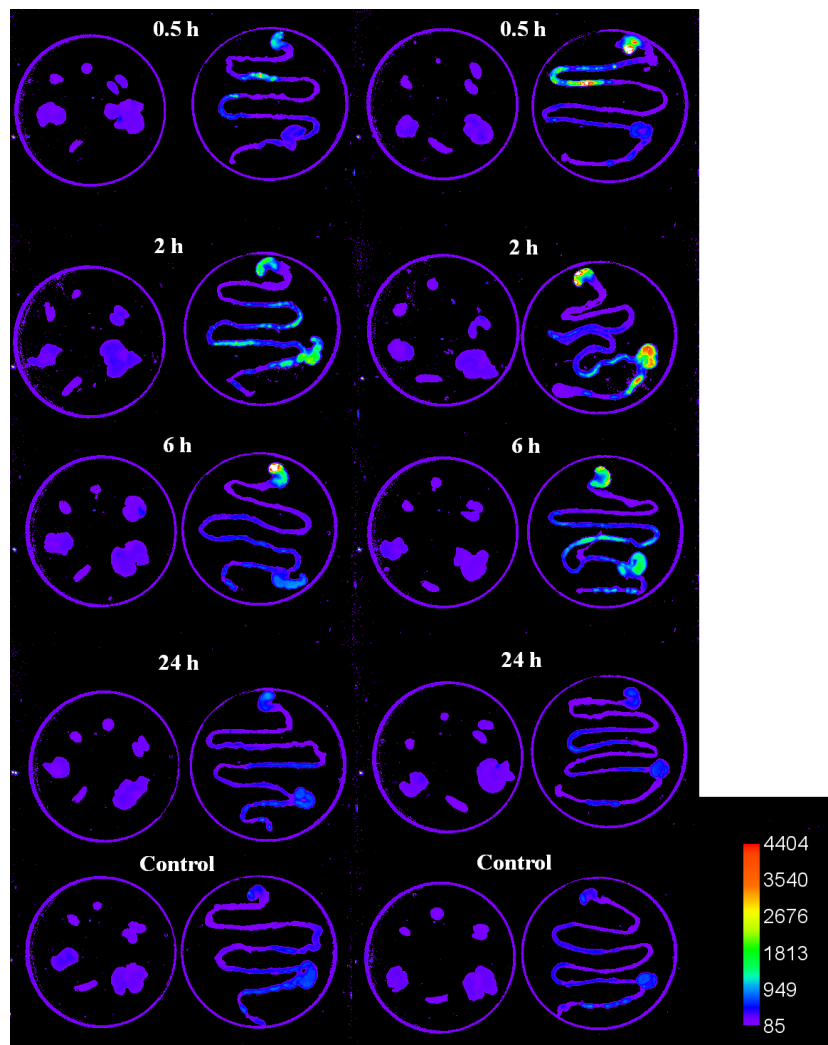
Estes resultados mostraram que a biodistribuição *in vivo* das nanopartículas foi mais rápida do que as micropartículas carregadas com nanopartículas, na qual o sinal de Cy5 foi espalhado por todo o TGI, demonstrando um menor tempo de trânsito para as nanopartículas. As altas taxas de fluorescência observadas para as nanopartículas provavelmente decorrem da interação com a mucosa intestinal do camundongo, levando

ao aumento do gradiente de concentração local, estabelecido pela mucoadesividade da QS.

Enquanto que, as micropartículas carregadas com nanopartículas apresentaram uma mudança no perfil de distribuição, com sinais de fluorescência relativamente baixo por todo TGI, o que pode sugerir uma liberação reduzida das nanopartículas devido à encapsulação em micropartículas de AR/P. Isto surge como consequência da natureza ácido resistente das micropartículas de AR/P. Esses resultados corroboram com os dados de liberação *in vitro*, em que as nanopartículas (QS/TPP/5-FLU) apresentaram maiores taxas de liberação comparada as nanopartículas incorporadas nas micropartículas de AR/P (item 6.12.2).

É importante ressaltar que os procedimentos, como preparo das amostras e administração das doses nos animais foram cuidadosamente realizados para minimizar possíveis variações. Além disso, as amostras de nanopartículas e micropartículas carregadas com nanopartículas foram visualizadas em um tubo eppendorf antes da administração oral e a intensidade relativa de Cy5 entre as amostras foi avaliada para evitar a diferença no sinal. Assim, a variação dos sinais nos dados *in vivo* pode ter a influência de fatores físico-químicos e fisiológicos na liberação de nanopartículas a partir de micropartículas. Tais fatores envolvem a dissolução do AR/P nas micropartículas e a liberação das nanopartículas, bem como a variação intra-animal do tempo de trânsito do TGI.

**Figura 45.** Biodistribuição *in vivo* das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas (proporção 4:1 QS/TPP) (sinal de Cy5) em diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) após administração oral e animais controle (não tratado) (sinal basal indicado pela cor roxa).



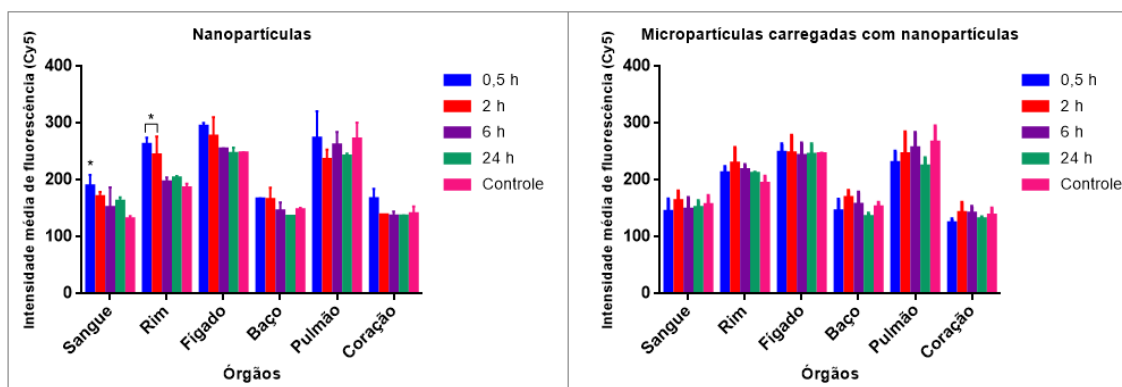
A fim de avaliar o efeito protetor das micropartículas de AR/P na biodistribuição das nanopartículas de QS e o acúmulo das nanopartículas e micropartículas carregadas com nanopartículas nos principais órgãos após a absorção na corrente sanguínea, a região de interesse (ROI) foi determinada. A intensidade média de fluorescência (sinal Cy5) foi extraída a partir das imagens dos órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) e sangue, nos diferentes tempos (0,5, 2, 6 e 24 h).

A partir da análise de ROI após a administração oral das nanopartículas de quitosana marcadas com Cy5, houve um acúmulo de sinal de Cy5 no sangue em 0,5 h, e nos rins do camundongo em 0,5 e 2 h ( $p < 0,05$ ), em comparação com o animal controle (Figura 46). Essa absorção não específica pode ser devida às propriedades

mucoadesivas da quitosana, uma vez que as cargas superficiais positivas das nanopartículas favorecem para a adesão à camada de muco aniônico do intestino. Além disso, a quitosana pode facilitar transporte de fármacos devido à sua capacidade de promover a abertura das junções paracelulares (RINAUDO, 2011). Além disso, o tamanho das nanopartículas também pode influenciar o acúmulo no sangue e nos órgãos principais. Schleh e colaboradores (2011) mostraram que o acúmulo de nanopartículas de ouro no sangue, rins, fígado e baço após a administração oral ocorreu em função do tamanho da partícula (SCHLEH et al., 2012).

Nos outros tempos analisados, não houve acúmulo de sinais de Cy5 no sangue e nos principais órgãos, e estes sinais foram equivalentes aos níveis de fluorescência detectados nos animais controle. Esses resultados revelaram que houve absorção sistêmica das nanopartículas no sangue, com depuração subsequente através do rim, o que pode resultar no acúmulo de fármacos na corrente sanguínea e órgãos saudáveis, aumentando seus efeitos citotóxicos. Isto não é desejável para fármacos quimioterápicos, uma vez que são altamente citotóxicos.

**Figura 46.** Intensidade de fluorescência das nanopartículas QS/TPP e das micropartículas de AR/P carregadas com nanopartículas QS/TPP (sinal Cy5) em vários tempos (0,5, 2, 6 e 24 h) nos principais órgãos (sangue, rim, fígado, baço, pulmão e coração), determinada usando análise de ROI ( $p < 0,05$ ).



Por outro lado, a análise de ROI após a administração oral das micropartículas carregadas com nanopartículas, não demonstrou acúmulo de sinal de Cy5 no sangue como nos principais órgãos (rim, fígado, baço, pulmão, coração) em todos os tempos analisados, quando comparado aos animais controle (Figura 46). Estes resultados indicam que não houve absorção sistêmica das nanopartículas de quitosana marcada com Cy5 quando estavam encapsuladas em micropartículas de AR/P, o que pode

minimizar a liberação indesejada de fármacos na corrente sanguínea, bem como seus efeitos citotóxicos durante a terapia do câncer colorretal.

Esses dados evidenciam que as micropartículas de AR/P foram capazes de proteger as nanopartículas, prevenindo sua absorção indesejada no sangue e nos principais órgãos após a administração oral.

## 7 CONCLUSÕES

A otimização e adequação dos parâmetros para a obtenção de nanopartículas de QS/TPP/5-FLU, tais como proporções de massa polimérica, ordem de adição dos componentes no sistema, e valores de pH da solução de QS, estavam diretamente relacionados à formação, bem como às propriedades físico-químicas das nanopartículas (tamanho, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação), constituindo uma etapa fundamental do presente estudo.

O desenvolvimento das nanopartículas baseadas em QS/TPP/5-FLU através do processo de geleificação ionotrópica permitiu a obtenção de partículas com forma esférica, diâmetro nanométrico, com distribuição homogênea de tamanho e elevado valor de potencial zeta, apresentando características favoráveis para a interação com a superfície celular, bem como a estabilidade do sistema. A eficiência de encapsulação do 5-FLU nestas nanopartículas foi de 23,58%.

A QS foi conjugada com sucesso com MTX através da formação de ligação amida, e diferentes graus de conjugação de MTX foram obtidos. Após a conjugação com MTX, as propriedades dessas nanopartículas como tamanho, PDI e potencial zeta permaneceram favoráveis, com uma pequena redução no teor de encapsulação do 5-FLU (15,71-18,23%). Essas nanopartículas funcionalizadas com MTX podem ser exploradas como uma estratégia para o direcionamento ativo para as células tumorais mediado por receptores de folato, a fim de aumentar o acúmulo no tumor e alcançar uma terapia mais seletiva no tratamento do câncer colorretal.

Da mesma maneira, essas nanopartículas foram conjugadas com sucesso usando o corante Cy5 e a quitosana marcada com Cy5 foi usada para avaliar a biodistribuição *in vivo* de nanopartículas e micropartículas carregadas de nanopartículas ao longo do TGI após administração oral por imagem animal multiespectral.

A capacidade mucoadesiva das nanopartículas foi demonstrada, de modo que a mucoadesão foi favorecida em pH 6,8 (região colônica) e reduzida em ambiente ácido.

As nanopartículas de quitosana foram encapsuladas com sucesso em micropartículas de amido resistente/pectina através do método de geleificação ionotrópica usando gotejamento manual e aerossolização, apresentando forma esférica e superfície homogênea. Além disso, o processo de obtenção das micropartículas carregadas com nanopartículas usando o método de aerossolização permitiu a formação de micropartículas menores (10 µm), usadas nos ensaios de biodistribuição *in vivo*.

A eficiência da encapsulação das nanopartículas em micropartículas de amido resistente/pectina foi evidenciada através da redução das taxas de liberação do 5-FLU em meio ácido, bem como o prolongamento das taxas de liberação do fármaco, evitando a liberação prematura das nanopartículas.

Os estudos de biodistribuição *in vivo* demonstraram liberação mínima das nanopartículas a partir das micropartículas ao longo do TGI, em comparação com as nanopartículas administradas sozinhas, que foram rapidamente liberadas durante seu trânsito no TGI. Além disso, os resultados revelaram que apenas as nanopartículas de quitosana foram absorvidas pela corrente sanguínea com subsequente eliminação pelo rim. Assim, o encapsulamento das nanopartículas nas micropartículas de amido resistente/pectina poderia não apenas ajudar as nanopartículas a escapar e/ou resistir ao ambiente gástrico do trato digestivo, mas também evitar potenciais efeitos colaterais sistêmicos pela via oral.

Baseado no conjunto de dados, as micropartículas de amido resistente/pectina são promissoras para a vetorização de nanopartículas carregadas de fármaco ao cólon pela via oral e os resultados deste trabalho devem contribuir para os avanços no tratamento do câncer colorretal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLMAALI, S. S. et al. Chemically crosslinked nanogels of PEGylated poly ethyleneimine (l-histidine substituted) synthesized via metal ion coordinated self-assembly for delivery of methotrexate: Cytocompatibility, cellular delivery and antitumor activity in resistant cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 897–907, 2016.

AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. J.; NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 42–58, 2010.

AJMAL, M. et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of methotrexate conjugated fluorescent carbon nanoparticles as drug delivery system for human lung cancer targeting. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 111–120, 2015.

ALEXANDER, K. Dosage Forms and Their Routes of Administration. In: HACKER, M.; MESSER, W.; BACHMANN, K. **Pharmacology: principles and practice**. Burlington, MA: Academic Press; Elsevier, 2009. Chapter 2, p. 9-29.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

ASHWANIKUMAR, N. et al. Dual drug delivery of 5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) through random copolymeric nanomicelles of PLGA and polyethylenimine demonstrating enhanced cell uptake and cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 520–528, 2014.

ASLAN, B. et al. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 904–913, 2013.

BANERJEE, D. et al. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1587, n. 2–3, p. 164–173, 2002.

BHARVADA, E.; SHAH, V.; MISRA, M. Exploring mixing uniformity of a pharmaceutical blend in a high shear mixture granulator using enthalpy values obtained from DSC. **Powder Technology**, v. 276, p. 103–111, 2015.

BHAVSAR, M. D.; AMIJI, M. M. Gastrointestinal distribution and in vivo gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS). **Journal**

**of Controlled Release**, v. 119, n. 3, p. 339–348, 2007.

BHUMKAR, R. D.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. 2–7, 2006.

BLANCO, M. D. et al. In vitro and in vivo evaluation of a folate-targeted copolymeric submicrohydrogel based on N-isopropylacrylamide as 5-fluorouracil delivery system. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1107–1125, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Validação de métodos analíticos. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 2017.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 24–36, 2012.

CALVO, P. et al. **Calvo1997\_Article\_ChitosanAndChitosanEthyleneOxi.pdf**, 1997.  
CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2010.

CHADHA, R. et al. Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical and other techniques. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, n. 3, p. 245–257, 2009.

CHAKRABORTY, J. et al. Mg-Al layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid drug delivery system: Evaluation of efficacy. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 2168–2174, 2013.

CHANDRAN, S. P. et al. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2, p. 45–48, 2017.

CHENG, G. et al. Anticancer activity of polymeric nanoparticles containing linoleic acid-SN38 (LA-SN38) conjugate in a murine model of colorectal cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. April, p. 822–829, 2019.

COIMBRA, P.M.A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2010.

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

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

DA SILVA BARBI, M. et al. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 865–874, 2015.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 135–146, 2010.

DE CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, n. October 2018, 2019.

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

DIMANTOV, A. et al. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93–100, 2004.

DIMANTOV, A.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Surface characterization and dissolution properties of high amylose com starch-pectin coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 29–37, 2004.

DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 243–251, 2010.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557–570, 2012.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.

FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan

nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136–151, 2011.

FERNANDEZ-MEGIA, E. et al. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by <sup>1</sup>H-NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 2, p. 155–161, 2005.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 2004.

FERREIRA, L. M. B. et al. Supramolecular design of hydrophobic and hydrophilic polymeric nanoparticles. **Design and Development of New Nanocarriers**, p. 181–221, 2018.

FUCHS, ADRIAN V.; GEMMELL, ANNA C.; THURECHT, K. J. Utilising polymers to understand diseases: advanced molecular imaging agents. **Polymer Chemistry**, n. 6, p. 868–880, 2015.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p. 139–151, 2003.

GU, X. et al. cRGD-decorated biodegradable polytyrosine nanoparticles for robust encapsulation and targeted delivery of doxorubicin to colorectal cancer in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 301, n. March, p. 110–118, 2019.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HASSANI, S. et al. Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes - Effect of parameters and encapsulation of tacrine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 34–43, 2015.

HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SCHOENMAKERS, P. J.; KOK, W. T. Determination of the amylose-amylopectin ratio of starches by iodine-affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1053, n. 1- 2, p. 227–234, 2004.

HTOON, A. et al. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organisation and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236–245, 2009.

HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1117–1132, 2015.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. O que é o câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer#:~:text=C%C3%A2ncer%20%C3%A9%20um%20termo%20que,adjacentes%20ou%20%C3%B3rg%C3%A3os%20a%20dist%C3%A2ncia>.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. p.25-27.

ING, L. Y. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, Article ID 632698, 2012.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JAIN, A. et al. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 179–190, 2010.

Jl, J. et al. Preparation, characterization, and in vitro release of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles loaded with methotrexate for targeted delivery. **Polymer Bulletin**, v. 68, n. 6, p. 1707–1720, 2012.

KAR, S. et al. Curcumin ameliorates the targeted delivery of methotrexate intercalated montmorillonite clay to cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 135, n. October 2018, p. 91–102, 2019.

KARAMI, F. et al. Analytical methodologies for determination of methotrexate and its metabolites in pharmaceutical, biological and environmental samples. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 6, p. 373–391, 2019.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4,

p. 801–810, 2010.

KATAS, H.; ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p. 216–225, 2006.

KOZOVSKA, Z.; GABRISOVA, V.; KUCEROVA, L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 911–916, 2014.

KUTSCHER, M. et al. Influence of salt type and ionic strength on self-assembly of dextran sulfate-ciprofloxacin nanoplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 21–29, 2015.

LI, C.; HEIN, S.; WANG, K. Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complex for the Delivery of Protein Drugs. **ISRN Biomaterials**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

LI, H. L. et al. Folate-polyethylene glycol conjugated carboxymethyl chitosan for tumor-targeted delivery of 5-fluorouracil. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p. 786–792, 2014.

LI, P. et al. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 698–704, 2011.

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

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LU, Y.; LOW, P. S. Y. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 675–693, 2002.

LUO, F. et al. Validation of a Janus role of methotrexate-based PEGylated chitosan nanoparticles in vitro. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2014.

MA, Y. et al. The in vivo fate of nanoparticles and nanoparticle-loaded microcapsules after oral administration in mice: Evaluation of their potential for colon-specific delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, n. June, p. 393–403, 2015.

MATOS, A. I. et al. Nanotechnology is an important strategy for combinational innovative chemo-immunotherapies against colorectal cancer. **Journal of Controlled**

**Release**, v. 307, n. June, p. 108–138, 2019.

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

MENEGUIN, A. B. **micropartículas de goma gelana revestidas com filmes de amido resistente/pectina como estratégia para administração oral de insulina**. 2016. 212f Tese (Doutorado). Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". 2016.

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

MISHRA, J. et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 86, n. 3, p. 232–250, 2013.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B. R.; VOSLOO, H. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 136, n. 1, p. 16–23, 2004.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: What can we learn? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 1997.

NASKAR, S.; SHARMA, S.; KUOTSU, K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, n. June 2018, p. 66–81, 2019.

NOGUEIRA, D. R. et al. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2758–2772, 2013.

NUNES, R; SARMENTO, B; SALETTE, R; FONTE, P. Oral nanotechnological approaches for colon-specific drug delivery. In: **Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine**, p. 133–168, 2018.

PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Evaluation of cytotoxicity and mechanism of apoptosis

of doxorubicin using folate-decorated chitosan nanoparticles for targeted delivery to retinoblastoma. **Cancer Nanotechnology**, v. 1, n. 1–6, p. 47–62, 2010.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75–81, 2014.

PERICÀS, J.; CORREDOIRA, J.; MIRÓ MEDA, J. Colorectal Adenomas. p. 1065–1075, 2016.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 44–52, 2010.

PRABAHARAN, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1313–1322, 2015.

PRASAD, R. et al. Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, n. 1–2, p. 70–78, 2007.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 785–796, 2004.

RÁZGA, F. et al. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 488–499, 2016.

RINAUDO, M. New amphiphilic grafted copolymers based on polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1338–1344, 2011.

RODEMBUSCH, F. **Espalhamento de luz estático e dinâmico em polímeros do tipo polimetacrilato, fluorescentes por transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (TPIEE)**. 2001. 91 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**,

v. 764, n. 1–2, p. 217–254, 2001.

SÁBIO, R. M. et al. New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, n. April, p. 379–409, 2019.

SADANANDAM, A. et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 619–625, 2013.

SADREDDINI, S. et al. Chitosan nanoparticles as a dual drug/siRNA delivery system for treatment of colorectal cancer. **Immunology Letters**, v. 181, p. 79–86, 2017.

SARGAZI, A. et al. Evaluation of supramolecule conjugated magnetic nanoparticles as a simultaneous carrier for methotrexate and tamoxifen. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, n. February 2017, p. 115–122, 2018.

SARMENTO, B. et al. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2006.

SCHLEH, C. et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 36–46, 2012.

SCHRODER, O. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future directions. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 530–537, 2003.

SCHWARTZ, R. N.; BLANKE, C. D.; PESKO, L. J. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. **Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP**, v. 10, n. 5, Supl. B, p. S2-S13, 2004.

SHANMUGANATHAN, R. et al. Chitosan nanopolymers: An overview of drug delivery against cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 727–736, 2019.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 163–174, 2012.

SINHA, R. et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: Bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909–1917, 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1–2, p. 19–38, 2001.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 2005.

SOCIETY, A. C. . **Cancer Facts & Figures 2018**. Atlanta: American Cancer Society; 2018.<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.

SONAJE, K. et al. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-Responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, n. 26, p. 6849–6858, 2010.

SREEKUMAR, S. et al. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

STEIN, G. S.; PARDEE, A. B. **Cell cycle and growth control: Biomolecular regulation and Cancer**. 2nd. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; Springer, 2004. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471656437>.

TAJIRI, T. et al. Developing dissolution testing methodologies for extended-release oral dosage forms with supersaturating properties. Case example: Solid dispersion matrix of indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 368–374, 2015.

THAPA, R. K. et al. Silver nanoparticle-embedded graphene oxide-methotrexate for targeted cancer treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 153, p. 95–103, 2017.

THURECHT, K. J. et al. Functional hyperbranched polymers: Toward targeted in vivo <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging using designed macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 15, p. 5336–5337, 2010.

TIĞLI AYDIN, R. S.; PULAT, M. 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

TUMMALA, S.; SATISH KUMAR, M. N.; PRAKASH, A. Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 308–314, 2015.

URBANSKA, A. M. et al. Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer. **Biomaterials**, v. 33, n. 18, p. 4752–4761, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011.

UPRETI, M.; JYOTI, A.; SETHI, P. Tumor microenvironment and nanotherapeutics. **Translational Cancer Research**, v. 2, p. 309–319, 2013.

VALENTE, J. et al. Colloidal Behavior of Proteins: Effects of the Second Virial Coefficient on Solubility, Crystallization and Aggregation of Proteins in Aqueous Solution. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 427–436, 2006.

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

WANG, C. F. et al. Dual-drug delivery by porous silicon nanoparticles for improved cellular uptake, sustained release, and combination therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 16, n. 1, p. 206–214, 2015.

WANG, Y. et al. Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: Preparation, characterization and drug release behavior in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1665–1670, 2011.

WEHLAND, M. et al. Biomarkers for anti-angiogenic therapy in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9338–9364, 2013.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77–84, 2001.

WU, Y. et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1–2, p. 235–245, 2005.

YOON, H. S.; LEE, J. H.; LIM, S. T. Utilization of retrograded waxy maize starch gels as tablet matrix for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 449–453, 2009.

ZAVAREZE, E. D. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 317–328,

2011.

ZHANG, X. B. et al. Prediction of the onset of flooding in an inclined tube at cryogenic temperatures. **Cryogenics**, v. 61, p. 98–106, 2014.