

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Sistemas poliméricos multifuncionais baseados em micropartículas
contendo nanocarreadores para liberação colônica da camptotecina**

Orientando: Fernanda Isadora Boni

Orientador: Profa. Dra Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Profa. Dra. Beatriz S. F. Cury

Araraquara

2022

Fernanda Isadora Boni

**Sistemas poliméricos multifuncionais baseados em micropartículas
contendo nanocarreadores para liberação colônica da camptotecina**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e
Medicamentos, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara

2022

B715s Boni, Fernanda Isadora.
Sistemas poliméricos multifuncionais baseados em micropartículas
contendo nanocarreadores para liberação colônica da camptotecina /
Fernanda Isadora Boni. – Araraquara: [S.n.], 2022.
131 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.
Coorientadora: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury.

1. Quitosana. 2. Goma gelana. 3. Ácido hialurônico. 4. Nanocápsulas.
5. Angiogênese. 6. Mucoadesão. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient.
II. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, 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

Agradecimentos

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

À minha família, em especial minha mãe, irmãs e sobrinhos, por todo o apoio emocional. Obrigada por todo o incentivo e por serem uma luz nos momentos de escuridão. Me empenho dia após dia para que vocês tenham orgulho da pessoa que me tornei. Amo vocês!

Ao Matheus, pelo companheirismo, pelas alegrias de partilhar a vida com você e por se tornar meu porto seguro em diversos momentos de dificuldade. Além disso, obrigada pelas discussões sobre termodinâmica, interações moleculares e afins, me ajudaram muito! Te amo!

Aos amigos que fiz durante a minha formação, desde o ensino fundamental até a graduação, que se tornaram presentes em diversos momentos da minha trajetória.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, pela convivência durante esses anos. Em especial gostaria de agradecer à Fabíola, Natália Noronha, Camila, Leda, Mariana, Natália Santos, Maurício e Valéria, pela amizade que ultrapassou o ambiente de trabalho, pelas conversas, companheirismo durante os experimentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e à minha Coorientadora Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury. Não é possível mensurar o quanto sou grata por todos os ensinamentos que vocês me transmitiram nesses 8 anos, por todos os conselhos, oportunidades e por todo crescimento que me proporcionaram nesses anos de convivência. Levo um pouquinho de vocês comigo daqui em diante, afinal vocês são parte importante na minha formação como profissional. Espero durante a minha carreira ser capaz de transmitir a visão, entusiasmo e competência que vocês sempre me transmitiram.

Aos Professores Dr. Marlus Chorilli, pelos anos de agradável convivência, conselhos e oportunidades que me proporcionou durante esses anos, além da disponibilidade dos

equipamentos e espaço de pesquisa. À Dra. Ana Dóris de Castro e Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, por compartilharem do seu conhecimento durante os anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista (*in memoriam*), que me concedeu a oportunidade da iniciação científica, me abrindo o caminho da pesquisa acadêmica, e sendo um exemplo de professor e pesquisador, que sempre me lembrarei.

À Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, responsável pela minha formação acadêmica. À secretaria de pós-graduação e todos os funcionários desta faculdade e Professores, os quais foram muito importantes na minha formação.

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

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

Em especial, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 2017/26349-0, pelo apoio financeiro, com a concessão das bolsas de doutorado.

“Sábio não é aquele que tem o conhecimento, mas sim aquele que sabe transmitir o que aprendeu”

Zeldi Isabel de Lemos

RESUMO

A superexpressão de receptores na superfície das células tumorais representa um potencial alvo para a vetorização de fármacos no tratamento do câncer. O desenvolvimento de nanopartículas com superfície modificada é uma importante estratégia tecnológica para promover a interação específica com as células tumorais, objetivando um tratamento mais seletivo. Nesse trabalho, sistemas para a via oral, baseados em nanocápsulas (NCs) microencapsuladas em matrizes de goma gelana (GG) e pectina (P) ou amido resistente (AR) foram desenvolvidos como plataforma para a vetorização cólon-específica da camptotecina (CPT), como potencial estratégia para o tratamento local do câncer colônico. Primeiramente, micropartículas vazias (MPs) de GG:P ou GG:AR foram obtidas pelo método de geleificação iônica utilizando os Ca^{2+} e/ou Al^{3+} . As MPs apresentaram diâmetro na faixa de 889 a 1793 μm e elevada circularidade. As MPs obtidas a partir de GG:P reticuladas com Al^{3+} apresentaram o menor diâmetro médio (889 μm). Entre as compostas por GG:AR, a reticulação com Ca^{2+} (GACa) resultou na formação de partículas menores ($\sim 1607 \mu\text{m}$). A capacidade de absorção de líquido das MPs foi elevada em pH 1,2 e 6,8, no entanto, as taxas de absorção do meio ácido foram menores, principalmente para a GACa. A porcentagem de erosão das MPs foi maior em pH 1,2 (20 a 26 %) e aparentemente ocorreu a nível superficial. Em pH 6,8, a porcentagem de erosão foi de 2,5 a 22,6 %, ocorrendo de forma homogênea ao longo da matriz. A reticulação com Ca^{2+} da GG:AR promoveu uma redução expressiva da degradação enzimática (pH 1,2 e 6,8), atributo promissor para a proteção do fármaco contra a degradação gástrica. A capacidade mucoadesiva das MPs foi evidenciada em ensaio *ex vivo* com mucosa intestinal suína. Com base nas propriedades consideradas promissoras, as partículas GACa e GPCa foram selecionadas para a incorporação das NCs. Na segunda etapa do trabalho, NCs foram obtidas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente, e revestidas com quitosana (QS), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP) e/ou ácido hialurônico (AH), a fim de modular as propriedades de superfície. Para tal, nanoemulsões aniônicas foram obtidas variando-se a concentração de polissorbato 80 e revestidas com QS, promovendo a inversão do potencial zeta das partículas formadas. As NCs com a proporção de 1,8 e 3,6:1 de lecitina:QS, foram posteriormente revestidas com AH e HP. As NCs com múltiplas camadas de revestimento com diâmetro $< 250 \text{ nm}$, PDI de $\sim 0,25$ e potencial zeta de -15 a -31 mV, foram selecionadas para a incorporação da CPT. A eficiência de incorporação da CPT foi $>94\%$ e a adição do fármaco resultou na redução do diâmetro das partículas. O ensaio de permeação *ex vivo* demonstrou que a nanoencapsulação reduziu a taxa de permeação da CPT através da mucosa intestinal em até $3,5\times$, e o revestimento com AH e HP reduziu o percentual de permeação em $2\times$ comparado às NCs revestidas apenas com QS. A capacidade mucoadesiva das NCs foi demonstrada em testes com mucina, simulando o pH gástrico e entérico. A nanoencapsulação não reduziu a atividade antiangiogênica da CPT, em ensaio com a CAM. Para as NCs contendo CPT, observou-se a ação antiangiogênica localizada, provavelmente devido à capacidade muco/biodesiva, sendo um efeito vantajoso para ação local e redução de efeitos adversos sistêmicos. Na terceira etapa do trabalho, as NCs foram microencapsuladas nas MPs obtidas previamente, apresentando rendimento entre 80 e 89%, e partículas com diâmetro entre 756 e 921 μm . A eficiência de incorporação das NCs variou de 16 a 56 %, sendo a composição do revestimento das NCs e da matriz das MPs fatores que influenciaram significativamente esse parâmetro. Estudos de mucoadesão *in vitro* e *ex vivo* evidenciaram a elevada capacidade mucoadesiva dos sistemas em segmentos do intestino delgado, cólon suíno e discos de mucina, comportamento que pode favorecer a imobilização do sistema no órgão alvo. O ensaio de digestão *in vitro* indicou a susceptibilidade da matriz à ação enzimática em ambiente gástrico, favorecendo a liberação da CPT nesse meio. As NCs apresentaram um

conjunto de atributos favoráveis, demonstrando ser uma plataforma promissora para o tratamento local do câncer colônico, explorando uma via indireta de inibição da progressão tumoral.

Palavras-chave: quitosana, goma gelana, ácido hialurônico, nanocápsulas, angiogênese, mucoadesão.

ABSTRACT

The overexpression of receptors on the surface of tumor cells represents a potential target for drug delivery in the treatment of cancer. The development of surface-modified nanoparticles is an important technological strategy to promote specific interaction with neoplastic cells, aiming at a more selective treatment. In this work, oral systems based on nanocapsules (NCs) microencapsulated in matrices of gellan gum (GG) and pectin (P) or resistant starch (AR) were developed as a platform for colon-specific target of camptothecin (CPT), as a potential strategy for the local treatment of colon cancer. First, empty microparticles (MPs) of GG:P or GG:AR were obtained by the ionotropic gelation method using Ca^{2+} and/or Al^{3+} . The MPs presented diameter in the range of 889 to 1793 μm and high circularity. The MPs obtained from GG:P crosslinked with Al^{3+} had the smallest mean diameter (889 μm). Among those, the composed of GG:AR, crosslinking with Ca^{2+} (GACa) resulted in the formation of smaller particles ($\sim 1607 \mu\text{m}$). The liquid absorption capacity of MPs was high at pH 1.2 and 6.8, however, the absorption rates of acid medium were lower, mainly for GACa. The percentage of MPs erosion was higher at pH 1.2 (20 to 26%) and apparently occurred at the surface level. At pH 6.8, the percentage of erosion ranged from 2.5 to 22.6%, occurring homogeneously along the matrix. Crosslinking with Ca^{2+} of GG:AR blend promoted an expressive reduction of enzymatic degradation (pH 1.2 and 6.8), a promising attribute for the protection of the drug against gastric degradation. The mucoadhesive capacity of MPs was evidenced in an *ex vivo* assay with porcine intestinal mucosa. Based on the properties considered promising, GACa and GPCa particles were selected for the incorporation of NCs. In the second stage of the work, NCs were obtained by the emulsification/solvent evaporation method, and coated with chitosan (QS), hypromellose phthalate (HP) and/or hyaluronic acid (HA), in order to modulate the surface properties. For this, anionic nanoemulsions were obtained by varying the concentration of polysorbate 80 and, coated with QS, promoting the inversion of the zeta potential of the particles. The NCs with the ratio of 1.8 and 3.6:1 of lecithin:QS, were later coated with HA and HP. NCs with multiple coating layers with diameter $< 250 \text{ nm}$, PDI of ~ 0.25 and zeta potential of -15 to -31 mV , were selected for CPT incorporation. The incorporation efficiency was $>94\%$ and the drug addition resulted in particle diameter reduction. The *ex vivo* permeation assay showed that nanoencapsulation reduced the permeation rate of CPT through the intestinal mucosa by up to $3.5\times$, and coating with HA and HP reduced the permeation percentage by $2\times$ compared to NCs coated with QS alone. The mucoadhesive capacity of NCs was demonstrated in mucin tests, simulating gastric and enteric pH. Nanoencapsulation did not reduce the antiangiogenic activity of CPT in an assay with CAM. For NCs containing CPT, localized antiangiogenic action was observed, probably due to the mucus/biodesive capacity, which is an advantageous effect for local action and reduction of systemic adverse effects. In the third stage of the work, the NCs were microencapsulated in the previously obtained MPs, presenting a yield between 80 and 89%, and particles with a diameter between 756 and 921 μm . The NCs incorporation efficiency ranged from 16 to 56%, and the composition of the NC coating and the MPs matrix were factors that significantly influenced this parameter. *In vitro* and *ex vivo* mucoadhesion studies showed the high mucoadhesive capacity of the systems in segments of porcine small intestine, colon and mucin discs, a behavior that may favor the immobilization of the system in the target organ. The *in vitro* digestion assay indicated the susceptibility of the matrix to enzymatic action in the gastric environment, favoring the release of CPT in this medium. NCs showed a set of favorable attributes, proving to be a promising platform for the local treatment of colonic cancer, exploring an indirect pathway of tumor progression inhibition.

Keywords: chitosan, gellan gum, hyaluronic acid, nanocapsules, angiogenesis, mucoadhesion.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo da anatomia do tumor colônico. (Fonte: próprio autor).	24
Figura 2. Fisiologia do trato gastrointestinal. (Adaptado de HUA et al., 2015).....	25
Figura 3. Estrutura molecular da GG nativa (A) e GG desacetilada (B). (Fonte: OSMAŁEK et. al. 2014).....	29
Figura 4. Representação da estrutura da pectina. (Fonte: Khotimchenko, 2020).....	31
Figura 5. Estrutura molecular da amilose e amilopectina.	32
Figura 6. Representação esquemática da vascularização e anatomia tumoral. (Adaptado de: https://www.mccourier.com/global-cancer-angiogenesis).	35
Figura 7. Conformação espacial e unidade monomérica que compõe a quitosana (QS), o ácido hialurônico (AH) e o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP). (Adaptado de Boni et. al., 2021).	38
Figura 8. Estrutura molecular da camptotecina (CPT). (Fonte: PubChem, 2020).	41
Figura 9. Fluxograma de execução.....	43
Figura 10. Dispositivo de Enslin adaptado.....	48
Figura 11. Dispositivo acrílico para o ensaio de erosão.....	48
Figura 12. Representação esquemática do teste "ex vivo" de mucoadesão.....	57
Figura 13. Esquema ilustrativo da metodologia utilizada no ensaio de mucoadesão “in vitro”.	58
Figura 14. Cromatograma e espectro de absorção na região do UV da CPT.....	60
Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas da CPT (25 µg.mL ⁻¹) obtidos pelo método cromatográfico proposto.....	61
Figura 16. (A) Sobreposição dos cromatogramas dos polímeros e da CPT e (B) Cromatograma da fase móvel.....	62
Figura 17. Curva de analítica da CPT obtida por CLAE.....	63
Figura 18. Microscopia óptica e de luz polarizada dos grânulos de amido na fase previa ao processamento (A e A2), após a gelatinização (B e B2) e após a retrogradação (C e C2)..	67
Figura 19. Distribuição granulométrica das MPs.	71
Figura 20. Fotomicrografias da superfície das MPs A: GACa, B: GAAl, C: GACaAl D: GPCa E: GPAl F: GPCaAl (os aumentos são representados pelos números 2: 150 vezes e 3: 10.000 vezes).	72

Figura 21. Fotomicrografias evidenciando a estrutura interna das MPs A: GACa, B: GAAl, C:GACaAl, D: GPCa, E: GPAl e F: GPCaAl (sendo os aumentos representados pelos números 4: 150 vezes e 5: 10.000 vezes).	73
Figura 22. Perfis de absorção de líquido (mL.g^{-1}), porcentagem de erosão e fotomicrografias das micropartículas após contato com HCl (pH1,2) e tampão fosfato (pH 6,8).....	74
Figura 23. Fotomicrografias das micropartículas após o ensaio de degradação enzimática aumento 100 vezes (A:GACa; B:GAAl; C:GACaAl; D:GPCa; E:GPAl e F:GPCaAl, 1:meio gástrico e 2:meio entérico).	78
Figura 24. Força máxima de mucoadesão (FMax) das micropartículas, pectina (P), amido resistente (AR) e goma gelana (GG). * As letras iguais representam similaridade.	79
Figura 25. Estrutura molecular do fosfolipídio.	84
Figura 26. Aspecto macroscópico das NEs desenvolvidos a partir da metodologia e composição propostas.....	85
Figura 27. Representação esquemática da estrutura dos NEs.	86
Figura 28. Diâmetro, PDI e potencial zeta das nanoemulsões F1 e F2 revestidas com QS pela metodologia “I”.	88
Figura 29. Distribuição de tamanho e potencial zeta da amostra F1_1 (perfil semelhante foi observado para as demais partículas).	89
Figura 30. Diâmetro, PDI e potencial zeta das amostras revestidas com QS pela metodologia “II”.	91
Figura 31. Gráfico de distribuição de tamanho e potencial zeta da F2_13_0,5.	92
Figura 32. Gráfico de distribuição de tamanho e potencial zeta da amostra F2_3,6_1.....	93
Figura 33. Gráficos de diâmetro, PDI e potencial zeta das partículas revestidas com AH.	95
Figura 34. Representação esquemática das NCs revestidas com A: QS, B: QS+AH e C: QS+AH+HP.....	97
Figura 35. Fotomicrografias das amostras F2_3,6_1a3 e F2_3,6_1p3, aumento 10.000 vezes.	98
Figura 36. Distribuição de tamanho e potencial zeta das NCs revestidas com AH ou AH+HP.	99
Figura 37. Distribuição de tamanho a partir de medições de NTA (A:F2_3,6_1a3C e B: F2_3,6_1p3C).....	100
Figura 38. Fotomicrografias das NCs contendo CPT A: F2_3,6_1C; B: F2_3,6_1a3C e C: F2_3,6_1p3C.	102

Figura 39. Ensaio de permeação <i>in vitro</i> : (A) Perfis de permeação através da membrana intestinal suína; (B) Permeabilidade aparente da CPT veiculada nas diferentes NCs e (C) Retenção de CPT veiculada em NCs na mucosa intestinal.	103
Figura 40. Influência da adição de soluções de mucina no potencial zeta das nanocápsulas contendo CPT.	106
Figura 41. Imagens <i>in ovo</i> 48 horas após aplicação das amostras.	108
Figura 42. Análise quantitativa do número de vasos após a aplicação das amostras e incubação por 48 horas. *letras iguais representam similaridade.	110
Figura 43. Fotomicrografias da superfície (aumentos de 80 e 5.000 vezes) e estrutura interna (aumentos de 80 e 20.000 vezes) das MCs A: GAP, B:GAA; C: GPA e D: GPP.....	111
Figura 44. Fotomicrografia das A: GAA; B: GAP; C: GPA e D: GPP (aumento de 50 vezes).	112
Figura 45. Representação esquemática da estrutura das micropartículas a: vazia e b: contendo as NCs.....	113
Figura 46. Força máxima de mucoadesão (<i>FMax</i>) das MCs.	116
Figura 47. Perfil de liberação da CPT a partir do ensaio de digestão “ <i>in vitro</i> ” e imagem das MPs após o processo.	118

Lista de Tabela

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na metodologia.....	44
Tabela 2. Composição das nanoemulsões.	51
Tabela 3. Composição dos meios digestivos simulados.....	59
Tabela 4. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise da CPT.	60
Tabela 5. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva....	63
Tabela 6. Resultados obtidos para o teste de repetibilidade ou precisão intracorrída.	63
Tabela 7. Resultado do ensaio de precisão intercorrída.	64
Tabela 8. Exatidão entre as concentrações teóricas e experimentais da CPT.	64
Tabela 9. Variações nos parâmetros cromatográficos para avaliação da robustez do método analítico.	65
Tabela 10. Avaliação da robustez do método analítico para quantificação da CPT por CLAE.	65
Tabela 11. Nomenclatura e composição das micropartículas.	68
Tabela 12. Diâmetro, circularidade média e Índice Span das MPs (n=100).	68
Tabela 13. Degradação enzimática das micropartículas de GG:P (GP) e GG:AR (GA) reticuladas com Ca^{2+} (Ca), Al^{3+} (Al) ou Ca^{2+} e Al^{3+} (CaAl).	77
Tabela 14. Aspecto macroscópico das preparações contendo 2 mg.ml^{-1} da CPT em diferentes solventes e suas respectivas constantes dielétricas (siglas: L- límpido, LT-ligeiramente turvo e T:turvo).	82
Tabela 15. Nomenclatura das NEs conforme o conteúdo de polissorbato 80.	85
Tabela 16. Diâmetro (nm), PDI e potencial zeta (mV) das nanoemulsões (média $\pm$ DP)...	85
Tabela 17. Diâmetro (nm), PDI e potencial zeta (mV) das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento (média $\pm$ DP).	87
Tabela 18. Características das partículas revestidas com AH ou AH e HP.....	96
Tabela 19. Diâmetro, PDI, SPAN e potencial zeta das nanocápsulas contendo CPT.....	98
Tabela 20. Porcentagem de EE da CPT nas NCs.	102
Tabela 21. Diâmetro, circularidade, valor de span e rendimento das MCs (n=100, média $\pm$ DP).....	112
Tabela 22. Eficiência de incorporação das NCs contendo CPT nas micropartículas.....	114
Tabela 23. Resultado do ensaio <i>ex vivo</i> de mucoadesão das MCs.	115

Tabela 24. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação da CPT..... 119

Lista de abreviaturas e siglas

TGI: trato gastrointestinal

CC: câncer colônico

P-gp: glicoproteína P

GG: goma gelana

P: pectina

AR: amido resistente

AH: ácido hialurônico

QS: quitosana

HP: ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

MPs: micropartículas poliméricas

MCs: micropartículas poliméricas contendo nanocápsulas

CPT: camptotecina

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

DPR%: desvio padrão relativo percentual

tR: tempo de retenção

FC: fator de cauda

L: lecitina de soja

NEs: nanoemulsões

NCs: nanocápsulas

D: diclorometano

E: etanol

R%: porcentagem de rendimento

FMax: força máxima de destacamento

PDI: índice de polidispersão

GACa: micropartículas vazias de GG:AR reticuladas com cálcio

GPCa: micropartículas vazias de GG:P reticuladas com cálcio

F2_3,6_1: nanocápsulas vazias contendo lecitina:quitosana na razão 3,6:1

F2_3,6_1a3: nanocápsulas vazias contendo lecitina:quitosana na razão 3,6:1, revestidas também com ácido hialurônico

F2_3,6_1a3C: nanocápsulas com CPT, contendo lecitina:quitosana na razão 3,6:1, revestidas com ácido hialurônico

F2_3,6_1p3: nanocápsulas vazias contendo lecitina:quitosana na razão 3,6:1, revestidas com ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

F2_3,6_1p3C: nanocápsulas com CPT contendo lecitina:quitosana na razão 3,6:1, revestidas com ácido hialurônico e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1. Sistemas cólon-específicos para administração oral	23
2.1.1. Biopolímeros na composição de sistemas de liberação cólon-específica	27
2.2. Terapia oral como alternativa no tratamento do câncer colônico	34
2.2.1. Nanotecnologia aplicada ao tratamento do CC	36
2.3. Camptotecina	40
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Principais materiais e equipamentos	42
4.2. Métodos	43
4.2.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da CPT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	43
4.2.2. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)	46
4.2.3. Caracterização das MPs	47
4.2.4. Avaliação da degradação enzimática das MPs em meios gástrico e entérico simulados	49
4.2.5. Estudo da mucoadesividade das MPs	49
4.2.6. Desenvolvimento das nanocápsulas (NCs)	50
4.2.7. Caracterização das NCs	52
4.2.8. Nanocápsulas contendo CPT	53
4.2.9. Desenvolvimento das micropartículas contendo CPT nanoencapsulada (MCs)	55
4.2.10. Caracterização das MCs	56
4.2.11. Estudo da mucoadesividade das MCs	57
4.2.12. Avaliação da liberação da CPT utilizando modelo estático para simulação da digestão (INFOGEST)	58

4.2.13. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da CPT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	59
5.1.1. Conformidade do sistema cromatográfico	59
5.1.2. Especificidade/seletividade	61
5.1.3. Linearidade.....	62
5.1.4. Precisão	63
5.1.5. Exatidão.....	64
5.1.6. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	65
5.1.7. Robustez.....	65
5.2. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs).....	66
5.2.1. Retrogradação do amido	66
5.2.2. Obtenção e caracterização estrutural e morfológica das MPs.....	67
5.3. Avaliação da capacidade de absorção de líquidos e erosão em pH 1.2 e 6.8..	73
5.4. Avaliação do comportamento de degradação enzimática das micropartículas frente ao valor de pH e conteúdo enzimático	76
5.5. Estudo ex vivo da mucoadesividade das MPs.....	78
5.6. Seleção da micropartícula para a incorporação das NCs	80
5.7. Desenvolvimento das nanocápsulas (NCs)	81
5.7.1. Seleção dos solventes para solubilização da CPT	81
5.7.2. Desenvolvimento das nanoemulsões.....	83
5.7.3. Revestimento das nanoemulsões para a formação das nanocápsulas (NCs)	87
5.8. Nanocápsulas contendo CPT.....	98
5.8.1. Avaliação da forma das NCs.....	101
5.8.2. Eficiência de encapsulação da CPT	102
5.8.3. Permeação in vitro em mucosa suína	103

5.8.4. Estudo da interação entre as NCs contendo CPT e a mucina a partir da análise do potencial zeta	105
5.8.5. Avaliação da atividade antiangiogênica da CPT utilizando membrana corioalantóica de galinha (CAM)	108
5.9. Desenvolvimento das micropartículas contendo as nanocápsulas com CPT	110
5.9.1. Avaliação do diâmetro, circularidade e valor de span das MCs	112
5.9.2. Avaliação da eficiência de incorporação das NCs nas micropartículas.	114
5.10. Estudo da mucoadesividade das MCs	115
5.10.1. Avaliação da mucoadesividade utilizando a técnica “wash off”	115
5.10.2. Avaliação da mucoadesividade in vitro em texturomêtro.....	116
5.11. Avaliação da liberação da CPT utilizando modelo estático para simulação da digestão (INFOGEST).....	117
6. CONCLUSÕES	120

1. INTRODUÇÃO

O delineamento de sistemas de liberação inovadores tem como objetivo o controle temporal e/ou espacial da liberação do fármaco, visando maximizar sua concentração no sítio de ação e/ou absorção, reduzir a dose e frequência de administrações, bem como as oscilações dos níveis plasmáticos, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004; PINTO, 2010).

Dentre os diversos sistemas de liberação de fármacos inovadores, os destinados a via oral são de particular interesse para o tratamento de doenças crônicas degenerativas, como o câncer, devido as vantagens inerentes a essa via, dentre elas a facilidade, segurança e conforto na administração, além da possibilidade de flexibilização de doses (FASANO, 1998; KHAFAGY et al., 2007). No entanto, as extremas variações de pH e conteúdo enzimático ao longo do trato gastrointestinal (TGI), além do tempo de trânsito e integridade do muco e mucosa, os quais podem variar no estado patológico, impõe grandes desafios para que após a administração oral, o fármaco alcance o local de ação/absorção de forma eficiente.

Entre os sistemas destinados a via oral, as micropartículas quando formuladas com polímeros e tecnologias apropriadas, representam sistemas de liberação promissores capazes de proteger o fármaco da degradação prematura, aumentando sua estabilidade frente ao pH e ação enzimática, além de promover controle das taxas de liberação (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018). Porém, as dimensões dos sistemas microestruturados podem dificultar a modulação da performance biológica, considerando que suas dimensões impossibilitam a difusão através das membranas fisiológicas e a interação com receptores celulares específicos (KOHANE, 2007).

Em contrapartida, devido à reduzida dimensão e elevada energia de superfície, as nanopartículas são sistemas capazes de interagir ativamente com os componentes da membrana celular, regulando funções e mecanismos de defesa, resultando no maior grau de permeação e internalização celular. A elevada energia livre de superfície desses sistemas favorece a ocorrência de interações dinâmicas e de elevada especificidade na nano-biointerface. Porém, essa elevada energia de superfície pode limitar a administração pela via oral, já que deve favorecer também as interações com enzimas e outras macromoléculas inespecíficas, resultando, por exemplo, na degradação das partículas e do fármaco nas porções superiores do TGI (NEL et al., 2009).

Frente à essas propriedades e limitações, a associação da micro e nanotecnologia representa uma vantajosa e potencial estratégia para o desenvolvimento de um sistema inovador e eficiente para a terapia mais eficaz e segura de doenças que acometem o TGI.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo o delineamento de um sistema multifuncional para administração oral, baseado em nanopartículas microencapsuladas, a fim de promover a liberação cólon-específica da camptotecina (CPT), como potencial estratégia para o tratamento de câncer colônico.

A CPT apresenta potente atividade antitumoral, sendo classificada como um quimioterápico ciclo-específico (GILBERT; CHALMERS; EL-KHAMISY, 2012). Além de atuar diretamente inibindo o crescimento das células tumorais, estudos relatam a ação antiangiogênica da CPT, agindo na inibição da progressão de diversos tipos de tumores sólidos como o colônico (CLEMENTS et al., 1999; DAI et al., 2011; SUN et al., 2007).

Apesar do potencial terapêutico, a falta de especificidade, baixa solubilidade aquosa e a instabilidade química da CPT limitam sua aplicação na terapia convencional (FULZELE; SATDIVE, 2005).

Dessa forma, a compartimentalização da CPT em nanoestruturas baseadas em materiais com propriedades específicas e moduladas, pode contribuir efetivamente para a interação específica com células tumorais, reduzindo sua toxicidade não específica e potencializando sua ação terapêutica.

A associação de diferentes estratégias no desenvolvimento do sistema multifuncional proposto neste trabalho é altamente inovadora, e busca o avanço na pesquisa por novas alternativas terapêuticas para o tratamento mais seletivo e específico do câncer colônico.

A administração oral, a maior especificidade de ação e a redução dos efeitos colaterais são atributos críticos para a maior adesão do paciente ao tratamento, melhoria em sua qualidade de vida e a maximização do efeito terapêutico. Contudo, deve-se considerar a complexidade tecnológica que envolve a utilização de diferentes materiais e técnicas para alcançar a formação de um sistema matricial micrométrico contendo em sua estrutura nanopartículas carregadas com o fármaco, de forma que a modulação das propriedades dos sistemas micro e nano estruturados são fundamentais para se alcançar o objetivo pretendido.

Para o desenvolvimento racional das nanopartículas, considerou-se como propriedades potencialmente promissoras a mucoadesividade e habilidade de interagir de forma específica com as células tumorais na região intestinal. Outro atributo crítico foi a capacidade da nanoestrutura encapsular de forma efetiva a CPT, considerando sua baixa solubilidade aquosa.

Para a efetiva compartimentalização da CPT, racionalizou-se o desenvolvimento de nanocápsulas com núcleo orgânico, enquanto que para atribuir as propriedades de superfície desejáveis, realizou-se a modificação da superfície com diferentes polímeros.

Entre os polímeros selecionados, destaca-se o ácido hialurônico (AH), um polímero natural que tem despertado particular interesse em nosso grupo de pesquisa para o desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos inovadores. Os fragmentos de AH interagem de forma específica com receptores celulares RHAMM e CD44, superexpressos na superfície das células tumorais, principalmente da região intestinal, induzindo diretamente a uma série de sinais de internalização (TOOLE, 2004). Também foram selecionados para compor o sistema a quitosana (QS), polímero natural, catiônico, com importante capacidade bio e mucoadesiva, e o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP), aniônico e atóxico, com solubilidade pH dependente e com potencial capacidade de modular o efluxo celular (BONI et al., 2018; GHOSH et al., 2011; RINAUDO, 2006).

Para as micropartículas que veicularão as nanocápsulas, delineou-se um sistema matricial com propriedade mucoadesiva e resistência à degradação enzimática nas porções superiores do TGI, evitando a liberação prematura do fármaco no ambiente ácido do estômago, favorecendo sua liberação no meio entérico.

Com base no conhecimento gerado por pesquisas previamente desenvolvidas em nosso grupo (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; MENEGUIN et al., 2018; OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; PREZOTTI et al., 2018; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014) os polímeros goma gelana (GG), pectina (P) e amido resistente (AR) foram considerados promissores para atender o perfil alvo. A GG é um exopolissacarídeo obtido pelo processo de fermentação aeróbica do microrganismo *Sphingomonas elodea*. Por apresentar elevada capacidade de geleificação, ser atóxica e biodegradável é utilizada no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos. A formação de hidrogéis de GG é dependente de temperatura e pode ser induzida pela presença de cátions divalentes ou trivalentes (OSMAŁEK; FROELICH; TASAREK, 2014).

Estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, destacaram a elevada capacidade mucoadesiva e o efetivo controle das taxas de liberação do fármaco por sistemas baseados em GG (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017; PREZOTTI et al., 2018; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

A P é um polissacarídeo que constitui a parede celular de diversos vegetais, é amplamente utilizada em alimentos processados e como componente na obtenção de sistemas para liberação cólon-específica de fármacos (CARBINATTO et al., 2012). As macromoléculas de P permanecerem agregadas em pH ácido e esses agregados não são degradados ou digeridos pelas enzimas presentes no ambiente estomacal (THAKUR et al., 1997). Já o AR é uma fração

do amido que apresenta propriedades adequadas a aplicação pretendida, como reduzida digestão no estômago e intestino delgado, além de degradação específica por enzimas presentes no cólon (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010a; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017).

O presente projeto representa uma evolução do conhecimento adquirido, para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada multifuncionais, pouco explorados na literatura, no qual buscou-se a associação de materiais de relativo baixo custo, biocompatíveis e biodegradáveis, já bastante consolidados individualmente em nosso grupo de pesquisa. Apesar de todo o conhecimento a cerca desses materiais, a obtenção do sistema proposto representa um grande desafio, considerando sua complexidade estrutural e os atributos críticos ao desempenho proposto.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Ao longo dos anos, a pesquisa na área farmacêutica vem se concentrando na descoberta e síntese de novas moléculas farmacologicamente ativas para a prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas. Em 2019, o mercado farmacêutico global investiu cerca de 1,25 trilhões de dólares no setor de pesquisa e desenvolvimento e estima-se um aumento de aproximadamente 30 % nesse valor para 2024 (MIKULIC, 2020). Esses elevados investimentos se justificam pela corrida das empresas para a oferta de novos produtos, associada a necessidade de novas terapias principalmente para o câncer, depressão e Alzheimer, doenças complexas e cada vez mais frequentes devido ao envelhecimento da população mundial (LEONARDI; MATOS, 2020).

Apesar dos elevados investimentos financeiros e intelectuais, o processo de descoberta, isolamento e a síntese de novos fármacos é complexo, de alto custo e, na maioria dos casos, anos de pesquisa são necessários para que sua eficácia e segurança sejam comprovadas. Além disso, é evidente que muitas moléculas apesar de apresentarem ação não apresentam benefício terapêutico, devido à problemas farmacocinéticos que envolvem absorção, distribuição e metabolização, ou farmacodinâmicos, resultantes de mecanismos de resistência que afetam a interação fármaco-receptor (FENTON et al., 2018; PEREIRA, 2007).

A utilização dessas moléculas em formas farmacêuticas convencionais normalmente não permite a modulação da solubilidade e permeabilidade da molécula, bem como de seu perfil de distribuição, resultando em flutuações da concentração plasmática e tecidual, além de toxicidade inespecífica (MURUGESAN et al., 2020).

Nesse contexto, os avanços na tecnologia farmacêutica e na ciência de materiais, por meio do desenvolvimento e delineamento racional de sistemas de liberação inovadores, têm permitido o aumento da eficácia e segurança de novos fármacos e/ou biomoléculas com problemas relacionados a estabilidade, permeabilidade e toxicidade. Mais recentemente, a busca por sistemas com a habilidade de vetorizar e/ou modular as taxas de liberação; como a redução das variações dos níveis plasmáticos e diminuição de dose e frequência de administrações pode promover uma série de vantagens. Quando um fármaco é compartimentalizado, os parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição e eliminação, não são apenas condicionados pelas propriedades intrínsecas do fármaco, mas também são fortemente influenciados pelas propriedades do carreador (BONI et al., 2021).

Além dessas vantagens, a incorporação de fármacos em sistemas de liberação inovadores pode permitir explorar novas vias de administração, tornando o tratamento mais seguro, confortável e efetivo ao paciente.

2.1. Sistemas cólon-específicos para administração oral

A via oral é a mais comumente utilizada para a administração de diversas classes de fármacos, veiculados em formas farmacêuticas sólidas, líquidas e particuladas, por ser uma via não invasiva, conveniente ao paciente, que permite a auto administração e a flexibilidade de dose (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019).

Diversos objetivos podem ser alcançados com o delineamento de sistemas orais para liberação modificada de fármacos. Dentre eles, destacam-se o aumento da biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade e/ou permeabilidade, como os pertencentes as classes II (elevada solubilidade e baixa permeabilidade) e IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Por outro lado, estratégias adicionais podem agregar potencialidade para o tratamento local de doenças gastrointestinais, possibilitando o direcionamento da liberação do fármaco para um órgão ou tecido específico do TGI, aumentando sua internalização celular e reduzindo a permeabilidade intestinal (FENTON et al., 2018; HUA; SALOMONE, 2020).

Entre as doenças que acometem o TGI, o câncer colônico (CC) vem sendo alvo de diversos estudos devido a elevada incidência e taxa de mortalidade. Anatomicamente, o CC é caracterizado por um tumor sólido que geralmente se desenvolve no cólon descendente ou sigmoide, altamente vascularizado e de crescimento relativamente rápido se não tratado (Figura 1) (RÊGO et al., 2012).

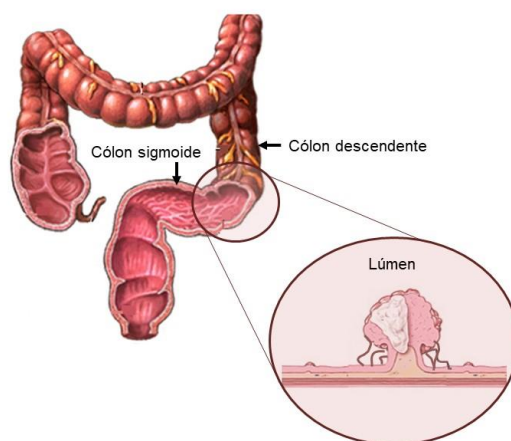


Figura 1. Esquema ilustrativo da anatomia do tumor colônico. (Fonte: próprio autor).

As abordagens terapêuticas para o tratamento desse tipo de câncer envolvem a quimioterapia intravenosa, associada ou não a radioterapia e ressecção cirúrgica (TILLY, 2003). Entre os principais obstáculos enfrentados na terapia convencional do CC, destacam-se os diversos efeitos colaterais ocasionados principalmente pela falta de especificidade/seletividade dos fármacos, a predisposição das células tumorais em desenvolverem resistência e a dificuldade dos antineoplásicos em atingirem o alvo em concentrações efetivas (ESTANQUEIRO et al., 2015).

O cólon é um dos últimos segmentos do TGI, com tempo de trânsito prolongado, baixa atividade proteolítica e pH próximo da neutralidade. Apresenta reduzida taxa de renovação da camada de muco e baixa motilidade, em comparação com o estômago e intestino delgado, características que o tornam um sítio promissor para a liberação, ação e/ou absorção de fármacos.

O delineamento de sistemas colón-específicos pode permitir o tratamento local de doenças, como o CC, com elevada eficácia, reduzindo o risco de efeitos adversos sistêmicos (HUA; SALOMONE, 2020; IBEKWE et al., 2008). Contudo, deve-se considerar que cada segmento do TGI apresenta diferenças anátomo-fisiológicas que podem atuar como barreiras para a vetorização colón-específica, após a administração oral. A variação extrema de pH, a viscosidade/composição dos fluidos biológicos e o complexo conteúdo enzimático estão entre os principais fatores que devem ser ponderados (Figura 2) (DATE; HANES; ENSIGN, 2016).

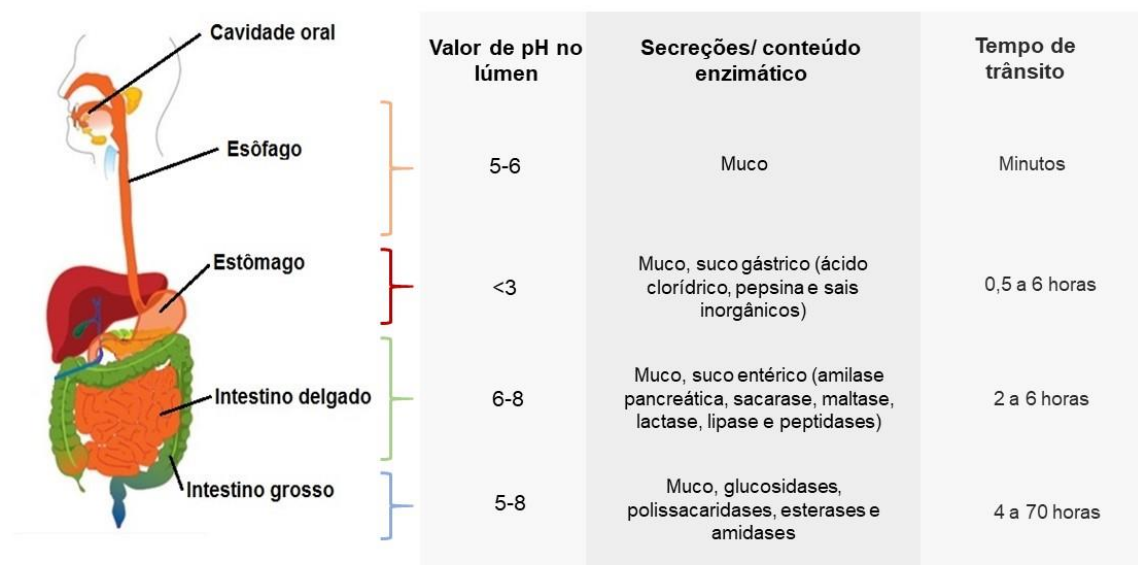


Figura 2. Fisiologia do trato gastrointestinal. (Adaptado de HUA et al., 2015).

O esôfago tem a função de transporte para o estômago, apresentando curto tempo de trânsito que pode variar de alguns segundos a minutos. Apresenta pH levemente ácido (valor entre 5 e 6), não secretando enzimas, portanto, não representa um ambiente potencialmente nocivo ao sistema após a administração oral. Em contrapartida, o próximo segmento, o estômago, apresenta valor de pH extremamente ácido, que pode variar de 1,2 a 3,0 sem e com a ingestão de alimentos, respectivamente. Além do pH ácido, o estômago é um local de elevada atividade enzimática, com tempo de trânsito de até 6 horas, fatores que o tornam um segmento capaz de degradar facilmente o sistema e o fármaco. Passando pelo estômago, o próximo segmento é o intestino delgado com valor de pH próximo da neutralidade, mas ainda com elevada atividade de enzimas secretadas pelo pâncreas e microbiota local (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019; HUA et al., 2015; KOTLA et al., 2019). Essa região tem como funções a digestão e absorção dos nutrientes, apresentando elevada área superficial, com a presença de pregas circulares, vilosidades e microvilosidades. O tempo de trânsito no intestino delgado é de 2 a 6 horas, sendo variável entre os indivíduos e no estado patológico. Após, tem-se o intestino grosso, onde localiza-se o cólon, com 1,5 m de comprimento e valor de pH entre 5 e 8. Muitos polissacarídeos e carboidratos que resistem à digestão no estômago ou intestino delgado são degradados pela ação da microbiota colônica (KOTLA et al., 2019). Em estado patológico, a composição dessa microbiota pode ser afetada, bem como pode ocorrer o aumento da secreção de mucina e proteases no muco, impactando na redução significativa do tempo de trânsito

(SIPOS, 2012). Além disso, partículas com maior diâmetro tem o trânsito facilitado por todo a região superior do TGI e pelo cólon, sendo eliminadas mais rapidamente, fatores que devem ser considerados no desenvolvimento do sistema (HUA; SALOMONE, 2020).

Ao mesmo tempo que as variações anátomo-fisiológicas do TGI representam barreiras a serem transpostas para a vetorização colônica, elas podem ser utilizadas como estímulos para a modulação da liberação do fármaco incorporado ao sistema.

Neste sentido, diversas abordagens podem ser exploradas, dentre elas o delineamento de matrizes com comportamento de solubilidade, intumescimento e/ou erosão pH-responsivos. Esse tipo de sistema deve permanecer relativamente inerte em valores de pH ácido e apresentar reposta frente ao pH neutro ou ligeiramente alcalino do cólon. Além de direcionar a liberação do fármaco para a região entérica, esse tipo de matriz deve proteger o fármaco do ambiente gástrico. Apesar de ser uma estratégia interessante, a ocorrência de variabilidade dos valores de pH no TGI induzidas por doença, dieta, coadministração de fármacos, dentre outros, podem influenciar a responsividade do sistema (DATE; HANES; ENSIGN, 2016; HUA; SALOMONE, 2020).

Outra abordagem promissora é o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos. Explorando a densa e espessa camada de muco que reveste o cólon, os sistemas podem permanecer retidos no sítio de ação por um tempo prolongado, independente do peristaltismo intestinal, proporcionando um contato mais íntimo com a bio-interface, favorecendo a interação e a internalização do fármaco (BODDUPALLI et al., 2010). Almejando a liberação colônica, outra estratégia interessante é explorar a atividade das bactérias e enzimas que compõe a microbiota do cólon. Biopolímeros, como os polissacarídeos, são facilmente degradados e metabolizados na região colônica, podendo ser utilizados na composição dos sistemas de liberação cólon-específica. No entanto, por apresentarem elevada hidrofília podem absorver elevados volumes de suco gástrico ou entérico, permitindo o acesso de bactérias e enzimas, o que poderia resultar na degradação prematura da matriz e liberação precoce do fármaco (DATE; HANES; ENSIGN, 2016; KOTLA et al., 2019; PINTO, 2010; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Frente a essas limitações e vantagens, a associação de diferentes estratégias pode contribuir para o direcionamento efetivo do fármaco para o cólon., tornando a seleção racional dos materiais e tecnologias de produção determinantes para o êxito da vetorização para este sítio de ação.

2.1.1. Biopolímeros na composição de sistemas de liberação cólon-específica

Os biopolímeros são macromoléculas de origem natural, como as proteínas e polissacarídeos, extraídos de plantas, animais e os produzidos por microrganismos. A utilização desses materiais na composição dos sistemas de liberação cólon-específica representa uma alternativa vantajosa considerando sua ampla disponibilidade na natureza, segurança, estabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Além disso, a presença de grupamentos hidrofílicos e ionizáveis permite a realização de modificações físico-químicas, originando derivados com propriedades específicas e favoráveis a aplicação desejada (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016a; DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004). *In vivo*, os biopolímeros não induzem respostas imunogênicas ou toxicidade crônica por mimetizarem as macromoléculas fisiológicas e serem degradados em cadeias de menor massa molecular, sendo metabolizados, eliminados ou absorvidos pelo organismo (GOPINATH et al., 2018).

Os polissacarídeos vêm sendo muito utilizados na pesquisa e desenvolvimento de sistemas de liberação modificada. O uso isolado ou de misturas de polissacarídeos como a GG, P e amido, modificados por reações de reticulação ou retrogradação têm sido alvo de diversas pesquisas do nosso grupo. Estudos acerca de variáveis como tipo/associação/concentração dos polissacarídeos e grau de reticulação, vem sendo realizados, explorando a manipulação de propriedades como solubilidade, degradabilidade e mucoadesividade, buscando-se maior eficiência na vetorização colônica de fármacos (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016; CARBINATTO et al., 2012; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021; MENEGUIN et al., 2018; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; PREZOTTI et al., 2012, 2020; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; RIBEIRO et al., 2016; SOARES et al., 2013).

Micropartículas de GG reticuladas com alumínio foram desenvolvidas e a variação da concentração de polímero e agente reticulante resultou em mudanças significativas no diâmetro e forma das partículas. A liberação do cetoprofeno incorporado à essas micropartículas demonstrou ser pH-dependente, com taxas de liberação em meio ácido entre 42,5% e 44,9% e um efeito *burst* de liberação em tampão fosfato (pH 7,4), alcançando 100% de liberação após 240 minutos (BONI; PREZOTTI; CURY, 2016). Outro estudo demonstrou que a associação da GG com a P, para a obtenção de micropartículas reticuladas com alumínio, resultou no maior controle das taxas de liberação. Comparando-se com as micropartículas compostas apenas por GG, as que continham P reduziram a porcentagem de liberação do cetoprofeno em meio ácido para aproximadamente 25%, sustentando a liberação por até 360 minutos em tampão fosfato

(pH 7,4) (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014). A mesma plataforma foi testada para a incorporação do resveratrol e, resultados semelhantes de controle das taxas de liberação em meio ácido foram observados, com a liberação de 100 % do fármaco em tampão fosfato (pH 6,8) após 48 horas. Adicionalmente, estudos de viabilidade celular com as linhagens Caco-2 e HT29-MTX comprovaram a segurança dos sistemas utilizando o alumínio como reticulante (MENEGUIN et al., 2018; PREZOTTI et al., 2018).

A mistura de GG com amido resistente também foi objeto de estudo em nosso grupo para a obtenção de micropartículas contendo cetoprofeno. Os sistemas obtidos apresentaram elevada mucoadesividade e menores taxas de liberação do fármaco em meio ácido, comparadas com as micropartículas de GG e P (<17 %). Em tampão fosfato, os sistemas apresentaram diferentes níveis de controle das taxas de liberação, de acordo com sua composição, caracterizando-os como potenciais plataformas para vetorização colônica (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020).

Filmes de P e amido resistentes também foram utilizados como revestimento para micropartículas de GG contendo insulina. O sistema foi capaz de proteger a degradação enzimática da insulina em 80%, aumentando sua permeabilidade intestinal *in vitro* e contribuindo para um efetivo efeito hipoglicemiante *in vivo* (MENEGUIN et al., 2018).

2.1.1.1. Goma gelana (GG)

A GG é um polissacarídeo hidrofílico, de cadeia linear e aniônica obtido pelo processo de fermentação aeróbica do microrganismo *Sphingomonas elodea*. É composta pela repetição de unidades de α -L-ramnose; β -1,3-D-glicose e β -1,4-D-ácido glicurônico na razão 1:2:1, com pKa de aproximadamente 3,5. A GG nativa possui ligado a seus resíduos de glicose os substituintes acetil e L-gliceril, que são removidos por hidrólise alcalina gerando a GG desacetilada (Figura 3), comercialmente utilizada no setor alimentício como espessante e formadora de filme (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000; OSMALEK; FROELICH; TASAREK, 2014).

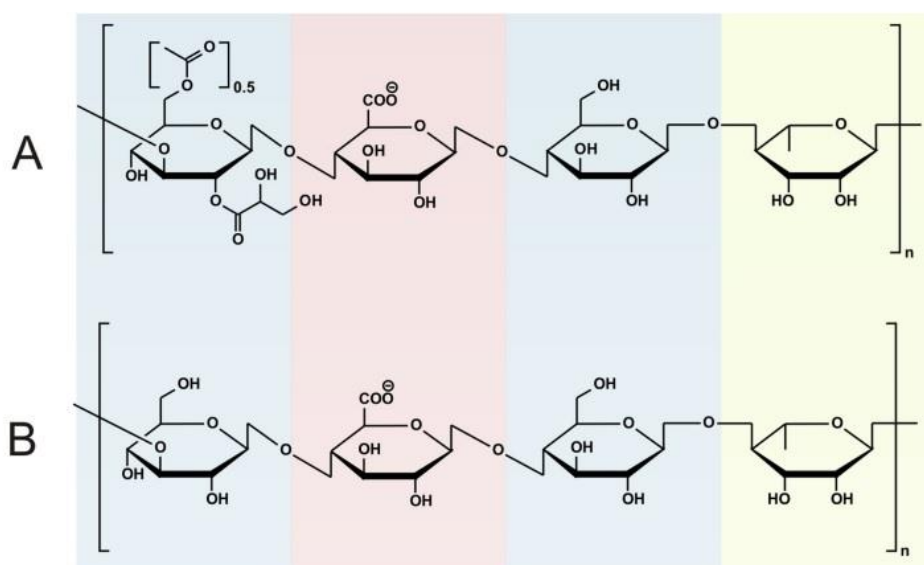


Figura 3. Estrutura molecular da GG nativa (A) e GG desacetilada (B). (Fonte: OSMAŁEK et. al. 2014).

A GG apresenta elevada capacidade de geleificação dependente de temperatura, mesmo em baixas concentrações ($\geq 1,5$ %, m/v). O processo de geleificação da GG de baixo grau de acetilação ou desacetilada, ocorre em temperaturas inferiores à 35°C, com a transição conformacional das cadeias espirais isoladas para dupla hélice. O arranjo dessas duplas hélices via interações supramoleculares, como as de hidrogênio, formam zonas de junção ordenadas. A associação desses segmentos helicoidais duplos resulta na estruturação de uma rede tridimensional, característica do hidrogel de GG. A adição de cátions di ou trivalentes no processo de reticulação, aumenta significativamente o número de zonas de junção entre as cadeias de GG, originando hidrogéis de elevada resistência mecânica e térmica, sendo a GG um componente estrutural importante para a formação das micropartículas (GIAVASIS et al., 2008; OSMAŁEK; FROELICH; TASAREK, 2014).

Embora vários estudos tenham sido realizados empregando a reticulação iônica da GG com Ca^{2+} , recentemente os estudos têm focado na utilização do Al^{3+} , devido a sua capacidade de formar estruturas mais empacotadas e compactas. Dentre os trabalhos utilizando GG, poucos relatam os efeitos da formação de micropartículas por meio da dupla reticulação iônica com Al^{3+} e Ca^{2+} .

Outra importante propriedade da GG que vem sendo explorada no desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos é a mucoadesividade. Polímeros que apresentam grupos hidrofílicos e/ou ionizáveis como as hidroxilas, carboxilas, amino e

sulfato, capazes de formar interações com a mucina presente no muco, normalmente apresentam elevada mucoadesão (KHUTORYANSKIY, 2011).

De Oliveira e colaboradores (2020) conduziram estudos reológicos para investigar a capacidade mucoadesiva da GG em diferentes valores de pH. Os estudos revelaram que fortes interações, governadas principalmente por ligações de hidrogênio, entre a GG e a mucina são formadas em pH 1,2 (DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020).

Contudo, o desempenho mucoadesivo de polímeros como a GG pode diminuir com o processo de reticulação iônica e/ou com sua associação a outros polissacarídeos. A disponibilidade dos grupamentos, bem como a flexibilidade das cadeias poliméricas podem ser desfavorecidas devido à interpenetração física e as interações supramoleculares, na mistura de diferentes polissacarídeos. O mesmo ocorre na reticulação, em que os cátions se ligam aos grupamentos aniônicos do polímero, imobilizando as cadeias no processo de formação da malha polimérica. Esses eventos podem prejudicar os processos de interpenetração das cadeias do polímero com as cadeias de mucina e o estabelecimento de interações entre elas, dificultando a consolidação do processo de mucoadesão (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNU, 2005; KHUTORYANSKIY, 2011).

2.1.1.2. Pectina (P)

As pectinas representam um grupo de polissacarídeos que compõe a parede celular de plantas e algas marinhas, desempenhando a função de manutenção de estruturas, sustentação e proteção contra diversos fatores ambientais (THAKUR et al., 1997). A composição da P é complexa e pode variar de acordo com a fonte de extração. De forma geral, a P consiste em uma estrutura linear de homogalacturonana contendo ácidos D-galacturônicos unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4), que podem estar esterificados com grupamentos metila e acetila (Figura 4).

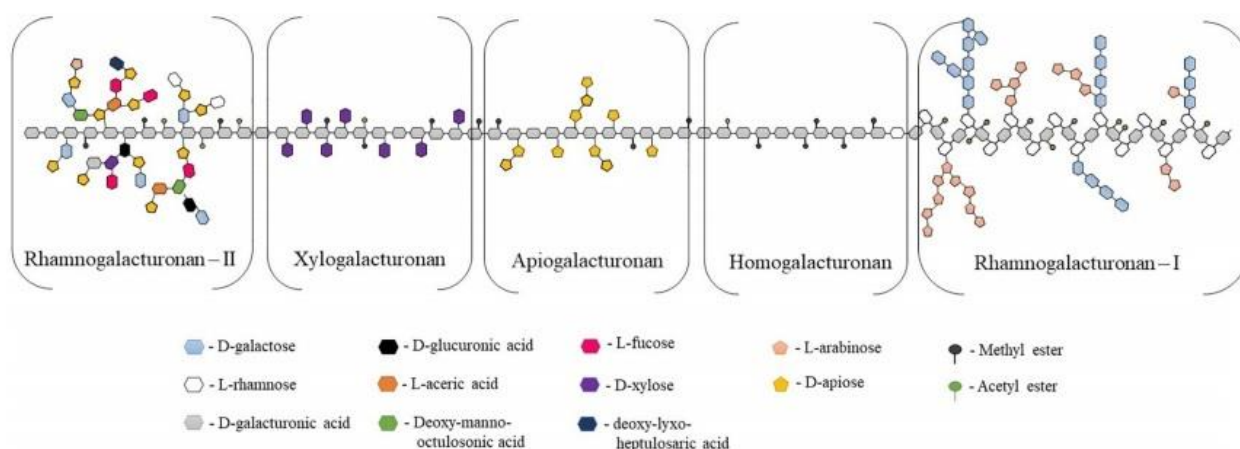


Figura 4. Representação da estrutura da pectina. (Fonte: Khotimchenko, 2020).

O grau de esterificação dos resíduos de ácido galacturônico é uma característica estrutural importante da P, pois está relacionada diretamente as propriedades de geleificação deste polissacarídeo. Além da porção linear, a estrutura da P apresenta regiões altamente ramificadas denominadas de ramnogalacturonana I e II, essas regiões possuem diversas cadeias laterais compostas por diferentes tipos de açúcares (Figura 4) (KHOTIMCHENKO, 2020).

Pectinas com baixo grau de esterificação formam facilmente géis na presença de íons multivalentes. Já P de elevado grau de esterificação tem a geleificação governada pela presença de açúcares, em meio ácido, sendo muito utilizada na indústria de alimentos como espessante de sucos e geleias (YAPO, 2011).

Entre as vantagens do uso da P para o desenvolvimento de sistemas de liberação colôn-específica, destacam-se sua aprovação para consumo humano e a degradação específica por enzimas produzidas pela microbiota colônica. Esse processo de degradação e fermentação colônica da P resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais atuam no equilíbrio do pH da região, auxiliando na manutenção da microbiota e da fisiologia colônica do paciente (KHOTIMCHENKO, 2020).

As pectinas não são digeridas por enzimas gástricas ou do intestino delgado, no entanto, apresentam solubilidade elevada podendo facilmente dispersar nos diferentes fluídos do TGI. Frente a essa limitação da P, tem-se como alternativa o processo de reticulação iônica e/ou a associação a outros polissacarídeos, como a GG, obtendo-se géis mais estruturados e resistentes, com menor hidrofília (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

Por apresentar grupamentos carboxílicos, ionizáveis em valores de pH superiores a seu pK_a de 2,3, o uso da P em sistemas de liberação vem sendo associado à responsividade pH-dependente. Devido à presença desses grupamentos, a capacidade mucoadesiva da P também é uma propriedade que pode agregar vantagens ao sistema. Thirawong e co-autores realizaram um estudo sobre a mucoadesividade de diferentes tipos de P em substratos biológicos (tecido bucal, estomacal e intestinal suíno). Os resultados demonstraram que pectinas de baixo grau de esterificação apresentaram menor capacidade mucoadesiva, comparada com pectinas de elevado grau de esterificação. Outro ponto levantado no estudo foi a influência da massa molecular na mucoadesividade da P. Polissacarídeos maiores e mais ramificados tem facilidade de estabelecer maior número de interações com o muco, via interpenetração das cadeias e formação de ligações de hidrogênio, Van der Waals e interações hidrofóbicas. Em relação ao substrato, todas as pectinas testadas apresentaram maior mucoadesividade no intestino grosso, em relação ao intestino delgado e estômago, destacando a aplicabilidade desse material na composição de sistemas para vetorização e liberação colônica de fármacos (THIRAWONG et al., 2007).

2.1.1.3. Amido resistente (AR)

O amido é um homopolissacarídeo granular de reserva presente em diversas espécies vegetais, formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6). Estruturalmente apresenta dois componentes principais, a amilose (15 a 20 %) que é essencialmente linear e de baixa solubilidade e a amilopectina (80- 85%) de cadeia ramificada e hidrossolúvel (Figura 5) (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006).

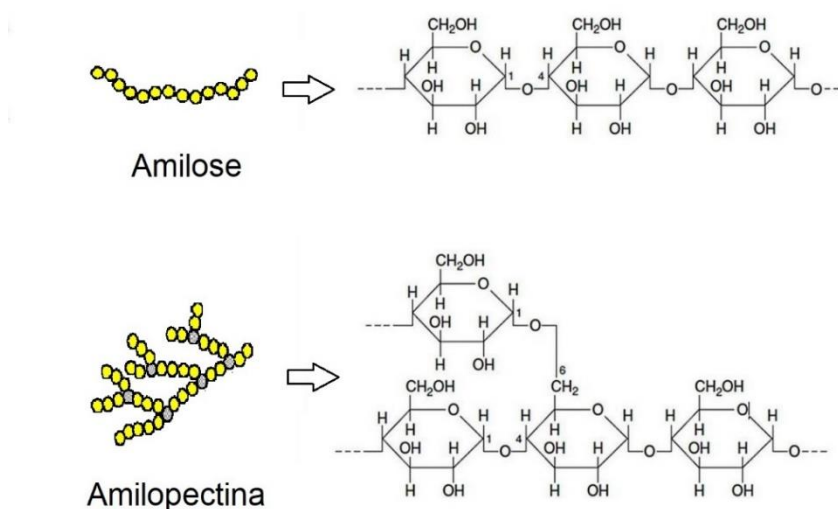


Figura 5. Estrutura molecular da amilose e amilopectina.

Por ser biocompatível, biodegradável e de baixo custo, o amido tem sido extensivamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica como excipiente em formas farmacêuticas sólidas. No entanto, o amido é potencialmente digerível pelas enzimas secretadas no TGI. Na boca, durante o processo de mastigação inicia-se a digestão do amido, facilitada pela presença da amilase salivar. No intestino delgado o processo de digestão é concluído, via hidrólise pela α -amilase pancreática e enzimas intestinais (lactase, maltase e sacarase), para a absorção dos monossacarídeos pelas células. Fatores como a razão amilose:amilopectina do amido, idade do indivíduo e uso de medicamentos que atuam como inibidores enzimáticos podem dificultar o processo de digestão e absorção no intestino delgado, com pequenas frações íntegras do amido alcançando o cólon (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010b).

Considerando os benefícios da utilização do amido nativo como excipiente e suas limitações relacionadas a solubilidade e digestibilidade, a modificação física via processo hidrotérmico pode resultar na formação do amido retrogradado tipo 3 (AR), um material com propriedades físico-químicas e de degradação moduladas à aplicação na composição de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021; MENEGUIN et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016).

O AR tipo 3, que apresenta maior estabilidade térmica e baixa solubilidade aquosa, é formado por meio do processo de retrogradação do amido com alto teor de amilose. Esse processo baseado em ciclos alternados de armazenamento em diferentes temperaturas, permite a reassociação das cadeias poliméricas de amilose e amilopectina, formando uma estrutura parcialmente cristalina, estabilizada principalmente por ligações de hidrogênio (SITU et al., 2015). Devido a estrutura tridimensional compacta que se forma após o processo de retrogradação, o acesso das enzimas para hidrólise é dificultado, tornando esse tipo de amido resistente a digestão no intestino delgado. Apenas ao alcançar o cólon o AR será fermentado pela ação da microbiota, formando ácidos graxos de cadeias curta (HARALAMPU, 2000; LOBO; DE LEMOS SILVA, 2003).

Entre os compostos formados a partir da fermentação do AR no cólon, destacam-se o ácido butírico e butirato. Essas moléculas são utilizadas como substrato energético para as células epiteliais do intestino grosso e, diversos estudos relatam sua ação na inibição do crescimento e proliferação de células tumorais na região, atuando na prevenção da malignidade do CC (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010b; MENEGUIN et al., 2018; SHARMA; YADAV, 2008).

Frente as características do AR e sua atuação na fisiologia das células intestinais, a aplicação desse material na composição de sistemas de liberação cólon-específica voltados ao tratamento do CC desperta particular interesse.

2.2 Terapia oral como alternativa no tratamento do câncer colônico

A maioria dos fármacos clássicos utilizados no tratamento de tumores sólidos da região colônica pertencem a subclasse dos ciclo-específicos; os ciclo-fase específicos, destacando-se o 5-fluoracil e irinotecano (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; TILLY, 2003).

Independente da classe e do mecanismo farmacológico a maioria dos esquemas terapêuticos tem a desvantagem da administração intravenosa, sendo necessário que o paciente permaneça com um acesso venoso central, visitando o hospital frequentemente; de acordo com o regime posológico.

Considerando os impactos da terapia convencional do CC na qualidade de vida dos pacientes, a possibilidade de realizar o tratamento em casa, explorado a via oral, sem o estresse de permanecer com um acesso venoso, associado à redução do risco de infecções é muito benéfico ao paciente fisicamente e psicologicamente. Além disso, potenciais vantagens econômicas devem ser consideradas, relacionadas à redução de gastos com aparatos hospitalares, profissionais para a administração e transporte frequente do paciente (KURTZ et al., 2003).

Somadas às questões que envolvem a qualidade de vida, estão os diversos efeitos colaterais sistêmicos resultantes da falta de especificidade/seletividade dos fármacos convencionalmente utilizados na quimioterapia intravenosa. Por serem agentes citotóxicos inespecíficos, ao serem administrados irão se distribuir pelos tecidos, incluindo os saudáveis, provocando severos efeitos como mielossupressão, obstrução intestinal, estomatite, náusea, vômitos e diarreia (ESTANQUEIRO et al., 2015).

Existem ainda outros obstáculos ao sucesso da terapia convencional do CC que devem ser contornados, como a dificuldade dos antineoplásicos em alcançarem o local de ação na concentração necessária para o efeito terapêutico (ESTANQUEIRO et al., 2015). Durante o desenvolvimento do tumor ocorre a compressão ou obstrução dos vasos sanguíneos pré-existentes na região, gerando hipóxia e necrose celular. Como resposta a esse processo, visando suprir o aporte de oxigênio e nutrientes, novos vasos de elevada ramificação e baixo calibre são formados (angiogênese). No entanto, essa neovascularização resulta na irrigação sanguínea irregular e reduzida em algumas regiões mais internas do tecido e massa tumoral (Figura 6) (JAIN; MARTIN; STYLIANOPOULOS, 2014; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

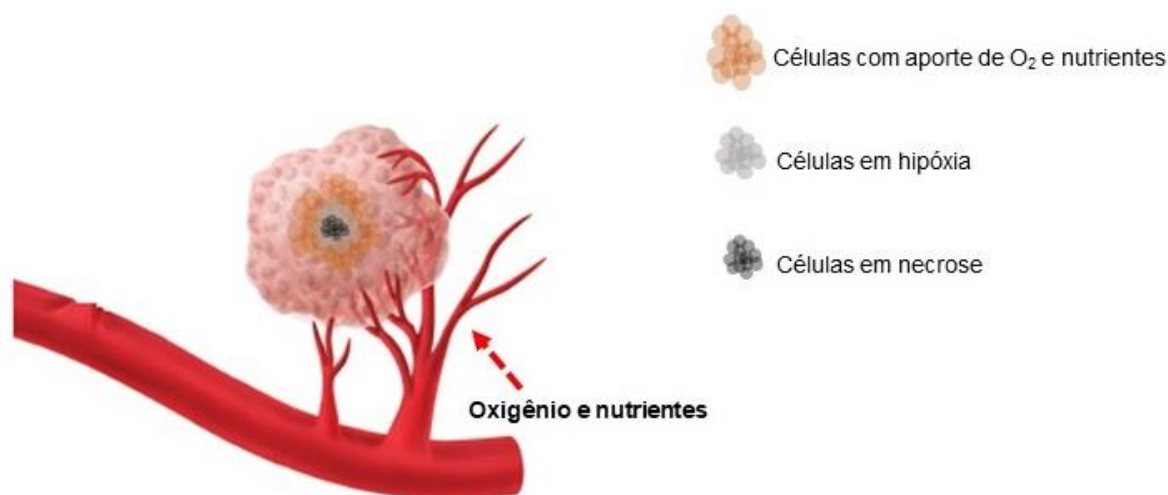


Figura 6. Representação esquemática da vascularização e anatomia tumoral. (Adaptado de: <https://www.mccourier.com/global-cancer-angiogenesis>).

Quando administrado pela via intravenosa, o antineoplásico deve se distribuir pela corrente sanguínea até alcançar a vascularização do tumor, atravessando a parede dos vasos em direção ao interstício celular, difundindo de forma homogênea pelas células, em concentração efetiva. Devido à compressão dos vasos e vascularização irregular, citadas anteriormente, ocorre o menor fluxo para o interior da massa tumoral, reduzindo a taxa de distribuição do fármaco, evento que caracteriza um importante mecanismo de resistência à quimioterapia (GOTTESMAN, 2002; JAIN; MARTIN; STYLIANOPOULOS, 2014). Neste sentido, a utilização da via oral para administração dos fármacos carregados pelos sistemas de liberação colón-específica, pode ser muito vantajosa. Considerando que o tumor é voltado ao lúmen intestinal, seguindo o fluxo natural do TGI e protegido pelo sistema carreador, o fármaco deve alcançar a região, atuando diretamente na massa tumoral exposta, favorecendo a ação local e evitando os problemas associados a alteração na vascularização e a passagem para a circulação sistêmica.

Além de dificultar a distribuição dos antineoplásicos, o processo de angiogênese, é um dos mecanismos mais importantes pra progressão tumoral. No carcinoma colônico, a quantificação da angiogênese e dos peptídeos angiogênicos vêm sendo pesquisados como fatores de risco para a recorrência e malignidade da doença, uma vez que à medida em que há expansão da vascularização, maior é a superfície para o escape de células tumorais na circulação sistêmica, processo que é facilitado pela imaturidade dos novos vasos formados (TARTA et al., 2000).

A associação de quimioterápicos convencionais com anticorpos monoclonais, que atuam no processo de angiogênese, como o Bevacizumabe (Avastin®) e o cetuximab, vêm ganhando

destaque pelos excelentes resultados terapêuticos. Entretanto, aliado à elevada efetividade destes biofármacos está o impacto econômico significativo que eles representam para os sistemas de saúde públicos e privados, restringindo seu uso para a grande maioria da população e apenas para casos de metástase e insucesso de outras opções terapêuticas (HSU; WAKELEE, 2009).

Nesse contexto, destaca-se a urgência na elaboração e associação de novas estratégias, financeiramente acessíveis, que permitam contornar os mecanismos de progressão tumoral e aumentar a especificidade/seletividade terapêutica, que sejam convenientes aos pacientes, por vias não invasivas, como a oral.

2.2.1. Nanotecnologia aplicada ao tratamento do CC

A nanotecnologia farmacêutica aplicada ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação é uma importante estratégia tecnológica para a superação dos desafios associados ao tratamento convencional do CC.

Diversos estudos relatam que a efetiva compartimentalização dos fármacos nos nanocarreadores pode auxiliar na redução do efluxo pela P-gp, contribuindo para a manutenção da concentração intracelular (CHAVANPATIL et al., 2007; SHAH et al., 2020; YIN WIN; FENG, 2005; YUAN et al., 2017; ZHOU et al., 2015). O reduzido tamanho dos nanocarreadores e extensa área de superfície facilitam a difusão através da camada de muco, tecidos e membranas celulares, além de auxiliar no escape do sistema imunológico. O conjunto destas propriedades pode ser denominado como direcionamento passivo (KOTELEVETS et al., 2016).

Dentre os nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas vem despertando particular interesse por serem sistemas versáteis para a incorporação de diversas classes de fármacos e, por poderem ser obtidas explorando-se diversas técnicas; de acordo com o material escolhido, conferindo propriedades variadas ao sistema e características adequadas à via de administração desejada (WASUPALLI; VERMA, 2018).

De acordo com a organização estrutural, as nanopartículas podem ser classificadas como nanocápsulas; que são sistemas reservatório constituídos de um ou mais núcleos internos, revestidos por uma membrana controladora das taxas de liberação ou nanoesferas; que são do tipo matricial, nas quais o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido no interior e/ou superfície da matriz. Existe ainda um terceiro tipo, os mistos, em que se tem um sistema matricial revestido por uma membrana controladora das taxas de liberação (LIU et al., 2008). Diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção das nanopartículas, como emulsificação/microemulsificação seguida da evaporação do solvente, geleificação ionotrópica,

polimerização interfacial, spray-drying e complexação polieletrólítica, cuja aplicação é dependente das propriedades dos componentes da formulação, bem como das características desejáveis ao sistema (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016b; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). A seleção dos materiais e tecnologias utilizadas no desenvolvimento das nanopartículas é de fundamental importância uma vez que é possível modular as características e propriedades do sistema, visando a proteção do fármaco incorporado contra a degradação prematura, evitar/minimizar a interação com elementos biológicos não específicos e modificar o padrão de interação biológica na biointerface (NEL et al., 2009).

Entre os atributos desejáveis para as nanopartículas orais de liberação colônica de fármacos, destaca-se a mucoadesividade. Essa propriedade permite o contato mais íntimo do sistema com a mucosa intestinal; reduzindo a barreira de difusão e prolongando o tempo de residência no sítio de ação, importante em condições patológicas em que é comum se observar tempo de trânsito reduzido e elevada produção de muco. Ambos os fatores contribuem para aumentar a interação sistema-substrato biológico e a internalização dos fármacos (HUA et al., 2015; SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014).

A quitosana (QS) é um biopolímero composto por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, derivado da quitina, extraída principalmente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (Figura 7). A capacidade de estabelecer interações eletrostáticas com os resíduos de ácido siálico da mucina faz da QS um material com importantes propriedades mucoadesivas (RINAUDO, 2006).

A QS como polímero funcional também vem sendo alvo de diversos estudos, devido ao potencial de atuação sinérgica aos quimioterápicos, no tratamento de diversos tipos de cânceres. Essa propriedade pode ser atribuída à característica catiônica da QS, proveniente da protonação de seus grupamentos amina ($pK_a \sim 6,0$) (BONI et al., 2021), que facilita a permeação e rompimento da membrana celular, induzindo a morte. Intracelularmente, os estudos descrevem a atuação da QS na indução da apoptose das células tumorais, via ativação da caspase 8, inibindo a progressão tumoral (ADHIKARI; YADAV, 2018; LUO; WANG, 2014; QIN et al., 2002; WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018).

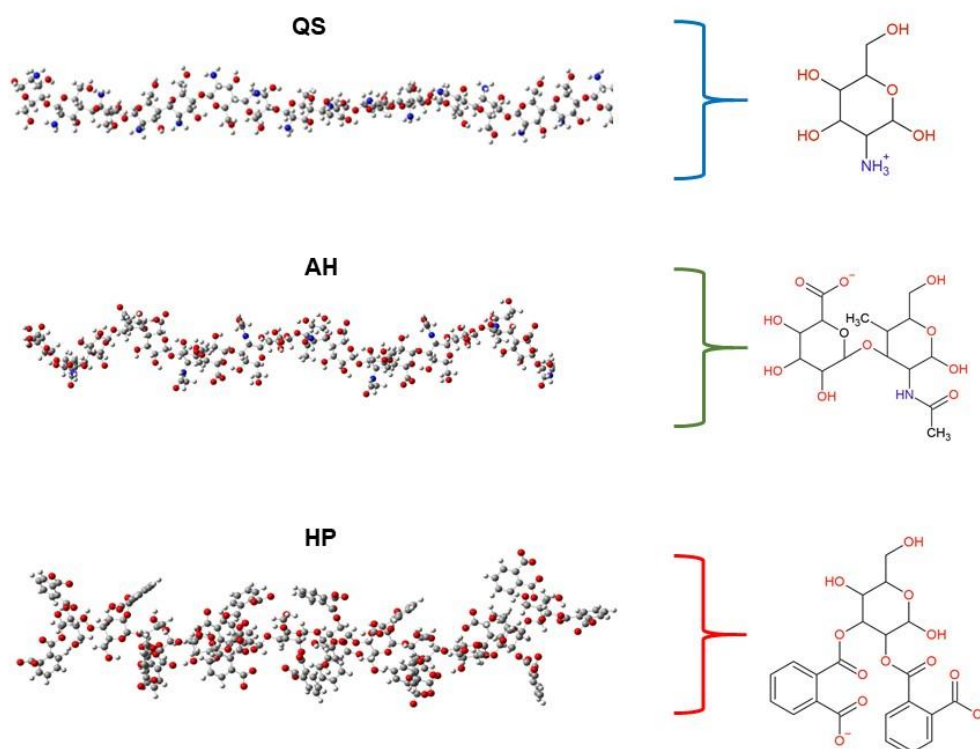


Figura 7. Conformação espacial e unidade monomérica que compõe a quitosana (QS), o ácido hialurônico (AH) e o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP). (Adaptado de Boni et. al., 2021).

Entretanto, apesar das vantagens relacionadas à utilização da QS em sistemas de liberação cólon-específica, uma das principais limitações para seu uso, explorando a via oral, é a elevada solubilidade em meio ácido. Alternativas como a associação e complexação da QS com polímeros aniônicos podem ser uma estratégia para reduzir sua solubilidade, resultando na resistência à liberação e degradação prematura do fármaco na região gástrica.

Apesar da mucoadesividade ser um atributo importante, o sistema além de aderir ao muco da região colônica deve ser capaz de permear essa camada, alcançando o tecido em que o fármaco deverá ser liberado ou ser internalizado. A camada de muco da região colônica atua na proteção do epitélio e na homeostase do organismo, regulando o equilíbrio hídrico e o transporte de íons, atuando na limpeza de detritos celulares e na imunorregulação. Adjacente à mucosa intestinal, forma-se uma camada de muco fortemente aderida com espessura variando de 16 μm a 116 μm e, voltado ao lúmen forma-se uma camada mais frouxa de muco que sofre constante degradação enzimática e erosão pelos fluídos fisiológicos e peristaltismo, podendo apresentar até 714 μm de espessura (ATUMA et al., 2001). Além de ser uma rede tridimensional viscosa que dificulta a difusão das partículas, essa camada mais frouxa de muco sofre renovação constante representando uma barreira que o sistema de liberação deve superar. Dessa forma, a

associação de materiais com diferentes capacidades mucoadesivas e/ou sua modificação por meio de reações físico-químicas, para obtenção de nanopartículas com características de superfície que modulem a interação com o muco, devem ser consideradas.

Após alcançarem o epitélio, buscando um efeito seletivo do quimioterápico, os sistemas devem interagir de forma específica com as células tumorais, evitando efeito sobre as saudáveis. Uma das estratégias para aumentar essa seletividade é denominada de direcionamento ativo, em que realiza-se a funcionalização das nanopartículas com anticorpos, ácidos nucleicos, peptídeos ou mesmo polissacarídeos, de elevada especificidade aos receptores de superfície celular (ALBANESE; TANG; CHAN, 2012). Esses receptores agem na regulação dos processos de sobrevivência celular como diferenciação, crescimento e internalização. Frequentemente sofrem alguma mutação ou são superexpressos nas células tumorais, tornando-se alvos interessantes para o direcionamento dos sistemas.

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero linear da família das glicosaminoglicanas, presente na matriz extracelular, tecidos e cápsulas bacterianas. É hidrofílico, de elevada massa molecular (103 a 107 Da) e composto por unidades de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Figura 7) (BECKER et al., 2009; BONI et al., 2021). Devido a interação específica com os receptores CD44v, superexpressos na superfície das células tumorais do epitélio intestinal, o AH encontra aplicação na funcionalização ativa das nanopartículas (LIAO et al., 2005).

Mansoori e co-autores (2020) avaliaram a atividade *in vitro* de lipossomas contendo 5-fluorouracil revestidos com AH em células de linhagem tumoral da região colônica; com superexpressão do receptor CD44 e em linhagem hepática; que não expressam o receptor. Como resultado observaram indução seletiva da apoptose e redução da proliferação nas células tumorais de linhagem colônica (MANSOORI et al., 2020). Em outro estudo, Almalik e colaboradores (2013) comprovaram que a interação com os receptores CD44 é responsável por aumentar a internalização de partículas de QS reticuladas com tripolifosfato de sódio e revestidas com AH (ALMALIK et al., 2013).

Assim como a QS, o AH apresenta mucoadesividade devido à capacidade dos grupamentos hidroxila de sua estrutura estabelecerem interações com a mucina, formando ligações hidrogênio e/ou Van der Waals (SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014)

Após estabelecer interações com as células tumorais, o fármaco poderá ser liberado na região permeando a membrana celular ou ser internalizado junto com o sistema, em concentração terapêutica efetiva. No caso do tratamento do CC, espera-se a ação local do

antineoplásico, minimizando-se a absorção sistêmica. Estudos recentes do nosso grupo demonstraram o efeito do polímero ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP), um derivado semissintético da celulose (Figura 7), na redução do efluxo da zidovudina e do metotrexato, mediado pela P-gp em células intestinais. A redução da permeabilidade desses fármacos veiculados em sistemas contendo o HP também foi observada, despertando interesse da sua aplicação para a ação local dos fármacos (BONI et al., 2018; PEDREIRO et al., 2016).

As vantagens potenciais da nano compartimentalização de fármacos para o tratamento oral do CC foram evidenciadas. No entanto, por apresentarem elevada área e energia de superfície, os sistemas nanométricos podem interagir de forma dinâmica com uma série de substratos fisiológicos além de poderem apresentar sensibilidade frente às alterações expressivas de pH ao longo do TGI, tornando-se facilmente degradáveis após a administração. Neste contexto, a incorporação das nanopartículas compostas por QS, AH e HP em micropartículas de GG e P ou AR, formando um sistema multifuncional, representa uma plataforma tecnológica inovadora para o tratamento oral do CC.

2.3. Camptotecina

A camptotecina (CPT) é precursora do fármaco semissintético irinotecano, um antineoplásico aprovado para o tratamento do câncer de cólon e reto em associação com o 5-fluoracil (THOMAS; RAHIER; HECHT, 2004). É um alcaloide extraído da *Camptotheca acuminata*, composto com elevado ponto de fusão (264-267°C), massa molecular de 348,11 g.mol⁻¹ e log P <5 .

Estruturalmente, apresenta um anel pentacíclico altamente insaturado e um anel lactâmico, essencial para sua atividade (Figura 8) (GARCIA-CARBONERO; SUPKO, 2002).

Os primeiros estudos pré-clínicos realizados com a CPT evidenciaram uma considerável atividade antitumoral em animais tratados com células leucêmicas L1210 ou P388, além de uma elevada atividade na inibição de tumores sólidos. McLeod e colaboradores (1994) observaram a efetiva ação da CPT em nos tumores colônicos e cervicais, e relacionaram essa ação à elevada expressão e ao aumento da atividade da TOP-1 nesses tipos de tumores. Ou seja, a CPT atua inibindo a enzima TOP-1, importante para a duplicação do DNA, sendo sua efetividade diretamente relacionada à superexpressão e elevada atividade da TOP-1 nas células tumorais destes tipos de câncer (MCLEOD et al., 2007).

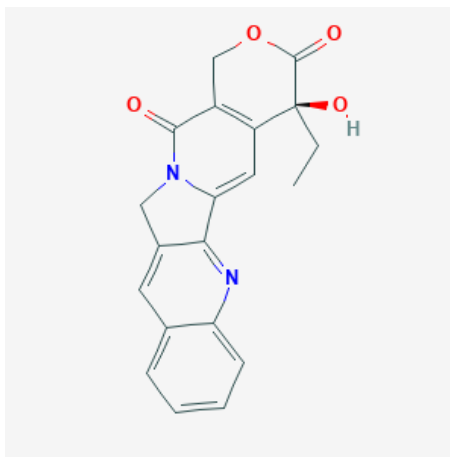


Figura 8. Estrutura molecular da camptotecina (CPT). (Fonte: PubChem, 2020).

Posteriormente, estudos *in vitro* demonstraram o efeito da CPT na inibição do crescimento das células endoteliais humanas. Estas observações indicaram que além da atividade citotóxica, a CPT apresenta uma atividade antitumoral indireta, por meio da inibição da angiogênese (CLEMENTS et al., 1999; MCLEOD et al., 2007).

Apesar da elevada eficácia, a baixa solubilidade da CPT e elevada toxicidade, que inclui mielossupressão e inflamações gástricas, limitaram sua aplicação na terapia convencional pela via intravenosa, sendo essa a razão da utilização do seu derivado irinotecano (ROWINSKY et al., 1993).

Mesmo com a alteração da solubilidade, tanto os derivados quanto a CPT apresentam problemas de estabilidade química. Em pH ácido, predomina a forma lactônica da CPT, de elevada atividade, no entanto, em valores de pH alcalino ($>7,0$) inicia-se o processo reversível de hidrólise do anel lactâmico. A forma carboxilada da CPT apresenta maior solubilidade, porém atividade 10 vezes menor do que a CPT com o anel lactâmico intacto, provavelmente devido a menor permeabilidade celular dessa forma e reduzida afinidade à TOP-1 (GARCIA-CARBONERO; SUPKO, 2002; GILBERT; CHALMERS; EL-KHAMISY, 2012).

Neste trabalho, a CPT foi selecionada para a incorporação na plataforma proposta, considerando sua potencialidade em atuar em diferentes vias inibindo a progressão tumoral, associada às limitações anteriormente citadas.

3. OBJETIVOS

Desenvolver uma plataforma multifuncional para a liberação cólon-específica da camptotecina, explorando a via oral de administração, com potencial para o tratamento local do câncer colônico. Para alcançar esse objetivo, nanocápsulas funcionalizadas com QS e HP e/ou

AH, contendo a CPT, foram desenvolvidas buscando os atributos críticos de mucoadesividade, redução da permeação intestinal e atividade antitumoral indireta (antiangiogênese). As nanocápsulas foram microencapsuladas em matrizes reticuladas de GG e P ou AR, para a proteção contra a degradação prematura nas porções superiores do TGI e vetorização do fármaco para o cólon.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Principais materiais e equipamentos

- Goma gelana KELCOGEL® CG-LA (CP Kelco);
 - Pectina LM-5206 CS (CP Kelco);
 - Alta amilose (Hylon VII - National Starch & Chemical);
 - Quitosana de baixa massa molecular (grau de desacetilação de 90%, Sigma Aldrich®);
 - Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (Shin-Etsu®);
 - Hialuronato de sódio de elevada massa molecular (ViaFarma);
 - Lecitina de soja (Florien);
 - Labrafac (Gattefossé);
 - Camptotecina (Cayman Chemical);
 - Mucina tipo II (Sigma-Aldrich®);
 - Pepsina de mucosa gástrica (Sigma-Aldrich®);
 - Pancreatina de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich®);
 - Bile bovina (Sigma-Aldrich®);
 - Ácido clorídrico- teor 37% (Qhemis), ácido acético P.A (Qhemis), fosfato de potássio monobásico (Vetec), fosfato de sódio tribásico (Henrifarma) e hidróxido de sódio (Grupo Química®).
-
- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a);
 - Amicon® Ultra-4 (100 kDa)
 - Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
 - Banho ultrassônico – Ultrasonic Cleaner (Unique);
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent®);
 - Coluna C18-E (250 mm x 4.6mm 5µm, Phenomenex);
 - Liofilizador Edwards Vácuo (Edwards)
 - pHmetro (Gehaka®, Brasil);
 - Q700 Sonicator (Qsonica);
 - Zetasizer Nano NS Malvern Instruments (Malvern Panalytical);
 - NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, UK);
 - Microette Plus HANSON 0700–1251.
 - Microscópio eletrônico de transmissão (Philips, modelo CM200);
 - Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7500F.

4.2. Métodos

O fluxograma na Figura 9 apresenta a sequência operacional de execução do trabalho.

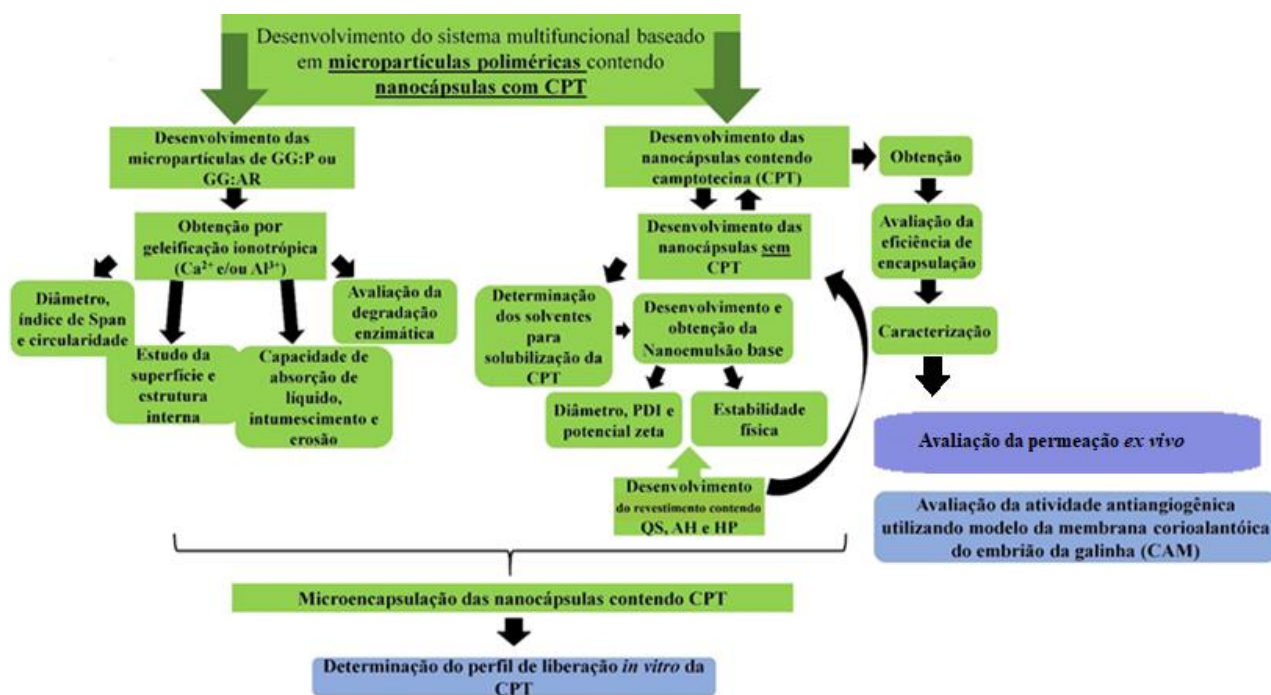


Figura 9. Fluxograma de execução.

4.2.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da CPT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Na validação do método analítico para quantificação da CPT por CLAE e detecção na região do ultravioleta, os seguintes parâmetros foram avaliados: conformidade do sistema, especificidade/seletividade, linearidade, precisão intracorrida e intercorrida, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez, como preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL ANVISA, 2017).

Para garantir a quantificação da CPT nas formulações desenvolvidas, bem como nos ensaios posteriores, validou-se a metodologia analítica segundo adaptação de Kuan-Ju Chen et al. (2012), em equipamento HPLC AGILENT modelo 1220 Infinity LC, com detector UV-Vis.

Os parâmetros empregados na metodologia estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na metodologia.

Parâmetros	
Fase estacionária	Coluna HPLC 250X4,6 mm; 5 µm ZORBAX C18
Temperatura	30°C
Fase móvel	Acetonitrila:Água acidificada pH 5,0 (ácido acético 0,1N) (45:55)
Fluxo	0,7 mL/min
Comprimento de onda de detecção (λ)	370 nm
Volume de injeção	10 µL
Tempo de retenção	$\pm$ 6,15 min

4.2.1.1. Conformidade do sistema

Para assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados são aptos a fornecer resultados confiáveis e aceitáveis, realizou-se a análise de 6 injeções da solução de CPT (25 µg.mL⁻¹). Verificou-se o espectro de absorção do fármaco, bem como, o comprimento de onda de máxima absorção. A partir dos picos cromatográficos de cada injeção, avaliou-se o desvio padrão relativo percentual (DPR%) das áreas, tempo de retenção (tR), números de pratos teóricos (N), fator de cauda (FC) e assimetria do pico, fornecidos pelo software do equipamento utilizado.

4.2.1.2. Especificidade/seletividade

A interferência da matriz polimérica e fase móvel no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco foi avaliada. Todas as análises foram realizadas em triplicata com a fase móvel, solução do fármaco e dos polímeros, na concentração de 25 µg.mL⁻¹. As amostras foram analisadas e os cromatogramas e concentrações comparados.

4.2.1.3. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas da CPT. Preparou-se 7 diluições com concentrações variando de 1 a 80 µg.mL⁻¹. A média dos valores das áreas encontradas foi calculada e a equação da reta determinada por meio do estudo de regressão linear, aplicando o método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

4.2.1.4. Precisão

A precisão intracorrida ou repetibilidade, foi realizada a partir da injeção de três diluições da solução estoque de CPT ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), nas concentrações de 5, 10 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ que representam, respectivamente, as concentrações baixa, média e alta. As injeções foram realizadas no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas.

Para a precisão intercorrida, realizou-se a análise das diluições da solução estoque manipuladas por um segundo analista em dias diferentes, sob as mesmas condições experimentais. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores de DPR% entre as avaliações calculados.

4.2.1.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir de diluições da solução estoque de CPT, nas concentrações baixa, média e alta de 5, 10 e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Realizou-se cinco injeções de cada concentração e a exatidão foi calculada por meio da Equação 1:

$$\%E = \left(\frac{C}{C_t} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que C representa a concentração média determinada experimentalmente e C_t a concentração teórica.

4.2.1.6. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para a determinação do LD e LQ, utilizou-se soluções da CPT nas concentrações crescentes de 0,45; 0,60 e $0,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As áreas foram obtidas em triplicata e curvas analíticas construídas. O LD e LQ calculados utilizando as Equações 2 e 3.

$$LD = \left(\frac{3,3 \times Dpa}{IC} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = \left(\frac{10 \times Dpa}{IC} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

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

4.2.1.7. Robustez

Para avaliar a robustez do método, os parâmetros volume de injeção ($10 \mu\text{L}$ para $10,5 \mu\text{L}$), temperatura de análise (30°C para 35°C) e comprimento de onda (370 para 371 nm) foram variados individualmente na injeção de CPT na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O DPR% dos

resultados obtidos foram calculados e avaliados, comparando-os com os resultados das condições normais de análise.

4.2.2. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)

4.2.2.1. Retrogradação do amido

A obtenção do AR tipo 3 para compor a matriz das micropartículas foi realizada através da retrogradação do amido por tratamento hidrotérmico. De acordo com o procedimento proposto por Meneguín et. al. (2014), preparou-se a dispersão aquosa de alta amilose (5%, m/v), sob agitação magnética, a 80°C e, a dispersão foi autoclavada (121°C) por 15 minutos para a pré-gelatinização do amido. A dispersão foi submetida a ciclos térmicos alternados de temperatura (4°C e 30°C) por 16 dias, dois dias em cada temperatura. As dispersões de amido em água, amido gelatinizado e retrogradado foram avaliadas por microscopia óptica e de luz polarizada, no aumento de 400 vezes, em microscópio Leica MZ APO®.

4.2.2.2. Obtenção das MPs pela técnica de geleificação ionotrópica

As micropartículas compostas por GG:P ou GG:AR foram obtidas de acordo com Boni e colaboradores (2016), Prezotti e colaboradores (2014) e De Oliveria (2020), a partir da reticulação iônica simples utilizando Al^{3+} ou Ca^{2+} e dupla reticulação com Ca^{2+} e Al^{3+} .

- **Preparo das dispersões poliméricas**

Para a obtenção da dispersão de GG:P, realizou-se a mistura dos polímeros em almofariz, na proporção 1:1 (m/m). Essa mistura foi dispersa em água purificada na concentração de 2% (m/v), sob agitação magnética e aquecimento (50°C). A dispersão de GG:AR foi obtida a partir da adição da dispersão de amido retrogradado (AR), obtida de acordo com o item 4.2.2.1, na dispersão aquosa de GG (2%, m/v), na proporção 1:2,5 (m/m), sob agitação magnética à 50°C, até completa homogeneização.

- **Processo de reticulação iônica**

Para a reticulação simples, com auxílio de seringa e agulha (22G-0,7X0,3 mm) gotejou-se as dispersões poliméricas sobre a solução de Ca^{2+} ou Al^{3+} (3%, m/v), previamente resfriada em banho de gelo (4°C). As MPs formadas foram mantidas sob agitação por 30 minutos, a fim de completar a reação de reticulação. Ao final do processo, as partículas foram separadas por filtração e lavadas com água purificada. Para as MPs obtidas por dupla reticulação, realizou-se o gotejamento das dispersões poliméricas na solução de Ca^{2+} (3%, m/v; 4°C) e após 15 minutos as MPs formadas foram separadas e imersas na solução de Al^{3+} (3%, m/v; 4°C), mantendo-se a

agitação por 30 minutos adicionais. Após, o procedimento de filtração e lavagem foi realizado e as MPs foram secas em temperatura ambiente até peso constante.

4.2.3. Caracterização das MPs

4.2.3.1. Avaliação do diâmetro, valor de span e circularidade

O tamanho e forma das MPs foram avaliados em estereoscópio Leica MZ APO®. As amostras foram dispostas em vidro de relógio e as imagens captadas com o auxílio do programa *Motic Images Advance 2.0*, no aumento de 10 vezes. A circularidade e o diâmetro do círculo equivalente de 100 partículas de cada formulação foram avaliados a partir da digitalização das imagens no computador, utilizando o programa analisador de imagem ImageJ.

Para uma análise quantitativa da distribuição granulométrica, determinou-se valor de span, a partir da Equação 4.

$$SPAN = \frac{(D_{90}-D_{10})}{D_{50}} \quad (\text{Eq.4})$$

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

4.2.3.2. Estudo da superfície e estrutura interna

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

4.2.3.3. Avaliação da capacidade de absorção de líquidos e erosão

A capacidade das partículas em absorver líquido foi determinada utilizando-se dispositivo de Enslin adaptado. Para o ensaio, uma massa pré-determinada de MPs foi disposta sobre a placa de vidro sinterizada do funil de Enslin e conectada a uma pipeta de 1 mL por um tubo de látex (Figura 10). O volume de líquido absorvido pela amostra foi mensurado na pipeta.



Figura 10. Dispositivo de Enslin adaptado.

O ensaio foi realizado em meios com diferentes valores de pH (1,2 e 6,8), os quais foram considerados biorrelevantes para o TGI, simulando o pH da região gástrica e intestinal, respectivamente. Em HCl 0,1N (pH 1,2) o teste foi conduzido por 120 minutos e, em tampão fosfato pH 6,8, por 240 minutos. A capacidade de absorção por massa de MPs foi calculada, de acordo com a Equação 5.

$$Cp = \frac{(Vol\ abs\ (mL))}{m\ MPs\ (g)} \quad (Eq. 5)$$

Em que Cp = capacidade de absorção e MP = massa de MPs inicial.

A erosão das MPs foi avaliada por gravimetria. Uma massa conhecida de partículas foi disposta sobre a malha de um suporte acrílico (Figura 11).

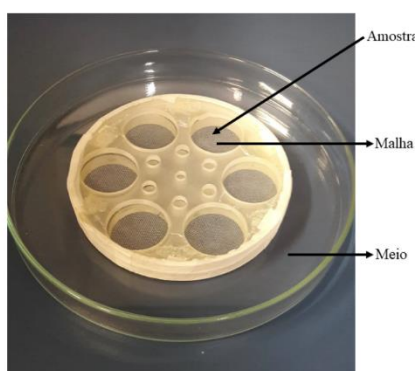


Figura 11. Dispositivo acrílico para o ensaio de erosão.

O conjunto foi imerso em HCl 0,1N (pH 1,2) ou tampão fosfato (pH 6,8), durante 120 minutos e, em tempos pré-determinados, as MPs foram removidas e secas até peso constante.

Após a secagem, as partículas foram novamente pesadas e calculou-se a porcentagem de erosão a partir da Equação 6.

$$\%E = \frac{(Mi - Mfs)}{Mfs} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que %E= porcentagem de erosão, Mi = massa de MPs inicial e Mfs = massa de MPs após a secagem.

Para a avaliação da estrutura da matriz das partículas após os testes de absorção de líquido e erosão, as amostras foram congeladas (-20 °C), liofilizadas por 24 horas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

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

O teste foi realizado em dissolutor Hanson Research (ST8 Plus), equipado com o aparato I (cesto), sob agitação de 60 rpm, em 37°C ±0,2, utilizando meios que simulam as diferentes condições de pH e conteúdo enzimático encontradas ao longo do TGI. A digestão enzimática foi avaliada por gravimetria e análise de imagem. Para isso, uma massa precisamente pesada de partículas foi incubada por 2 horas em solução de HCl (0,1N) + NaCl (0,9%) de pH final 1,2, contendo a enzima pepsina (0,3mg.mL⁻¹) ou por 4 horas em tampão fosfato (pH 6,8) contendo a enzima pancreatina (3,2 mg.mL⁻¹). Para a análise gravimétrica, após o período de incubação, as amostras foram cuidadosamente retiradas dos cestos e secas em temperatura ambiente até peso constante.

Para as análises de imagem, após o período de incubação as partículas foram imediatamente congeladas (-20°C), liofilizadas por 24 horas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

4.2.5. Estudo da mucoadesividade das MPs

A mucoadesão *ex vivo*, utilizando mucosa intestinal suína, foi avaliada no equipamento Texturômetro TA.XT plus® 189 (Stable Micro 190 Systems), no modo de "compressão". O tecido foi mantido em temperatura ambiente, incubado em solução salina (NaCl 0,9%, m/v) para garantir a integridade da camada de muco. Cortes da mucosa foram colocados no suporte de acrílico do equipamento e as MPs ou polímeros isolados foram cuidadosamente fixados na sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) utilizando fita dupla-face (3M Scotch®), permitindo a formação de uma monocamada de material. A sonda analítica contendo a amostra foi movida perpendicularmente (5 mm.s⁻¹) em direção ao tecido, até o contato com a mucosa suína, mantendo o contato por 120 segundos. A força máxima de destacamento (F_{Max} , N) foi

calculada a partir dos gráficos de força *versus* tempo, fornecidos pelo Software Texture Exponent Lite. O teste foi realizado em triplicata ($n = 3$) e os resultados expressos em média e desvio padrão.

4.2.6. Desenvolvimento das nanocápsulas (NCs)

Considerando a baixa solubilidade aquosa da CPT, a elevada hidrofília dos polímeros e suas respectivas densidades de carga superficial opostas (QS catiônica, AH e HP aniônicos), a obtenção das NCs foi baseada em um processo envolvendo múltiplas técnicas: emulsificação/evaporação do solvente e complexação polieletrólítica (LI et al., 2016; PREGO et al., 2006; PREGO; TORRES; ALONSO, 2006; TRAN et al., 2015). Para isso, delineou-se a obtenção de uma nanoemulsão O/A contendo ou não CPT no núcleo lipofílico; composto por Labrafac™ e lecitina de soja. Para o desenvolvimento dessa nanoemulsão, a primeira etapa foi a seleção do solvente ou das misturas de solventes orgânicos de baixa miscibilidade em água, para a solubilização da CPT.

4.2.6.1. Seleção dos solventes para solubilização da CPT

A solubilidade da CPT em uma série de solventes de diferentes polaridades (água, metanol, etanol, acetona e diclorometano) foi avaliada. Uma massa de 2,0 mg de CPT foi adicionada em 1 mL dos diferentes solventes ou misturas dos solventes. Após agitação, o sistema foi mantido em repouso e o fármaco foi considerado solúvel quando uma solução límpida foi visualmente observada.

4.2.6.2. Obtenção da nanoemulsão precursora das NCs

Esta etapa de desenvolvimento das NCs envolveu a formação de uma emulsão com gotículas nanométricas e fisicamente estável, precursora das NCs, a partir dos componentes selecionados. Considerando a maior estabilidade da CPT em $\text{pH} \leq 5$, a fase aquosa foi composta por água acidificada ($\text{pH} 5,0$), contendo polissorbato 80 como tensoativo. Diferentes concentrações de tensoativo foram avaliadas (1,5% a 4,5%), a fim de determinar a concentração adequada para a estabilidade física do sistema. A fase interna da nanoemulsão foi composta de solvente orgânico (diclorometano:etanol), lecitina de soja e Labrafac™, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Composição das nanoemulsões.

Fase orgânica (FO)	
Diclorometano: Etanol (69,2%:30,8%)	1 mL
Labrafac™	0,150 mL
Lecitina de soja	0,0136 g
*CPT	2 mg
Fase aquosa (FA)	
Água pH 5,0 (ácido acético)	5,635 g
Polissorbato 80	1,5; 2,5; 3,5 ou 4,5 %

*apenas para os sistemas contendo fármaco.

A mistura entre a lecitina de soja e o solvente orgânico foi realizada em agitador Vortex, por 5 minutos e, em seguida adicionou-se o Labrafac™, homogeneizando manualmente por aproximadamente 20 segundos. Para o preparo das nanoemulsões contendo CPT, 2 mg do fármaco foi adicionado à mistura de solventes orgânicos e, em seguida, adicionou-se a lecitina de soja e o Labrafac™, nas mesmas condições descritas anteriormente.

No processo de obtenção, a fase interna foi adicionada à fase externa aquosa, gota a gota, em banho de gelo, sob cavitação. Essa etapa foi realizada em sonificador equipado com microtip (Qsonica- 4418) em amplitude de 20 %, por 1 minuto. Após a formação, as nanoemulsões foram mantidos sob aquecimento (40°C) e agitação magnética (400 rpm), em capela, por 1 hora, para evaporação do solvente residual. Todas as formulações foram obtidas em triplicata.

4.2.6.2.1. Avaliação do diâmetro médio, PDI e potencial zeta das nanoemulsões

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) das nanoemulsões obtidas no item 4.2.6.2, foram determinados por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico no equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), a 25°C, em um ângulo de detecção de 173°. As medidas foram realizadas em triplicata com 10 determinações do diâmetro para cada uma das amostras. Para a avaliação do potencial zeta utilizou-se o mesmo equipamento, a partir da técnica de mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas 24 horas após a obtenção das amostras, as quais foram diluídas 10 vezes em água antes das leituras.

4.2.6.2.2. Análise da estabilidade física das nanoemulsões

Para o estudo da estabilidade, após 30 dias de armazenamento em geladeira (4°C) o diâmetro, PDI e potencial zeta das nanoemulsões foram avaliados. Para o estudo da estabilidade

das formulações sob condição de estresse, as amostras foram submetidas a dois ciclos simultâneos de centrifugação (3500 rpm), por 30 e 15 minutos, respectivamente (SHAFIQ et al., 2007).

4.2.6.3. Obtenção das NCs revestidas com quitosana (QS)

A obtenção das NCs contendo QS foi realizada explorando-se dois métodos:

- Método “I”

A água acidificada descrita na Tabela 2 foi substituída por dispersões de QS nas concentrações 0,5; 1,0 ou 1,5 mg.mL⁻¹ (pH 5,0), resultando nas razões (m:m) de lecitina:QS de 1,5:1, 2:1 e 5:1, respectivamente. O processo de obtenção seguiu as mesmas condições descritas no item 4.2.6.2.

- Método “II”

As nanoemulsões foram obtidas conforme descrito no item 4.2.6.2 e em seguida adicionadas, sob agitação magnética (500 rpm), às dispersões aquosas de QS (pH 5,0) em diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹), resultando em razões (m:m) de lecitina:QS de 0,5 a 13:1. Os sistemas foram mantidos sob agitação por 2 horas.

4.2.6.4. Revestimento com ácido hialurônico (AH) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP)

Para esta etapa de revestimento das NCs, adicionou-se o AH ou a mistura AH+HP às formulações previamente obtidas no item 4.2.6.3, empregando o método II. Para isto, diferentes volumes da dispersão aquosa de AH (0,4 mg.mL⁻¹, pH 5,0) ou da mistura das dispersões de HP (em NaOH 0,1M, 0,3 mg.mL⁻¹, pH 5,0)+AH (1:1, m/m) foram adicionadas às NCs previamente revestidas com QS, resultando nas razões (m/m) finais de poliânion(s):poli-cation de 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 5:1. A adição dos polímeros aniônicos foi realizada sob agitação magnética (600 rpm) por 40 minutos.

4.2.7. Caracterização das NCs

4.2.7.1. Avaliação do diâmetro, PDI e potencial zeta

O potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e PDI das NCs revestidas com QS e AH/HP foram determinados utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) e as técnicas de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas 24 horas após os processos de obtenção, com diluição dos sistemas 10 ou 20 vezes em água.

4.2.7.2. Análise de forma

A forma das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F. As amostras obtidas foram diluídas 50 vezes, dispostas sobre substrato metálico e mantidas em dessecador até a completa secagem. Para a obtenção das imagens, os substratos contendo as amostras foram revestidos com carbono.

4.2.8. Nanocápsulas contendo CPT

As NCs contendo CPT foram obtidas conforme o item 4.2.6, com o revestimento de QS e AH ou QS e AH+HP e foram caracterizadas a partir das análises descritas a seguir.

4.2.8.1. Avaliação do diâmetro, potencial zeta e valor de span das NCs contendo CPT

Após a obtenção das NCs com revestimento multicamada, contendo CPT, realizou-se a análise de potencial zeta, utilizando equipamento Zetasizer nano ZS, por meio da técnica de mobilidade eletroforética. As amostras foram diluídas 10 vezes em água. O diâmetro, o valor de span e a concentração das NCs foram avaliados pela técnica de rastreamento (Nanoparticle tracking analysis- NTA), utilizando o equipamento NanoSight NS300, equipado com um compartimento de amostras e laser de 532 nm (Malvern Panalytical). Para essa análise, as amostras foram diluídas 100 vezes em água e analisadas a partir de cinco vídeos de captura, em temperatura ambiente.

4.2.8.2. Eficiência de encapsulação da CPT

Uma alíquota das NCs contendo CPT foi centrifugada a 3600 rpm, em tubo Amicon® (poro de 100 kDa), por 15 minutos. A concentração de fármaco livre no filtrado foi analisada por meio do método cromatográfico previamente validado. A eficiência de encapsulação do fármaco foi determinada através da Equação 7.

$$EE\% = \frac{(C_t - C_e)}{C_t} \times 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Em que: C_t = concentração teórica de CPT no sistema e C_e = concentração experimental de CPT livre.

4.2.8.3. Avaliação da forma das NCs contendo CPT

As NCs foram previamente diluídas em água acidificada (pH 5,5) e uma gota da amostra foi aplicada na grade de cobre e deixada em repouso até a secagem. Posteriormente, uma gota de solução aquosa de acetato de uranila a 1% (m/v) foi adicionada para contraste negativo. Após 2 minutos, o excesso de líquido foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As

análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão com aceleração de 100 kV e as imagens foram obtidas em diferentes aumentos.

4.2.8.4. Permeação *ex vivo* em mucosa suína

O estudo de permeação *in vitro* da CPT livre e incorporadas nas NCs, foi realizado em equipamento Microette Plus HANSON 0700–1251. O modelo de membrana utilizado foi a mucosa intestinal suína, previamente lavada com solução salina (NaCl 0,9%, m/v) e armazenada em freezer (-4 °C). Para os experimentos, as secções de mucosa foram descongeladas em tampão fosfato salino (pH 7,2), em temperatura ambiente e colocadas nas células de difusão com a face contendo vilosidades e a camada de muco voltada para o compartimento doador. Um volume de 1,5 ml das formulações (80 µg de CPT) foi transferido para o copo medidor sobre a mucosa intestinal suína já disposta na célula de difusão de Franz, com área de exposição de 1,77 cm². Os experimentos foram realizados a 37 °C com agitação da solução receptora em 300 rpm, composta por tampão fosfato (PBS, pH = 6,8) e laurilsulfato de sódio (0,2%, m/v). Alíquotas de 1,2 mL foram coletadas do compartimento receptor em intervalos pré-determinados durante 12 horas e o fármaco foi quantificado por CLAE, nas condições descritas anteriormente, com adaptação para detecção por fluorescência (comprimentos de onda de excitação em 360 nm e emissão em 440 nm). Os resultados foram expressos em porcentagem de CPT permeada e permeabilidade aparente do fármaco (*P_{app}*), que foi calculada usando a Equação 8.

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{A \times C_0 \times \Delta t} \quad \text{Eq. 8}$$

Em que ΔQ é a quantidade de CPT quantificada no compartimento receptor (µg), A é a área de superfície da inserção (cm²), C_0 é a concentração inicial de CPT no compartimento doador (µg / mL) e Δt é a duração do experimento (segundos).

Para a avaliação da CPT retida na mucosa, o tecido utilizado no ensaio, foi cortado em pequenos fragmentos e processado, utilizando ultra-turax por 15 minutos, com um volume de fase móvel. Após homogeneização e filtração a CPT foi quantificada por CLAE, utilizando o método previamente desenvolvido e validado.

4.2.8.5. Estudo da interação entre as NCs e a mucina

A capacidade de interação do sistema com a mucina em valores de pH correspondentes ao meio gástrico (pH 1,2) e entérico (pH 6,8) foi avaliada através da medida dos valores de

potencial zeta em equipamento Zetasizer Nano-ZS, em triplicata. Os resultados foram comparados com os valores das amostras sem adição de mucina. Para o teste, soluções aquosas de mucina em diferentes concentrações (100, 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas e os valores de pH ajustados para 1,2 e 6,8, utilizando HCl (0,1 N) ou NaOH (0,2 N). Adicionou-se 300 μL da dispersão de NCs em 900 μL das dispersões de mucina, as misturas foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora à 37°C, em banho termostático, antes da análise no Zetasizer Nano-ZS.

4.2.8.6. Avaliação da atividade antiangiogênica da CPT utilizando membrana corioalantóica de galinha (CAM)

A atividade antiangiogênica da CPT livre e incorporada nas MCs foi avaliada de acordo com método descrito por Ferreira et. al., 2017. Ovos de galinha fertilizados (n = 120, Granja Mario Savinato, Porto Ferreira-SP) foram limpos com solução de etanol 70% e incubados horizontalmente a 37 °C com 70% de umidade por um período de três dias. No 3° dia de desenvolvimento, uma janela com diâmetro de aproximadamente 4 cm foi aberta no topo das cascas dos ovos, removendo minuciosamente os fragmentos de casca, para o acesso à CAM. As janelas foram cobertas com fita transparente para evitar a desidratação e os ovos foram novamente incubados nas condições descritas. Os vasos sanguíneos imaturos formados nos primeiros quatro dias de desenvolvimento, crescem muito rápido e uma rápida proliferação capilar ocorre até o 11° de desenvolvimento (VICTORELLI et al., 2020). Dessa forma, para melhor visualização da atividade antiangiogênica, no 11° dia de incubação, sete grupos experimentais (n = ± 15) foram testados: DMEM (como controle negativo), F2_3,6_1a3; F2_3,6_1a3C; F2_3,6_1p3; F2_3,6_1p3C e CPT livre. 30 μL de cada amostra (equivalente à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CPT) foram aplicadas sobre a CAM. Após dois dias, no 14° dia de desenvolvimento, fotos da CAM foram captadas (*in ovo*) utilizando lupa acoplada ao computador para avaliar as alterações vasculares, e em seguida as membranas foram excisadas com tesouras de sutura e fotografadas (*ex ovo*) para fins de quantificação do número de vasos. As contagens para cada ovo foram realizadas por dois observadores independentes para minimizar a falha e os valores médios e desvio padrão utilizados como resultado.

4.2.9. Desenvolvimento das micropartículas contendo CPT nanoencapsulada (MCs)

4.2.9.1. Microencapsulação das NCs

As dispersões de NCs foram concentradas utilizando tubo Amicon® (100 kDa), sob centrifugação (1800 rpm, três ciclos de 3 minutos). Um volume pré-determinado das dispersões concentradas de NCs foi adicionado às dispersões poliméricas, previamente preparadas

conforme o item 4.2.2, perfazendo a razão (v/v) NCs:dispersão polimérica de 1:3,5. A mistura foi realizada sob agitação magnética (400 rpm) e aquecimento brando (40°C) até homogeneização (~ 30 minutos) e, em seguida foi gotejada manualmente (seringa e agulha 22G-0,7X0,3 mm) na solução resfriada de íons Ca^{2+} (3%, m/v). O sistema foi mantido sob agitação magnética (600 rpm) por 30 minutos. As micropartículas carregadas com as nanocápsulas (MCs) foram separadas por filtração, lavadas com água purificada e secas em temperatura ambiente. A forma e estrutura interna das MCs foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) em equipamento JEOL JSM-7500F, com recobrimento de carbono.

O rendimento do processo de microencapsulação (R%) foi calculado considerando as massas teóricas dos materiais que compunham as NCs (m_j) e a massa teórica dos polímeros da matriz das micropartículas (n_i), em relação à massa final experimental obtida após a secagem das MCs (m_f), segundo a Equação 9.

$$R(\%) = \frac{m_f}{\sum m_j + \sum n_i} \times 100; j = 1,2,3, \dots; i = 1,2,3, \quad \text{Eq. 9}$$

4.2.10. Caracterização das MCs

4.2.10.1. Avaliação do diâmetro, circularidade e valor de span

O diâmetro de Ferret, circularidade e o valor de span das MCs foram avaliados conforme procedimento descrito no item 4.2.3.1.

4.2.10.2. Avaliação da eficiência de incorporação da CPT nanoencapsulada nas micropartículas

Uma massa de MCs foi precisamente pesada e incubada por 24 horas em 3 mL de tampão fosfato (pH 6,8), contendo 0,5% de laurilsulfato de sódio. Após a incubação, as MCs foram trituradas utilizando agitador ultra-turrax, por 10 minutos (~10.000 rpm) e, adicionou-se mais 3 mL de tampão à preparação. As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,20 μm e o conteúdo de CPT foi quantificado por CLAE, de acordo com metodologia previamente validada ($y=44,539x-10,015$; $R^2= 0,9915$). Para o cálculo da porcentagem de incorporação (%EI) considerou-se a massa teórica de CPT por massa de MCs final, além da eficiência de encapsulação da CPT nas NCs e o rendimento das micropartículas.

4.2.11. Estudo da mucoadesividade das MCs

4.2.11.1. Avaliação da mucoadesividade utilizando a técnica “wash off”

O ensaio *ex vivo* para a avaliação da mucoadesividade foi realizado utilizando mucosa intestinal suína (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014). Inicialmente, a mucosa do intestino delgado ou cólon foi cortada longitudinalmente, lavada com solução salina para remoção de sujidades, e fixada em um suporte acrílico com inclinação de $\sim 45^\circ$. Em seguida, 10 unidades de MCs foram cuidadosamente dispostas sobre a mucosa, permitindo um tempo de repouso de 5 minutos para o intumescimento das partículas e o estabelecimento das interações mucoadesivas. Após, iniciou-se a lavagem com solução salina (NaCl 0,9%) com auxílio de bomba peristáltica, em fluxo constante (20mL/min) durante 30 minutos (Figura 12).

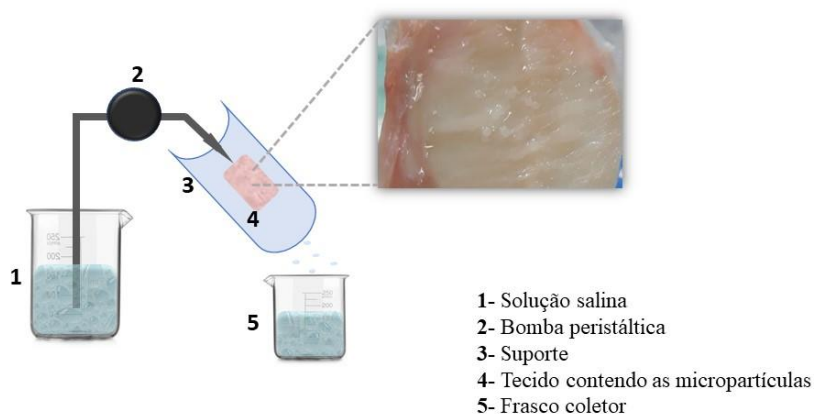


Figura 12. Representação esquemática do teste "ex vivo" de mucoadesão.

A porcentagem de adesão foi determinada através da contagem do número de partículas que permaneceu fixada à mucosa após o tempo determinado.

4.2.11.2. Avaliação da mucoadesividade “in vitro” em texturômetro

A força mucoadesiva das micropartículas carregadas com as NCs foi determinada utilizando o Analisador Universal de Textura (TA-XT2 Texture Analyser - Stable Micro Systems) no modo compressão. Discos de mucina suína tipo II previamente hidratados com HCl (pH 1,2) ou tampão fosfato (pH 6,8) foram utilizados para mimetizar o substrato biológico. Os discos de mucina foram fixados à mesa do analisador e as amostras secas foram fixadas, com o auxílio de fita dupla face Scotch® (3M™), na sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro (Figura

13). A sonda contendo a amostra foi movida perpendicularmente em direção ao disco, com velocidade constante de 1 mm.s^{-1} e, introduzida em 0,05 mm de profundidade, a partir da superfície do disco, permanecendo em contato por 30 s. Em seguida, a sonda foi removida em velocidade constante de 2 mm.s^{-1} até a total separação das duas superfícies. A partir do gráfico de força *versus* distância, gerado pelo *software Texture Exponent Lite*, determinou-se a força máxima de mucoadesão, ou seja, a força necessária para separar a sonda com a amostra do substrato (*FMax*).

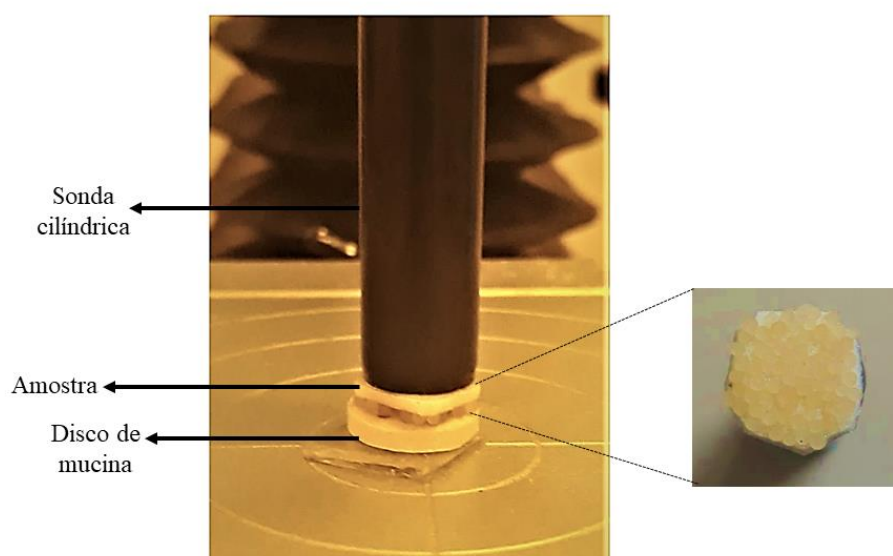


Figura 13. Esquema ilustrativo da metodologia utilizada no ensaio de mucoadesão “in vitro”.

4.2.12. Avaliação da liberação da CPT utilizando modelo estático para simulação da digestão (INFOGEST)

O processo de digestão *in vitro* das MCs foi simulado empregando o protocolo proposto por Minekus et al. (2014), utilizando banho metabólico do tipo Dubnoff para incubação das amostras (MA 093, Marconi). De 0,7 a 1 g de MCs ($\sim 150 \mu\text{g}$ CPT) foram pesadas e homogeneizadas com 4 mL de solução estoque salivar simulada (Tabela 3) e $975 \mu\text{L}$ de água ultrapura. A mistura foi incubada por 2 minutos a 37°C e em seguida, adicionou-se 7,5 mL de solução estoque gástrica simulada (Tabela 3) com 1,6 mL de solução de pepsina (Sigma-Aldrich, P7000, 25.000 U / mL). O pH foi ajustado para 3 e a mistura incubada a 37°C por 2 horas, para simular a digestão gástrica. Após, 11 mL de solução estoque intestinal simulada (Tabela 3) com 5 mL de solução de pancreatina (Sigma-Aldrich, P1750, 800 U / mL) e 2,5 mL

de solução biliar (Sigma-Aldrich, B8631, 160 mmol / L), foram adicionadas ao quimo gástrico. O pH foi ajustado para 7 e a mistura foi incubada a 37 °C por mais 2 horas, para simular a digestão intestinal. Coletas do meio foram realizadas nos tempos 1, 2, 3 e 4 h, e a CPT liberada foi quantificada por CLAE, utilizando método previamente descrito. Ao final do ensaio, as partículas foram separadas, congeladas, liofilizadas e analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Tabela 3. Composição dos meios digestivos simulados.

Componentes	SSF (pH 7,0)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7,4)
	Volume (mL)		
KCl (0,5 mol/L)	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄ (0,5 mol/L)	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃ (1 mol/L)	6,8	12,5	42,5
MgCl ₂ (2 mol/L)	0,5	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃ (0,5 mol/L)	0,06	0,5	-
NaCl (1 mol/L)	-	11,8	9,6
HCl (6 M)	0,09	1,3	0,7
H ₂ O	373,75	365,7	338,5

*SSF: fluído salivar simulado, SGF: fluído gástrico simulado e SIF: fluído intestinal simulado.

4.2.13. Análise estatística

As diferenças significativas entre os valores obtidos nos ensaios realizados, foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do software Origin 2018 e Sigma Plot 10.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da CPT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.1.1. Conformidade do sistema cromatográfico

Realizou-se a injeção da solução de CPT (25 µg.mL⁻¹) em fase móvel (acetonitrila:água acidificada 45:55), de acordo com os parâmetros descritos anteriormente. O cromatograma e espectro de absorção na região do UV obtidos estão representados na Figura 14.

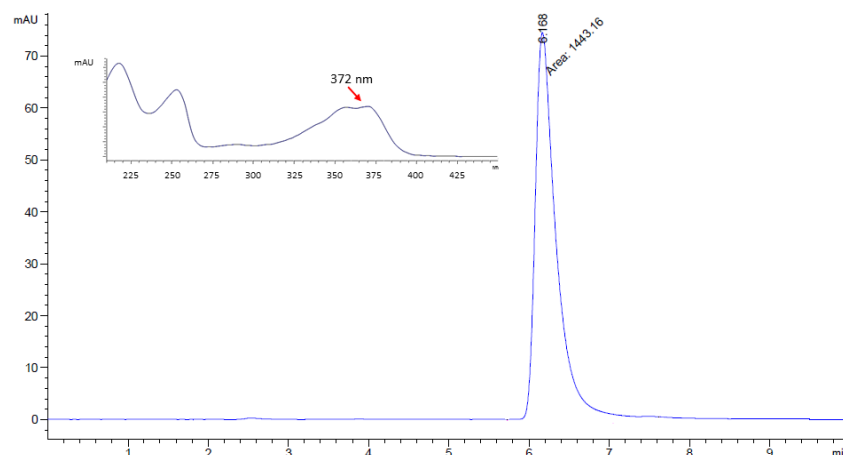


Figura 14. Cromatograma e espectro de absorção na região do UV da CPT.

Como é possível observar, a CPT apresenta em seu espectro duas bandas de absorção bem definidas entre 225 e 375 nm (Figura 14).

Considerando que a maioria das moléculas orgânicas possuem máxima absorção na região de 250 a 280 nm, para a metodologia desenvolvida selecionou-se o comprimento de onda 372 nm.

Após a avaliação do espectro do fármaco, a conformidade do método cromatográfico foi avaliada e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros da análise de conformidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise da CPT.

Amostra	tR	Área	Simetria do pico 10%	Fator de cauda	nº de pratos teóricos (N)
1	6,158	1408,9	1,70	1,86	3233
2	6,158	1398,1	1,70	1,88	3261
3	6,159	1446,1	1,71	1,90	3257
4	6,165	1418,9	1,72	1,90	3194
5	6,159	1444,5	1,70	1,84	3290
6	6,160	1443,2	1,67	1,83	3247
média	6,159	1426,6	1,70	1,86	3247
DP	0,003	20,7	0,02	0,03	32,09
D.P.R (%)	0,043	1,5	0,98	1,60	0,98

Para demonstrar a resolução e a simetria do pico correspondente a CPT, os cromatogramas das seis injeções, obtido pelo método proposto, foram sobrepostos e estão representados na Figura 15.

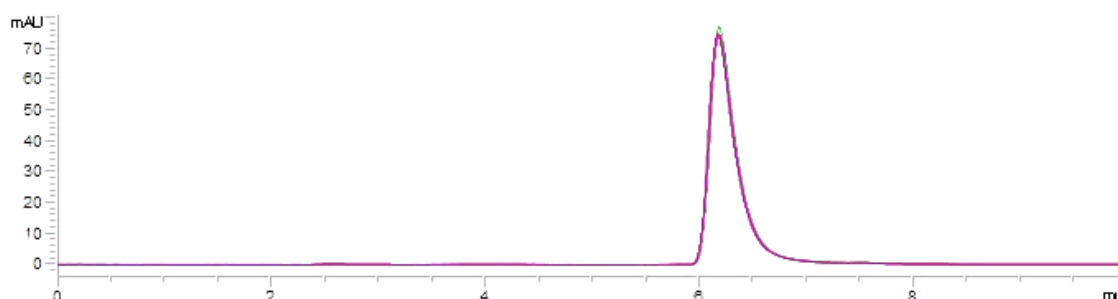


Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas da CPT (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos pelo método cromatográfico proposto.

O conjunto de dados apresentados demonstra a adequação do método desenvolvido para a quantificação da CPT.

5.1.2. Especificidade/seletividade

Esse parâmetro indica a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes, sem que ocorra interferência no resultado da análise. Em métodos quantitativos, a especificidade/seletividade, pode ser avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos de amostras e dos possíveis interferentes, como os excipientes do sistema de liberação e os meios receptores. Em métodos cromatográficos, esse parâmetro é importante, uma vez que a pureza e características do pico do fármaco deve ser mantida (BRASIL ANVISA, 2017).

Para a avaliação da seletividade e especificidade do método proposto, inicialmente, injetou-se as soluções dos polímeros GG, P, AR, QS, HP e AH e os cromatogramas sobrepostos ao do fármaco livre, para comparação (Figura 16-A). Os polímeros não apresentaram picos de absorção na região do UV que possam interferir na quantificação do fármaco. Em relação a fase móvel, é possível observar apenas um deslocamento da linha de base, de pequena amplitude, sem apresentar picos no comprimento de onda de maior absorção da CPT de 372 nm.

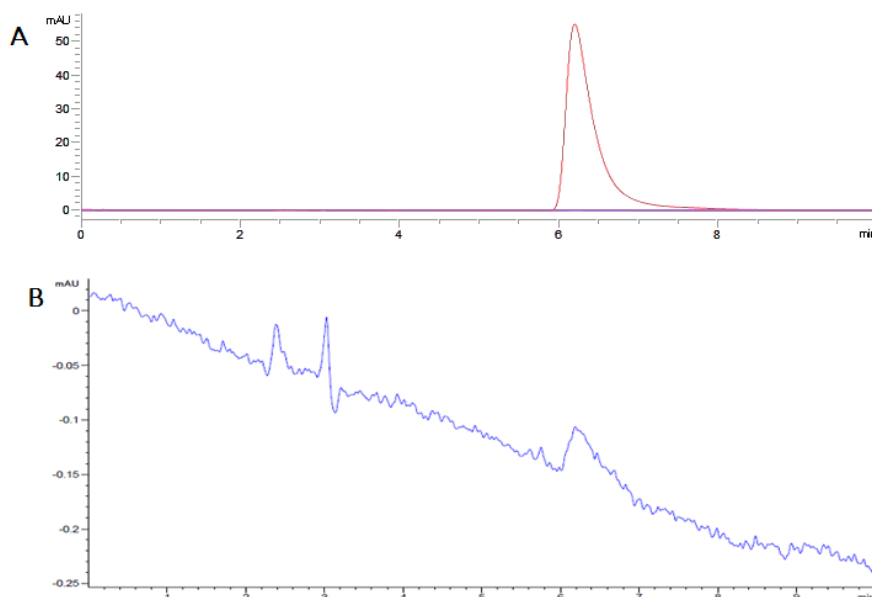


Figura 16. (A) Sobreposição dos cromatogramas dos polímeros e da CPT e (B) Cromatograma da fase móvel.

5.1.3. Linearidade

Esse parâmetro representa a capacidade do método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco, dentro de um intervalo definido de concentrações (BRASIL ANVISA, 2017). Para a avaliação da linearidade, a partir da média dos valores das áreas obtidas, no comprimento de onda de 372 nm, a curva analítica área *versus* concentração de CPT foi construída (Figura 17).

Os resultados obtidos demonstraram que as soluções de CPT apresentaram correlação linear entre as áreas e concentrações no intervalo testado, com coeficiente de correlação de 0,9997, demonstrando a adequada linearidade do método, considerando o valor recomendado de $r^2 = 0,99$ (BRASIL ANVISA, 2017).

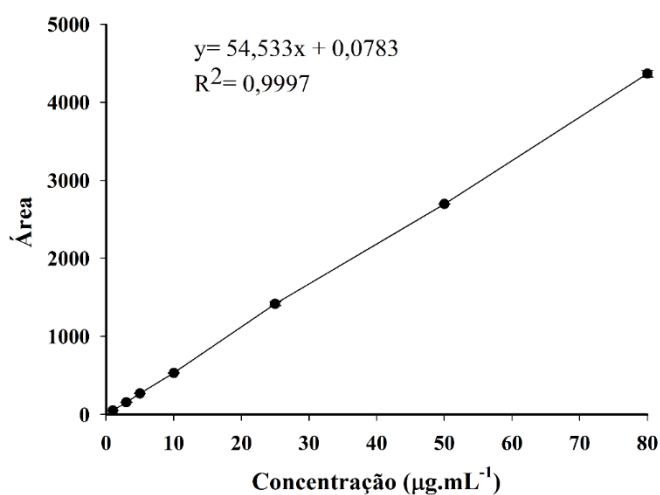


Figura 17. Curva de analítica da CPT obtida por CLAE.

Realizou-se a análise de variância ANOVA para os dados obtidos a partir da curva analítica (Tabela 5), confirmando que a regressão linear é altamente significativa, visto que o valor de F calculado (19177,82) foi superior ao de F tabelado (4,75). Não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo, uma vez que, entre grupos, o valor de F calculado foi menor do que o valor de F tabelado no nível de 95% de confiança. Portanto, o erro experimental confunde-se com o erro puro, ou seja, o erro inerente a análise que não pode ser controlado.

Tabela 5. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva.

Fonte da variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	F	F tabelado
Entre grupos	167,25	2	$3,161 \cdot 10^{-5}$ *	3,5545
Regressão	1	15865243,37	19177,82*	$3,72 \cdot 10^{-10}$
Resíduo	5	4136,35		

*Significativo para $p < 0,05$.

5.1.4. Precisão

A precisão de um teste analítico avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma múltipla amostragem de uma mesma amostra. Duas formas de demonstrar a precisão são comumente utilizadas, a precisão intracorrida e a intercorrida (BRASIL ANVISA, 2017). A análise de precisão intracorrida e intercorrida foi realizada e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6 e 7.

Tabela 6. Resultados obtidos para o teste de repetibilidade ou precisão intracorrida.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ¹⁾	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	D.P.R%
5	276,4	5,07	5,079	0,018	0,36
	276,56	5,07			
	278,2	5,10			
10	549,7	10,08	10,079	0,110	1,09
	543,7	9,97			
	555,7	10,19			
25	1377	1377,00	25,318	0,379	1,50
	1362,2	1362,20			
	1403	1403,00			

Como preconizado pela legislação vigente, os D.P.R% observados para todas as réplicas em diferentes concentrações, nos ensaios de precisão intracorrida e intercorridas foram inferiores à 5%, portanto, o método desenvolvido é preciso (BRASIL ANVISA, 2017).

Tabela 7. Resultado do ensaio de precisão intercorrida.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Analista e dia	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DP	D.P.R%
5	1	5,08	5,09	0,02	0,43
	2	5,11			
10	1	10,08	10,07	0,01	0,09
	2	10,06			
25	1	25,32	25,44	0,18	0,72
	2	25,57			

5.1.5. Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pela aplicação do método analítico em relação ao valor teórico real. Valores próximos a 100% são desejáveis, no entanto, admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL ANVISA, 2017).

Na Tabela 8 estão representados os valores de exatidão do método proposto. Considerando que valores de exatidão, para todas as concentrações, estão entre 100,78% e 101,58%, pode-se concluir que a metodologia analítica desenvolvida é adequada para a quantificação da CPT (BRASIL ANVISA, 2017).

Tabela 8. Exatidão entre as concentrações teóricas e experimentais da CPT.

Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
5	5,08	101,58
10	10,08	100,78
25	25,32	101,27

5.1.6. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Utiliza-se o LD e o LQ para medir a sensibilidade do método. O LD representa a menor quantidade que pode ser detectada do fármaco presente na amostra, mas não necessariamente quantificada e o LQ representa a menor quantidade de fármaco na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão pelo método desenvolvido (BRASIL ANVISA, 2017). Os valores de LD e LQ encontrados utilizando-se o método proposto foram $0,063 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,192 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores demonstram a capacidade da metodologia analítica em detectar e quantificar com confiabilidade baixas concentrações de CPT.

5.1.7. Robustez

Esse parâmetro representa a medida da capacidade do método analítico desenvolvido em permanecer inalterado frente a pequenas modificações nos parâmetros analíticos pré-determinados (BRASIL ANVISA, 2017). Avaliou-se a robustez a partir de pequenas modificações individuais no método (Tabela 9), comparando-se os valores com os obtidos nas condições padronizadas.

Tabela 9. Variações nos parâmetros cromatográficos para avaliação da robustez do método analítico.

Variáveis	Condições		
	1	2	3
Volume de injeção (μL)	10,5	10	10
Comprimento onda (nm)	370	371	370
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	30	35

Os D.P.R% entre as condições apresentadas e a condição padrão mostraram-se abaixo de 2,0%, bem como, a exatidão que permaneceu na faixa de 102,50% e 103,40% (Tabela 10), comprovando que mesmo com pequenas modificações nos parâmetros analíticos não ocorre influência significativa na análise de quantificação do fármaco. Portanto, o método proposto é considerado robusto (BRASIL ANVISA, 2017).

Tabela 10. Avaliação da robustez do método analítico para quantificação da CPT por CLAE.

Condição	Concentração média experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão	DPR%
1	25,85	103,40	1,49
2	25,64	102,56	0,91
3	25,63	102,50	0,88

5.2. Desenvolvimento das micropartículas poliméricas (MPs)

5.2.1. Retrogradação do amido

As fotomicrografias ópticas e de luz polarizada dos grânulos de amido nativo, após a gelatinização e após a retrogradação estão apresentadas na Figura 18. Antes do processo de retrogradação, quando observado microscopicamente, os grânulos de amido apresentavam uma estrutura ligeiramente intumescida, devido a difusão e aprisionamento das moléculas de água em sua região amorfa (Figura 18-A). Essa mesma dispersão quando visualizada microscopicamente sob luz polarizada apresentou birrefringência, ou seja, devido à orientação radial das moléculas de amilose e amilopectina, houve a refração da luz, resultando no modelo “Cruz de Malta”, como pode ser observado na Figura 18-A2 (GRANFELDT; DREWS; BJÖRCK, 1993; LOBO; DE LEMOS SILVA, 2003).

Quando a dispersão aquosa de alta amilose foi aquecida a 80°C e autoclavada (121°C por 15 minutos), ocorreu o intumescimento irreversível dos grânulos, resultando na perda da organização estrutural com a fusão dos cristais e, conseqüentemente, perda da birrefringência, surgindo o campo escuro (Figura 18-B2). Devido ao aquecimento e excesso de água o rompimento do grânulos ocorreu, bem como a lixiviação da amilose granular para o meio aquoso, caracterizando o fenômeno de gelatinização (AMBIGAIPALAN et al., 2011; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014). No período de armazenamento, no qual a dispersão foi submetida a sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento, as cadeias de amilose e amilopectina interagem intermolecularmente, formando duplas hélices estabilizadas por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, sofrendo reassociação em um estado mais ordenado (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014). A formação dessa rede tridimensional é perceptível pelo aumento da viscosidade da dispersão, a qual favorece a proteção à hidrólise enzimática. A formação da estrutura ramificada e organizada pode ser observada por microscopia com a presença de grânulos suportados por uma matriz e, por de luz polarizada com a formação de cristais (Figura 18-C) (DENARDIN, 2006; FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010a; OLIVEIRA CARDOSO et al., 2017).

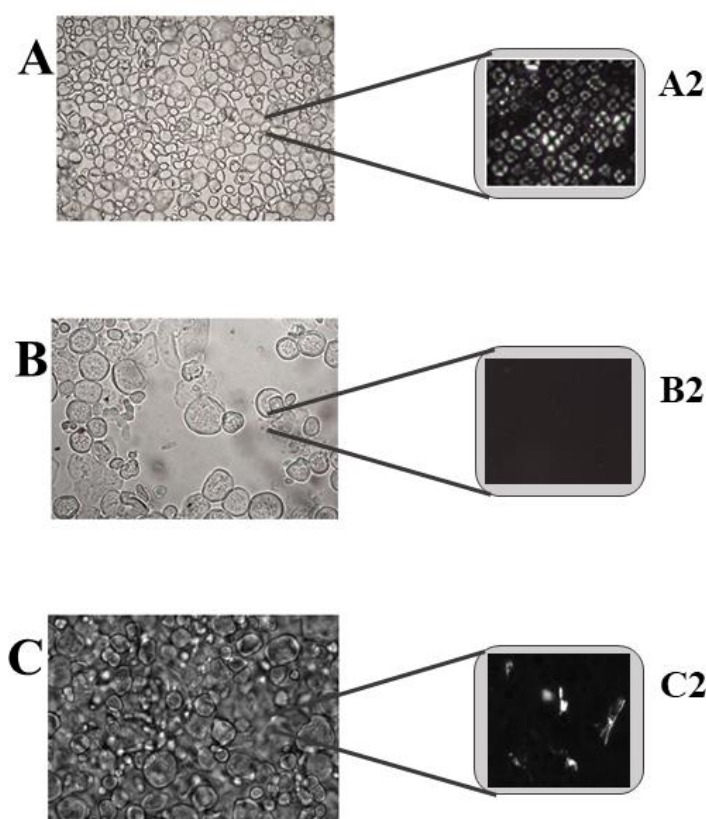


Figura 18. Microscopia óptica e de luz polarizada dos grânulos de amido na fase previa ao processamento (A e A2), após a gelatinização (B e B2) e após a retrogradação (C e C2).

O armazenamento relativamente longo da dispersão de amido por 16 dias é importante para garantir a efetiva retrogradação do material, uma vez que a reorganização da amilose ocorre rapidamente, seguido do processo mais lento de reorganização da amilopectina (LIU et al., 2007).

5.2.2. Obtenção e caracterização estrutural e morfológica das MPs

Para as MPs compostas por GG:P, selecionou-se a concentração polimérica de 2% (m/v), de acordo com o estudo desenvolvido por Prezotti e co-autores (2014), no qual observou-se a formação de partículas irregulares a partir do gotejamento de dispersões em concentrações inferiores. Para as MPs baseadas em GG:AR, o desenvolvimento seguiu as condições propostas por De Oliveira e co-autores (2020).

A altura do gotejamento das dispersões na solução reticulante foi padronizada (~8 cm), em placa de petri. Cada amostra foi denominada de acordo com sua composição (Tabela 11).

O controle de tamanho e o estudo da distribuição granulométrica das MPs são importantes, pois alterações no volume e consequentemente área superficial podem interferir

diretamente na capacidade de incorporação do fármaco ou das nanocápsulas, causando potenciais variações de dose. Essas variações podem também afetar a reprodutibilidade dos eventos envolvidos no processo de liberação (SIEPMAN et al., 2004).

Tabela 11. Nomenclatura e composição das micropartículas.

Amostra	Proporção GG:P (m/m)	Proporção GG:AR (m/m)	Agente reticulante (%)
GACa	-	1:2,5	Ca ²⁺ (3%)
GAAl	-	1:2,5	Al ³⁺ (3%)
GACaAl	-	1:1,5	Ca ²⁺ (3%) e Al ³⁺ (3%)
GPCa	1:1	-	Ca ²⁺ (3%)
GPAI	1:1	-	Al ³⁺ (3%)
GPCaAl	1:1	-	Ca ²⁺ (3%) e Al ³⁺ (3%)

As partículas compostas por GG:P apresentaram diâmetros na faixa de 888 a 961 μm e circularidade de 0,77 a 0,82 (Tabela 12). Já para as partículas compostas por GG:AR, observou-se diâmetros entre 1607 a 1793 μm e circularidade de 0,76 a 0,78 (Tabela 12).

De acordo com os valores da Tabela 12, pode-se notar que a composição polimérica associada ao tipo de agente reticulante influenciou significativamente ($p < 0,05$) o tamanho das MPs.

Tabela 12. Diâmetro, circularidade média e Índice Span das MPs (n=100).

Amostra	Diâmetro médio (μm) $\pm$ DP	Circularidade $\pm$ DP	Índice Span
GACa	1607 $\pm$ 177	0,76 $\pm$ 0,07	0,29
GAAl	1793 $\pm$ 158	0,78 $\pm$ 0,09	0,30
GACaAl	1760 $\pm$ 174	0,78 $\pm$ 0,09	0,28
GPCa	961 $\pm$ 67	0,77 $\pm$ 0,07	0,27
GPAI	889 $\pm$ 110	0,82 $\pm$ 0,05	0,41
GPCaAl	888 $\pm$ 99	0,81 $\pm$ 0,08	0,30

Em dispersão aquosa, a GG e a P apresentam elevada densidade de carga negativa (~ -40 mV), devido a ionização dos grupamentos carboxílicos presentes nas moléculas. Devido a repulsão eletrostática, a associação das cadeias de GG e P é fraca, devendo formar uma rede polimérica mais expandida. Quando em contato com as soluções de Ca²⁺ e Al³⁺, diversos

pontos de interação eletrostática inter e intramoleculares são formados. As ligações iônicas iniciais resultam na aproximação das cadeias poliméricas favorecendo a subsequente formação de outros tipos de ligações supramoleculares, como as de hidrogênio e Van der Waals, originando uma rede tridimensional com maior grau de empacotamento. Por ser um íon trivalente, o alumínio apresenta uma carga positiva extra em relação ao íon cálcio, que é divalente. Cada Al^{3+} é capaz de se ligar a três resíduos carboxilato, presentes nas moléculas tanto da GG quanto da P, promovendo um ponto de reticulação adicional em relação ao Ca^{2+} . Provavelmente, por esse motivo, a partícula GPAl apresentou menor diâmetro em comparação à GPCa (MAITI et al., 2011). A dupla reticulação foi capaz de formar partículas de diâmetro médio semelhante à reticulada apenas com alumínio, indicando que a dupla reticulação não promoveu o aumento do grau de empacotamento da partícula (Tabela 12).

Em contrapartida, o AR é um polissacarídeo de elevada massa molecular (1803 kDa) e por ser formado por resíduos de glicose, em dispersão aquosa, apresenta baixa densidade de carga negativa ($\sim -3\text{mV}$), sendo fracamente reticulado por cátions (FUENTES-ZARAGOZA et al., 2010a). Considerando essas características, em dispersão deve ocorrer uma menor repulsão das cadeias de GG e AR, as quais podem se associar mais facilmente, via interações físicas. No processo da reticulação devem ocorrer majoritariamente ligações iônicas dos carboxilatos pertencentes as moléculas de ácido glucurônico da cadeia de GG, com o Ca^{2+} e/ou Al^{3+} , formando uma rede tridimensional. Enquanto esse processo acontece, o AR deve se associar às cadeias de GG principalmente por interpenetração física de suas longas e volumosas cadeias nos espaços intersticiais da malha formada pela reticulação iônica da GG (HOSSEINI, SEYEDE MARZIEH HOSSEINI et al., 2014; ZOU et al., 2011). Esse arranjo estrutural deve promover a formação de uma matriz mais desordenada e expandida, em comparação à matriz altamente reticulada e empacotada formada a partir da associação de GG e P, caracterizada pelas partículas de maior diâmetro (Tabela 12).

A partir dos dados, observou-se um efeito inverso do tipo de agente reticulante nas dispersões de GG:AR, em que a reticulação com cálcio resultou na formação de partículas menores do que as reticuladas com Al^{3+} ($p < 0,05$). Considerando que com os íons Ca^{2+} a reticulação da rede polimérica ocorre em menor extensão, é possível admitir a formação de uma rede mais frouxa e de maior mobilidade a qual permite a interpenetração e acomodação mais efetiva do AR na estrutura, com posterior estabelecimento de interações supramoleculares entre as cadeias, originando uma matriz mais organizada e até compacta. Em contrapartida, como a reticulação com Al^{3+} forma-se uma malha com maior número de pontos de interação e,

consequentemente, mais rígida e empacotada, na qual a interpenetração das cadeias do AR deve ser desfavorecida, formando uma estrutura mais volumosa, caracterizada por partículas de diâmetro maior.

A dupla reticulação da mistura GG:AR resultou na formação de partículas maiores do que as reticuladas utilizando apenas Ca^{2+} , no entanto, menores que as reticuladas apenas com Al^{3+} (Tabela 12).

A partir dos valores de diâmetro, a homogeneidade da distribuição granulométrica pôde ser avaliada quantitativamente pelo cálculo do valor de span. Considerando que o processo de obtenção das micropartículas é manual, esse parâmetro relaciona-se diretamente a reprodutibilidade da metodologia desenvolvida. Quanto menor o valor de span, menor a amplitude de distribuição de tamanho das partículas (YIN WIN; FENG, 2005). Para a melhor visualização das amplitudes de variação de tamanho das partículas, os perfis de distribuição granulométrica foram determinados (Figura 19).

As amostras baseadas nos mesmos polímeros apresentaram perfis de distribuição semelhantes. As GACa, GAAl e GACaAl apresentaram predomínio de partículas com diâmetro entre 1600 e 1700 μm , 1800 e 1900 μm e 1700 e 1800 μm , respectivamente, com faixa de distribuição ampla, deslocada para a direita, nos maiores diâmetros. Em contrapartida, para as GPCa, GPAl e GPCaAl o predomínio foi de diâmetros entre 900 e 1000 μm , 900 e 950 μm e 900 e 1000 μm , respectivamente, com distribuição mais estreita e deslocamento para a esquerda, nos menores valores de diâmetro.

O perfil de distribuição de diâmetro das partículas associado aos valores de span, que variaram de 0,27 a 0,41, ou seja, inferiores a 0,5 (Tabela 12), destacam a homogeneidade de tamanhos dos sistemas obtidos.

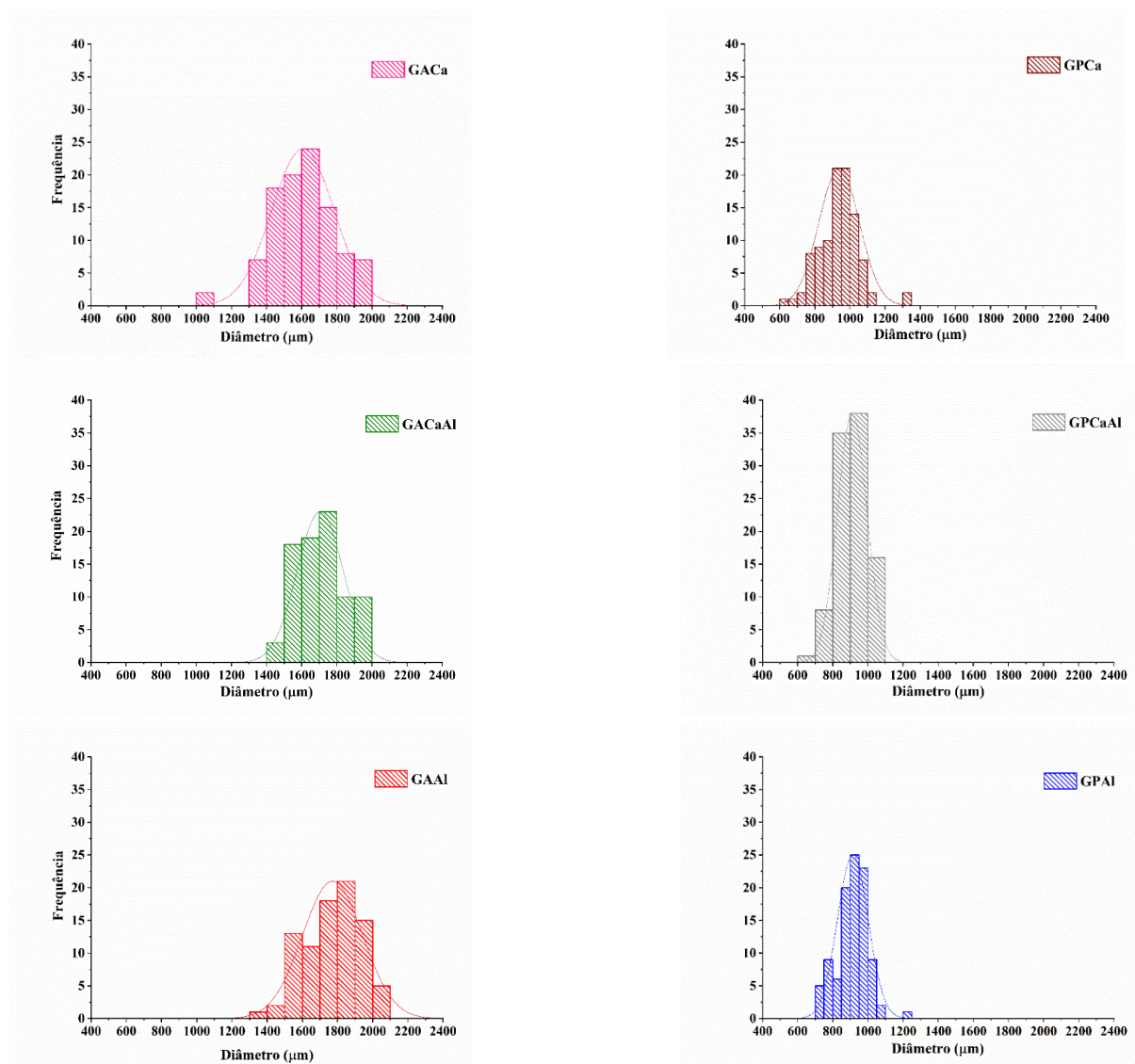


Figura 19. Distribuição granulométrica das MPs.

A avaliação da forma das partículas obtidas foi realizada a partir da determinação da circularidade, um fator que indica que a forma se aproxima de um círculo perfeito, quando o valor está próximo à 1,0. A partir dos dados da Tabela 12, concluiu-se que todas as MPs apresentaram elevada circularidade, com valores entre 0,76 e 0,82. Essa elevada circularidade foi evidenciada pelas fotomicrografias da MEV (Figura 20).

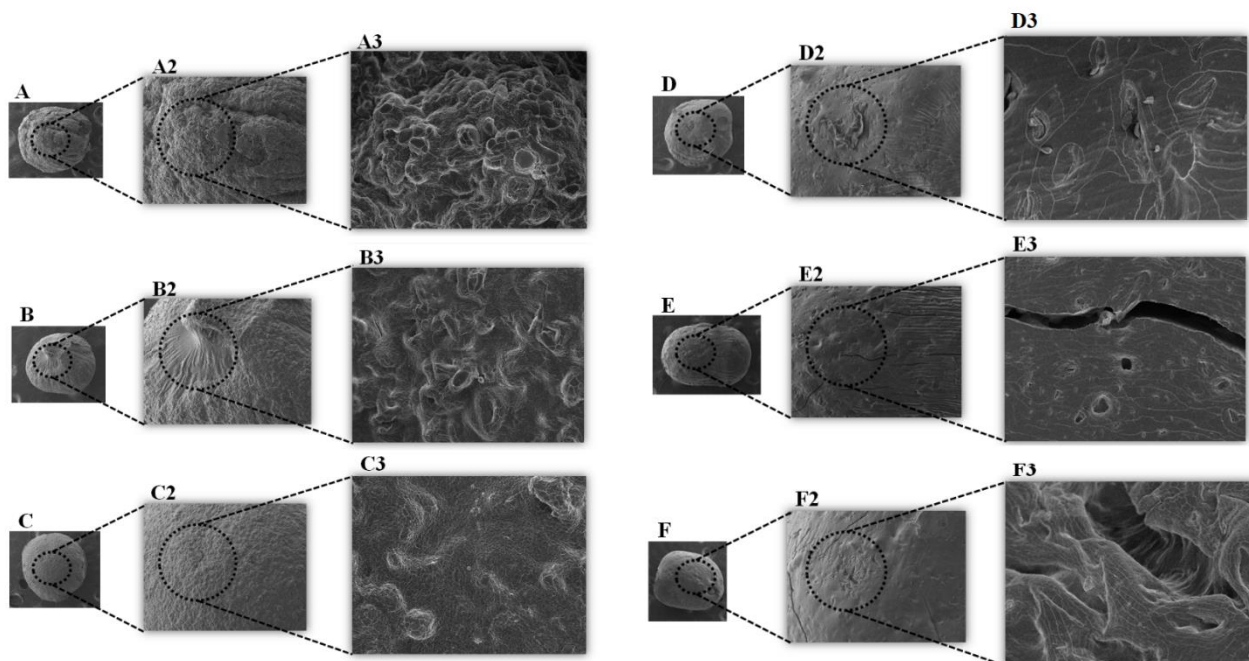


Figura 20. Fotomicrografias da superfície das MPs A: GACa, B: GAAl, C: GACaAl D: GPCa E: GPAl F: GPCaAl (os aumentos são representados pelos números 2: 150 vezes e 3: 10.000 vezes).

Por meio da microscopia foi possível avaliar também a superfície das MPs. Para as baseadas em GG:AR, observou-se uma superfície irregular e rugosa, provavelmente devido à presença de grânulos do AR. A GACa apresentou superfície mais irregular e rugosa, sem poros e fissuras aparentes (Figura 20-A). As partículas GAAl e GACaAl apresentaram também superfície irregular, porém com uma estrutura aparentemente mais coesa. A superfície das partículas compostas por GG:P demonstrou ser mais lisa e homogênea, em comparação às suas contrapartidas GG:AR (Figura 20). No maior aumento (10.000 vezes), a presença de poros foi evidenciada em todas as amostras compostas por GG e P, com a presença de fissuras principalmente para as GPAl e GPCaAl (Figura 20- E3 e F3), possivelmente como resultado do maior grau de reticulação que resultou na formação de uma matriz mais rígida, a qual durante o processo de secagem, como resultado da retração dessa malha polimérica, gerou pontos de ruptura, originando as fissuras.

Pontos de ruptura e presença de poros devem favorecer a difusão de líquidos do meio para o interior da matriz podendo, conseqüentemente, acelerar o processo de degradação enzimática, bem como de liberação das nanocápsulas incorporadas.

A partir das imagens da secção das MPs (Figura 21), no aumento de 150 vezes, observou-se para as partículas GACa, GAAl e GACaAl uma matriz homogênea e coesa.

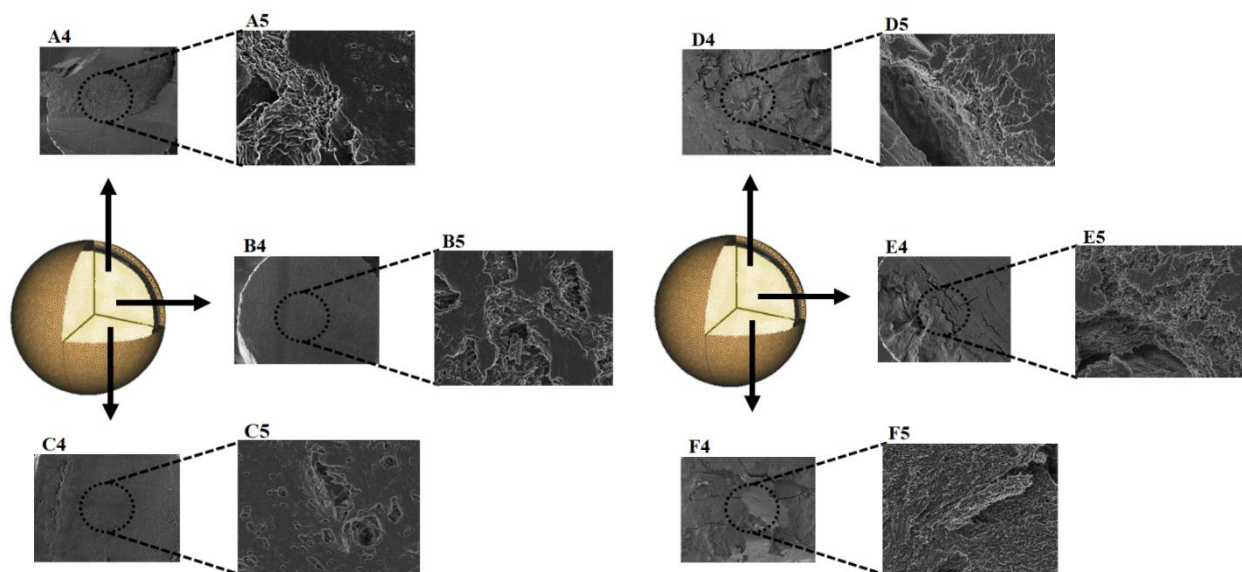


Figura 21. Fotomicrografias evidenciando a estrutura interna das MPs A: GACa, B: GAAl, C:GACaAl, D: GPCa, E: GPAl e F: GPCaAl (sendo os aumentos representados pelos números 4: 150 vezes e 5: 10.000 vezes).

No entanto, no maior aumento (10.000 vezes), pode-se observar a presença de algumas falhas na estrutura interna, originando grandes poros. A dupla reticulação da dispersão GG:AR contribuiu para a formação de uma matriz mais coesa, com a presença de um menor número de poros de pequeno diâmetro (Figura 21-C4).

Para as MPs compostas por GG:P, observou-se a formação de uma estrutura mais compactada, em relação as baseadas em GG:AR, no entanto a presença de várias falhas ou fissuras, bem como canalículos, na estrutura interna das partículas, revelam a formação de uma matriz heterogênea (Figura 21-D4, E4 e F4). Novamente, a dupla reticulação contribuiu para a formação de uma estrutura aparentemente mais coesa (Figura 21-D5).

5.3. Avaliação da capacidade de absorção de líquidos e erosão em pH 1.2 e 6.8

A quantidade de líquido absorvido está diretamente relacionada à hidrofilia dos polímeros utilizados na composição da matriz, bem como, à estrutura e grau de organização dessa matriz (CARBINATTO et al., 2014).

A capacidade de absorção de líquido e erosão foram avaliadas em meios que simulam o pH estomacal e intestinal de 1,2 e 6,8, respectivamente. Nos tempos testados, os perfis de volume de meio absorvido *versus* massa de MPs evidenciaram a elevada capacidade de absorção de líquidos dos sistemas desenvolvidos (Figura 22).

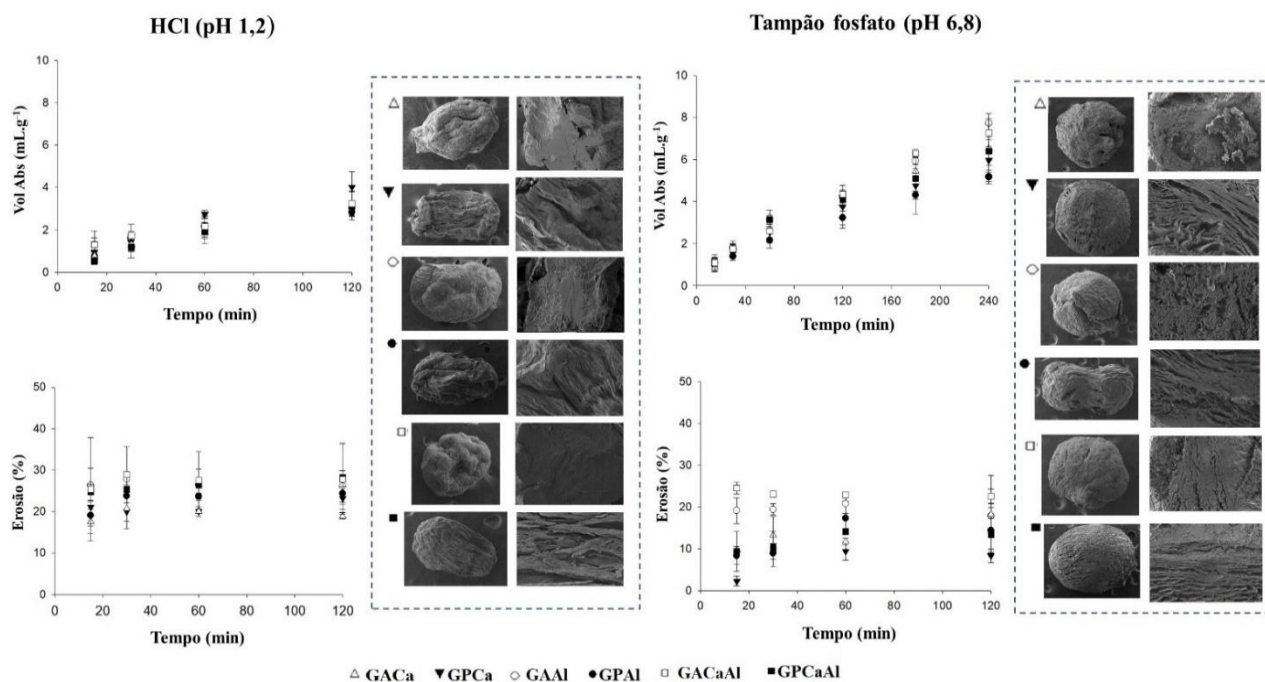


Figura 22. Perfis de absorção de líquido (mL.g⁻¹), porcentagem de erosão e fotomicrografias das micropartículas após contato com HCl (pH1,2) e tampão fosfato (pH 6,8).

Em meio ácido, diferenças nas taxas de absorção foram observadas, com influência significativa da composição das partículas associada ao agente reticulante utilizado. Para a partícula composta por GG:AR reticulada com cálcio (GACa), em 15 minutos de ensaio observou-se absorção de 0,73 mL.g⁻¹, duas vezes menor do que a absorção observada para a GAAI e GACaAl. Em 30 minutos, a GACa absorveu 1,31 mL.g⁻¹, enquanto a GAAI e GACaAl absorveram 1,62 e 1,73 mL.g⁻¹, respectivamente. Após 60 minutos, a diferença observada entre as amostras foi mantida e ao final do ensaio, as amostras absorveram volume semelhante de meio ácido absorvido (Figura 22).

O mesmo comportamento foi observado para as partículas compostas por GG:P. Após 15 minutos de ensaio, a partícula GPCa absorveu 0,95 mL.g⁻¹ de meio ácido, valores superiores ao das GPAI e GPCaAL (~ 0,60 mL.g⁻¹). No tempo de 30 minutos, os volumes absorvidos pelas amostras foram semelhantes (~1.5 mL.g⁻¹), voltando a apresentar diferença de volume absorvido, após 60 minutos. Ao final do ensaio, a diferença significativa se manteve, com o maior volume de meio ácido absorvido pela partícula GPCa (4,01 mL.g⁻¹) (Figura 22).

Considerando a influência do tipo de cátion na reticulação de cada uma das misturas poliméricas, para a dispersão GG:AR, a reticulação com Ca²⁺ deve ter resultado na formação

de uma estrutura empacotada e compacta, sem poros e fissuras aparentes, como apresentado na Figura 21, desfavorecendo a difusão de meio para o interior da matriz, o que resulta na menor taxa de absorção observada. As partículas de GG:AR formadas por meio da dupla reticulação apresentaram comportamento semelhante às reticuladas apenas com Al^{3+} , podendo indicar que a organização da malha polimérica, reticulada inicialmente com Ca^{2+} , não sofreu alterações significativas após o contato com o segundo cátion ou, que as modificações ocorreram predominantemente na superfície da partícula.

Diferentemente, para a mistura GG:P, a reticulação com Ca^{2+} deve ter promovido um menor número de ligações iônicas entre os carboxilatos das cadeias poliméricas, formando uma matriz de menor grau de reticulação e consequentemente maior hidrofília, além de formar uma malha de maior mobilidade, a qual facilita a difusão do meio e acomodação de um grande volume de líquido em sua estrutura. Como resultado, observou-se elevada taxa de absorção da partícula GPCa.

Em HCl (pH 1,2), o percentual de erosão das MPs variou de 20,1 e 26,4%. Em pH 1,2, a malha polimérica deve permanecer mais compactada, devido à protonação dos grupos carboxílicos dos polímeros. Dessa forma, a erosão das partículas deve ocorrer de forma mais superficial, já que a difusão do meio para o interior da partícula deve ser dificultada. As imagens de microscopia das partículas reforçam esses achados. Embora as partículas mantenham a forma esférica, as fotomicrografias demonstram que as MPs sofreram certo grau de erosão, predominantemente na superfície da partícula, promovendo redução de tamanho, bem como uma maior heterogeneidade de superfície, com o surgimento de rugosidades e fissuras (Figura 22).

As fotomicrografias da secção dessas MPs evidenciaram uma estrutura interna preservada, compacta e homogênea, reforçando que em pH ácido deve ocorrer predomínio de erosão das camadas mais superficiais das partículas.

Em tampão fosfato (pH 6,8), não houve diferenças significativas no volume de meio absorvido entre as partículas. Comparando-se os valores de líquido absorvido por massa de amostra, observou-se maior absorção de tampão fosfato (pH 6,8), principalmente aos 120 minutos de ensaio, com valores aproximadamente 1,4 vezes maiores que em meio ácido. A partir de 120 minutos, a absorção de tampão foi crescente, alcançando valores de 5,17 a 7,71 mL.g⁻¹ (Figura 22). Em valores de pH superiores ao pKa dos polímeros utilizados ocorre a ionização dos grupos carboxílicos que não estão ionicamente ligados ao Ca^{2+} ou Al^{3+} , favorecendo a repulsão eletrostática das cadeias poliméricas e a expansão da matriz.

Consequentemente, esse evento favorece um fluxo maior de meio para o interior do sistema (PREZOTTI et al., 2018; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

Nesse valor de pH (6,8), a porcentagem de erosão das MPs foi de maneira geral ligeiramente menor, com valores entre 2,5 e 22,6%, exceto para a amostra GPCa. A repulsão eletrostática das cadeias poliméricas que ocorre com a imersão das partículas em pH 6,8, resulta em uma malha mais dilatada que permite a acomodação de um maior número de moléculas de água, sofrendo menor erosão, devido à maior mobilidade da rede. O elevado grau de intumescimento das matrizes foi evidenciado, a partir da avaliação das fotomicrografias da Figura 22, em que se observa uma tendência da manutenção da forma das partículas, mas com aumento significativo de suas dimensões, característico do processo de intumescimento. A partir da análise da estrutura interna das MPs, em pH 6,8, é possível observar a formação de um grande número de canalículos e poros, resultando em uma estrutura laminada e dilatada.

Considerando que a absorção de líquido e erosão são processos que influenciam diretamente o processo de liberação, o controle das taxas de absorção de meio ácido associado à reduzida erosão superficial deve auxiliar na preservação da estrutura interna do sistema, na região gástrica. Em contrapartida, a elevada absorção e intumescimento das matrizes em tampão fosfato (pH 6,8) são processos vantajosos, visto que ao atingir o ambiente intestinal o meio deve ser capaz de se difundir de forma eficiente por toda a matriz, resultando no relaxamento da malha e dilatação da estrutura, eventos que devem facilitar a difusão das nanocápsulas para o meio exterior.

5.4. Avaliação do comportamento de degradação enzimática das micropartículas frente ao valor de pH e conteúdo enzimático

Como forma de selecionar as micropartículas com atributos mais promissores para a encapsulação das NCs, realizou-se o teste de degradação enzimática. Os resultados foram obtidos com micropartículas vazias e estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Degradação enzimática das micropartículas de GG:P (GP) e GG:AR (GA) reticuladas com Ca^{2+} (Ca), Al^{3+} (Al) ou Ca^{2+} e Al^{3+} (CaAl).

Amostra	NaCl+HCl pH 1,2 com pepsina	Tampão fosfato pH 6,8 com pancreatina
	Degradação média (%) $\pm$ DP	
GACa	18,2 $\pm$ 0,57	15,1 $\pm$ 9,17
GAAI	32,0 $\pm$ 0,81	53,7 $\pm$ 7,47
GACaAl	40,6 $\pm$ 2,07	52,9 $\pm$ 3,77
GPCa	61,3 $\pm$ 0,75	65,7 $\pm$ 1,80
GPAI	35,8 $\pm$ 2,81	95,3 $\pm$ 3,74
GPCaAl	32,1 $\pm$ 0,05	75,2 $\pm$ 1,54

A degradação das micropartículas em meio gástrico simulado (contendo pepsina, pH 1,2) variou de 18,2 a 61,3% e em meio entérico simulado (contendo pancreatina, pH 6,8) de 15,1 a 95,3%.

As enzimas digestivas são produzidas e secretadas pela boca, estômago, pâncreas, vesícula e intestinos, ajudando no processo de digestão das substâncias, para que seus constituintes se tornem biodisponíveis. A pepsina tem origem no estômago e sua ativação ocorre por meio da presença de HCl. Já a pancreatina é composta por um conjunto de enzimas como amilase, tripsina, lipase e pancrease, as quais tem a capacidade de digerir proteínas, polipeptídeos e amido (SILVA et al., 2014).

De acordo com os dados da Tabela 13, a partícula GACa foi a que apresentou menor porcentagem de degradação em ambos os meios. Comportamento coerente, já que o processo de retrogradação do amido deve conferir maior resistência à hidrólise enzimática. Além disso, como descrito anteriormente, possivelmente a utilização do cálcio como agente reticulante para a dispersão GG:AR, permitiu a interpenetração física mais eficiente das cadeias poliméricas, formando uma rede mais empacotada e compacta, que impõe maior resistência ao acesso das enzimas.

Em meio entérico simulado, as partículas compostas por GG:P sofreram maior degradação, com valores entre 65,7 e 95,3%. Provavelmente, o acesso das enzimas ao interior dessas matrizes foi facilitado, uma vez que no valor de pH 6,8 ocorre a expansão da malha polimérica, resultando na rápida difusão do meio contendo as enzimas para o interior da micropartícula.

Após o ensaio, as amostras foram coletadas, liofilizadas e analisadas por microscopia. As fotomicrografias obtidas estão apresentadas na Figura 23. É possível observar que em meio gástrico simulado, mesmo com a presença das enzimas, as amostras apresentaram suas estruturas mais preservadas, mantendo a forma aproximadamente esférica. Como discutido no item 5.3, aparentemente a degradação das MPs em meio ácido deve ter ocorrido em nível superficial, considerando a redução do diâmetro e aparência heterogênea da superfície das partículas, com formação de poros e rugosidades. Em contrapartida, em meio entérico simulado, as estruturas mostraram-se mais deformadas ou mesmo completamente desintegradas, como no caso das amostras GAAl e GPAl, as quais foram reticuladas com alumínio.

De maneira geral, comparando-se os resultados obtidos nesse item, com os do ensaio anterior (item 5.3), a adição de enzimas resultou em mudanças significativas na estrutura das micropartículas, principalmente nas condições que simulam o meio entérico, demonstrando a degradação enzimática específica dos sistemas desenvolvidos.

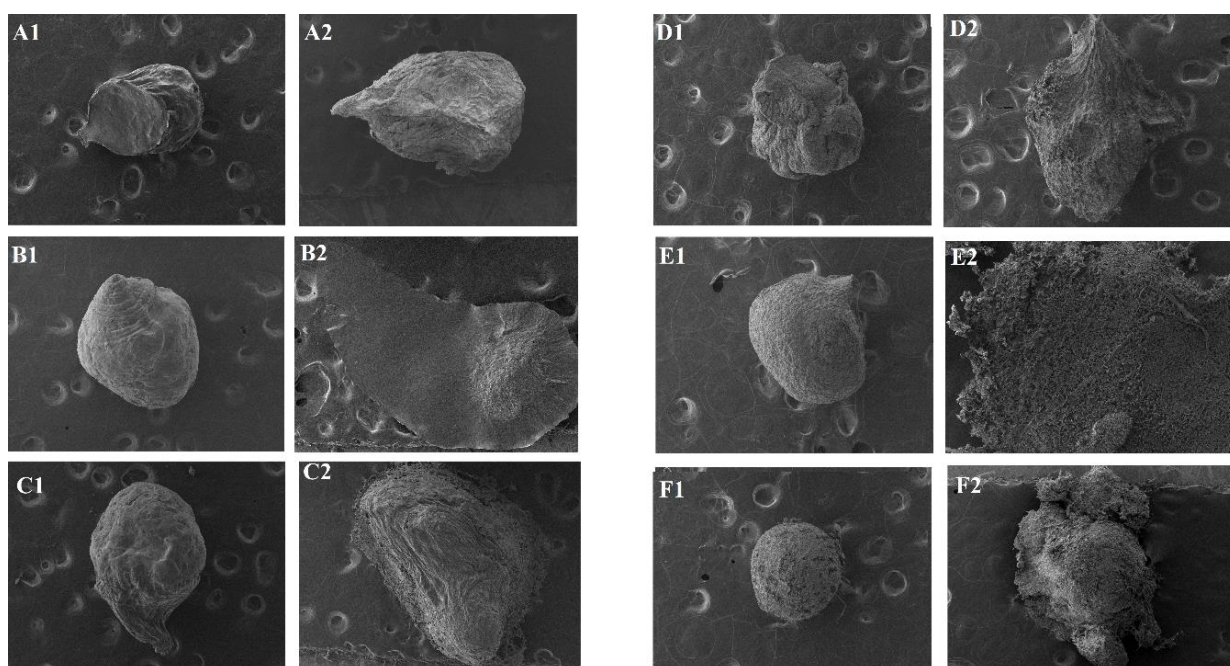


Figura 23. Fotomicrografias das micropartículas após o ensaio de degradação enzimática aumento 100 vezes (A:GACa; B:GAAl; C:GACaAl; D:GPCa; E:GPAl e F:GPCaAl, 1:meio gástrico e 2:meio entérico).

5.5. Estudo *ex vivo* da mucoadesividade das MPs

O teste utilizando mucosa intestinal suína como substrato biológico teve como objetivo simular as interações mucoadesivas do sistema com o substrato biológico. A capacidade

mucoadesiva foi avaliada por meio da medida da força necessária para destacar as micropartículas mantidas em contato com o substrato. Essa força medida foi chamada de “força máxima de mucoadesão” (*FMax*).

A *FMax* média dos polímeros GG e AR isolados foi de 0,36 N e 1,23 N, respectivamente, valores superiores ao observado para a P de 0,12 N (Figura 24).

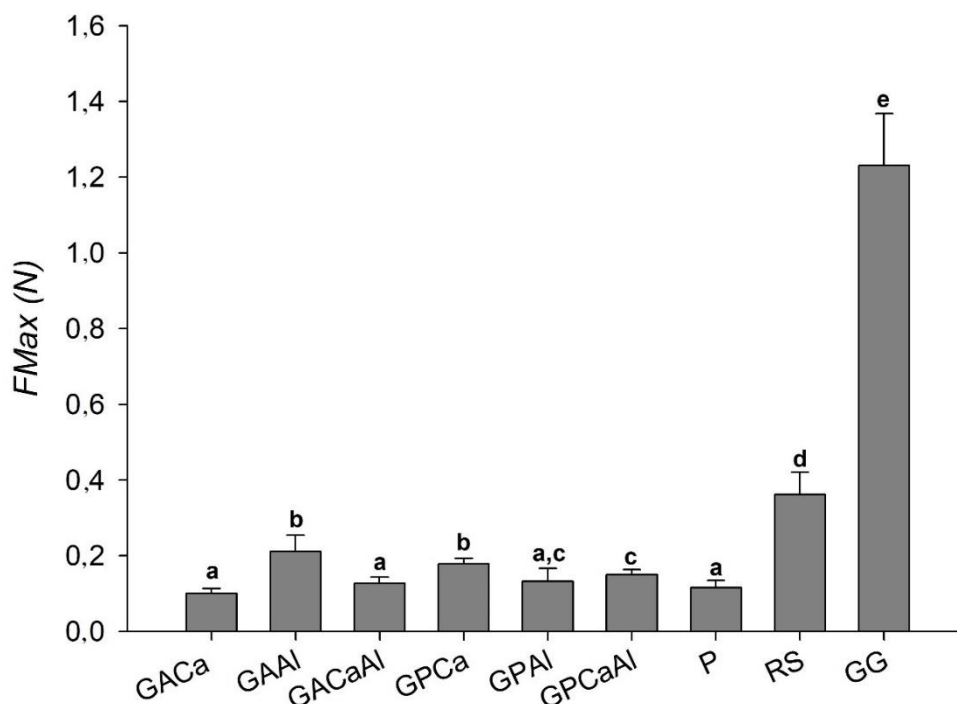


Figura 24. Força máxima de mucoadesão (*FMax*) das micropartículas, pectina (P), amido resistente (AR) e goma gelana (GG). * As letras iguais representam similaridade.

A GG é um polímero hidrofílico, que possui vários grupos carboxílicos e hidroxila em sua cadeia. Esses grupos podem interagir com as glicoproteínas presentes no muco, por meio de interações supramoleculares como as ligações de hidrogênio, formando extensas interações de considerável força e, conseqüentemente, aumentando a força necessária para o destacamento do tecido (OSMAŁEK; FROELICH; TASAREK, 2014; SRIAMORNSAK; WATTANAKORN; TAKEUCHI, 2010). Em relação à P, o AR apresentou maior *FMax*, provavelmente devido às suas cadeias extensas e flexíveis, que permitem maior superfície de contato com a mucosa e favorecem a interpenetração na camada de muco, segundo a teoria da difusão (CARVALHO et al., 2010; DE OLIVEIRA CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020). A P utilizada neste estudo foi de baixa massa molecular e baixo grau de esterificação (DE <50%). Dados da literatura relatam a capacidade da P de baixa DE em penetrar profundamente

na camada de muco intestinal, mas sem a capacidade de aderir fortemente à superfície (LIU et al., 2005; THIRAWONG et al., 2007). Considerando essa característica, associada a baixa massa molecular desse polímero, que pode resultar em menor difusão e enovelamento na camada de muco, justifica-se a menor *FMax* observada (Figura 24).

Para as MPs, observou-se uma redução na *FMax*, em comparação aos polímeros GG e AR, provavelmente devido à imobilização das cadeias proveniente da formação da rede tridimensional entre as cadeias dos polímeros e do processo de reticulação. Por outro lado, as partículas obtidas da mistura GG:P, apresentaram *FMax* superior à P isolada, destacando o efeito da associação da GG na capacidade mucoadesiva do sistema.

Entre as amostras, o efeito do agente reticulante na força de destacamento do intestino suíno foi evidenciado. A GAAI e GPCa foram as amostras que apresentaram os maiores valores de *FMax* (0,21 N e 0,18 N, respectivamente) e a GACa e GPAl as que apresentaram os menores valores de *FMax* (0,10 e 0,14 N).

A interpenetração física associada à imobilização das cadeias dos polímeros, resultante do processo de reticulação, reduz a flexibilidade e mobilidade da malha polimérica. Consequentemente, quanto menor essa mobilidade, menor é a expansão da malha e mais difícil é a interpenetração das cadeias com a mucina presente no muco. Além de reduzir a mobilidade, o maior grau de empacotamento e compactação da matriz resulta em menor número de grupamentos livres para formar interações secundárias com a mucina, influenciando negativamente a consolidação do processo de mucoadesão (CARVALHO et al., 2010; SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014).

Portanto, os dados obtidos estão em concordância com os comportamentos discutidos anteriormente, em que as misturas GG:AR ao serem reticuladas com Ca^{2+} formam uma estrutura mais enovelada, de elevado grau de empacotamento e consequente redução da mobilidade das cadeias, assim como as misturas de GG:P reticuladas com Al^{3+} e, ambas as misturas com a dupla reticulação, reduzindo a capacidade mucoadesiva dessas partículas.

5.6. Seleção da micropartícula para a incorporação das NCs

Para a seleção da MP com as propriedades mais promissoras para veicular as nanocápsulas (NCs) contendo CPT, foram considerados os parâmetros críticos capacidade de absorção de líquido, erosão e degradabilidade enzimática e capacidade mucoadesiva, os quais fornecem informações relevantes sobre a estruturação das matrizes. Dentre as partículas obtidas, a GACa foi selecionada considerando que sua organização estrutural deverá permitir o efetivo aprisionamento das NCs, além de apresentar uma matriz homogênea, sem a presença de

poros, fissuras superficiais e canalículos internos, que poderiam facilitar a liberação prematura das NCs. Essa partícula também apresentou baixa taxa de absorção de meio ácido e baixa degradação por enzimas presentes nas porções superiores do TGI.

Como contrapartida, selecionou-se também a partícula GPCa, considerando seu reduzido diâmetro e matriz homogênea com a presença de alguns poros e fissuras superficiais e internas. Além disso, essa amostra apresentou comportamento oposto a GACa, com elevada capacidade de absorção de líquidos e elevado grau de intumescimento em tampão fosfato (pH 6,8). A porcentagem de degradação enzimática da GPCa foi intermediária, com valores próximos de 60% em ambos os meios e conteúdos enzimáticos. A diferença na capacidade mucoadesiva entre as partículas GACa e GPCa foi outro importante atributo selecionado para análise comparativa, o qual poderá influenciar significativamente os comportamentos biológicos que serão estudados em etapas futuras desse trabalho.

5.7. Desenvolvimento das nanocápsulas (NCs)

5.7.1. Seleção dos solventes para solubilização da CPT

A CPT apresenta log P de 1,74, um valor de coeficiente de partição octanol/água que indica solubilidade limitada em solventes aquosos e oleosos.

Em valores de pH alcalino (pH>9,0) o anel α -hidroxilactona da CPT é facilmente convertido em carboxilato, aumentando sua solubilidade em água, porém reduzindo sua efetividade terapêutica (THOMAS; RAHIER; HECHT, 2004).

Considerando o desenvolvimento de uma nanoemulsão como precursora das NCs e a instabilidade e insolubilidade da CPT, a seleção dos solventes adequados foi uma etapa crítica para alcançar a efetiva compartimentalização da CPT. Além da capacidade de solubilizar o fármaco, a seleção da fase dispersante deve incluir a avaliação de critérios como a ausência de toxicidade e baixo risco de degradação (COUVREUR et al., 2012).

Nessa etapa do trabalho, a partir de uma análise macroscópica, foi feita uma avaliação preliminar da capacidade de solventes de diferentes polaridades solubilizarem a CPT. Os solventes foram selecionados com base em seus valores de constante dielétrica, a qual mensura o momento dipolar das moléculas e, quanto maior é seu valor, maior é a polaridade do solvente (GREMIÃO; DE CASTRO, 1999). As observações do aspecto macroscópico das preparações estão apresentadas na Tabela 14.

Após esse teste, observou-se que nenhum dos solventes avaliados promoveu a total solubilização de 2 mg de CPT, observando-se dispersões de aspecto turvo ou ligeiramente

turvo. Considerando que nos solventes diclorometano e acetona ocorreu a dissolução parcial da CPT, buscou-se explorar um sistema solvente com constante dielétrica superior à 9,1 e inferior à 20,6.

Tabela 14. Aspecto macroscópico das preparações contendo 2 mg.ml⁻¹ da CPT em diferentes solventes e suas respectivas constantes dielétricas (siglas: L- límpido, LT-ligeiramente turvo e T:turvo).

Solvente	Aspecto visual	Constante dielétrica (ε)
Água	T	78,9
Metanol	T	33,4
Etanol	T	24,6
Acetona	LT	20,6
Diclorometano	LT	9,1

Em trabalho realizado por Cortesi e colaboradores (1997), a solubilização de cerca de 5 mg.mL⁻¹ da CPT foi possível a partir da mistura clorofórmio/metanol (2:1, v/v) (CORTESI et al., 1997). Considerando as proporções e constantes dielétricas de 4,8 e 33,6, para o clorofórmio e metanol, respectivamente, calculou-se a constante dielétrica do sistema solvente proposto por este autor a partir da Equação 10:

$$\epsilon_s = \frac{(\%a \times \epsilon_a) + (\%b \times \epsilon_b)}{100} \quad \text{Eq. 10}$$

Em que ϵ_s = constante dielétrica do sistema solvente, $\%a$ e $\%b$ = porcentagem do solvente a e b, respectivamente e ϵ_a e ϵ_b = constantes dielétricas do solvente a e b, respectivamente.

Como ϵ_s , encontrou-se valor próximo a 14. A partir desse resultado, considerando a metodologia sugerida no item 4.2.6.2, selecionou-se os solventes diclorometano, imiscível em água e de baixo valor de constante dielétrica e, etanol, miscível no diclorometano, para compor o sistema. Para tanto, com base na Equação 9 foram utilizados 69,2% de diclorometano e 30,8% de etanol, a fim de se compor um sistema solvente com a constante dielétrica pretendida.

Com este sistema solvente foi possível incorporar 2 mg.ml⁻¹ de CPT, obtendo-se uma solução límpida e transparente.

5.7.2. Desenvolvimento das nanoemulsões

Com o objetivo de compartimentalizar a CPT em nanoestruturas e, após a determinação da mistura solvente capaz de solubilizar 2 mg.ml⁻¹ de CPT, a técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente foi selecionada.

Um dos desafios da técnica foi a obtenção de um sistema emulsionado com gotículas com dimensões nanométricas e estável. Na nanoemulsão, a fase dispersa (interna) é formada por gotículas de estrutura nanométrica (normalmente entre 20 e 500 nm), as quais devido à reduzida dimensão apresentam maior estabilidade em relação a separação gravitacional e coalescência, se comparadas às macrogotículas.

Esse método envolve inicialmente a preparação de uma emulsão do tipo O/A. Para isso, é necessário preparar uma fase orgânica, constituída por um solvente orgânico apolar, no qual o fármaco seria dissolvido. Em alguns casos, a adição de polímeros se dá nessa fase orgânica. Após, realiza-se o preparo da fase aquosa, a qual deve conter um tensoativo do tipo O/A e ambas as fases são submetidas à emulsificação, por agitação e exposição a uma fonte de energia elevada, como, por exemplo, ultrassom ou a homogeneização por alta pressão. Essa etapa de agitação da emulsão é determinante para a obtenção de gotículas nanométricas. Depois da obtenção da nanoemulsão, realiza-se a evaporação do solvente residual como forma de eliminação ou para deposição superficial de polímero, quando esse é adicionado à fase orgânica.

Sistemas de fase interna lipofílica tendem a ter capacidade de encapsular elevadas porcentagens de fármacos como a CPT (GUPTA et al., 2016; LOVELYN; ATTAMA, 2011). Dessa forma, a adição de ácidos graxos à fase interna da nanoemulsão é uma forma de aumentar a afinidade do fármaco, reduzindo de forma mais eficiente sua difusão para o meio aquoso (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A estrutura e concentração dos tensoativos utilizados na composição da nanoemulsão também são fundamentais, uma vez que devem ser suficientes para diminuir a tensão superficial, formando um filme na interface da gotícula (GUPTA et al., 2016).

Na composição das nanoemulsões desse trabalho, a fase orgânica foi formada pela mistura de diclorometano:etanol (D:E), Labrafac™ e o emulsificante lecitina de soja.

O Labrafac™ utilizado neste estudo é composto por triglicerídeos de ácido caprílico e cáprico, comumente empregado como veículo em formulações parenterais. Sua presença na composição do núcleo deve favorecer a retenção da CPT, mesmo após a evaporação dos solventes. A lecitina de soja (L) foi utilizada com o objetivo de auxiliar o processo de emulsificação e conferir densidade de carga negativa à superfície das gotículas, para tanto a

porcentagem de ácidos graxos presente em sua composição foi de ~50%. Esta característica da lecitina foi importante para o posterior revestimento com a QS. A L é um emulsificante natural, composto por uma mistura de fosfolipídios como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e uma mistura de ácidos graxos; como o palmítico, esteárico e ácido oleico. Apresenta caráter anfifílico, sendo a porção hidrofóbica formada por duas cadeias carbônicas longas e a polar representada pelo grupamento fosfato ligado a uma colina ou etanolamina (Figura 25). A quantidade dos ácidos graxos que compõe a L influencia diretamente a densidade da carga negativa do material em solução, sendo que lecitinas com maior teor de ácidos graxos apresentam maior densidade de carga negativa, devido a ionização dos grupamentos carboxílicos (HAAS et al., 2014).

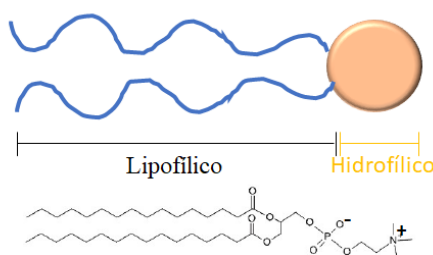


Figura 25. Estrutura molecular do fosfolipídio.

Diversos estudos relatam sucesso na obtenção de nanoemulsões utilizando L e sua combinação com outros tensoativos em baixas concentrações (DONSÌ et al., 2012; PREGO et al., 2006; PREGO; TORRES; ALONSO, 2006; SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014; YUCEL; ELIAS; COUPLAND, 2013).

Para compor a fase aquosa da nanoemulsão, inicialmente selecionou-se água acidificada e o tensoativo não iônico polissorbato 80, derivado do sorbitano polietoxilado e ácido oleico que apresenta hidrofília, devido a presença de poliéteres em sua cadeia (DAMICO et al., 2017).

A associação de fosfolipídios com polissorbatos, como o polissorbato 80, têm se mostrado promissora por levar a formação de filmes interfaciais mistos compactos, conferindo elevada estabilidade às formulações (DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017; DEDAKIA et al., 2010; PRABHAKAR et al., 2013; SEDAGHAT DOOST et al., 2018).

Nesta etapa do trabalho, as nanoemulsões obtidas foram denominadas como F1, F2, F3 e F4, de acordo com a porcentagem de tensoativo na fase aquosa (Tabela 15).

Tabela 15. Nomenclatura das NEs conforme o conteúdo de polissorbato 80.

Amostras	% de polissorbato 80
F1	1,5
F2	2,5
F3	3,5
F4	4,5

A utilização do polissorbato 80 nas porcentagens 1,5, 2,5 e 3,5%, resultou em formulações macroscopicamente homogêneas, de aparência branca leitosa, característica de sistemas emulsionados com diâmetro de gotícula superiores a 100 nm (Figura 26).

**Figura 26.** Aspecto macroscópico das NEs desenvolvidos a partir da metodologia e composição propostas.

Não foi possível obter o sistema com a maior concentração de tensoativo (F4) devido a intensa formação de espuma durante o processo de sonicação.

5.7.2.1. Avaliação do diâmetro médio, PDI e potencial zeta dos núcleos

Após a obtenção, as nanoemulsões foram analisadas quanto ao diâmetro, PDI e potencial zeta, os resultados estão apresentados na Tabela 16. A partir dos valores, é possível afirmar que as gotículas desenvolvidas apresentam dimensão nanométrica, com valores de diâmetro médio entre 111,3 e 160,4 nm. A amostra F1, com a menor concentração de polissorbato 80 (1,5 %) apresentou maior diâmetro médio ($p < 0,05$).

Tabela 16. Diâmetro (nm), PDI e potencial zeta (mV) das nanoemulsões (média $\pm$ DP).

Amostra	Diâmetro $\pm$ DP	PDI	Potencial zeta $\pm$ DP
F1	160,4 $\pm$ 6,6	0,13	-33,6 $\pm$ 1,6
F2	140,6 $\pm$ 8,6	0,15	-23,6 $\pm$ 2,3
F3	111,3 $\pm$ 3,8	0,21	-20,0 $\pm$ 1,3
F4	-	-	-

O valor de PDI variou de 0,13 a 0,21, valores inferiores à 0,5, demonstrando a homogeneidade na distribuição de tamanho das gotículas (AVADI et al., 2010; GAUMET et al., 2008). Dentre as nanoemulsões, a F1 apesar do maior tamanho médio, apresentou menor PDI.

Todas as nanoemulsões apresentaram carga superficial negativa, na faixa de -20,0 a -33,6 mV (Tabela 16), conferida principalmente pela ionização dos ácidos graxos da L, indicando sua deposição na interface da gotícula. A formação de gotículas com carga negativa é desejável considerando que deve proporcionar uma efetiva repulsão eletrostática entre as gotículas, favorecendo a estabilidade do sistema, bem como a complexação com a QS, na etapa posterior de desenvolvimento das NCs (revestimento dos núcleos com QS).

O polissorbato 80, juntamente com os ácidos graxos e fosfolipídios da L, compoem o filme interfacial depositado na superfície da gotícula (Figura 27).

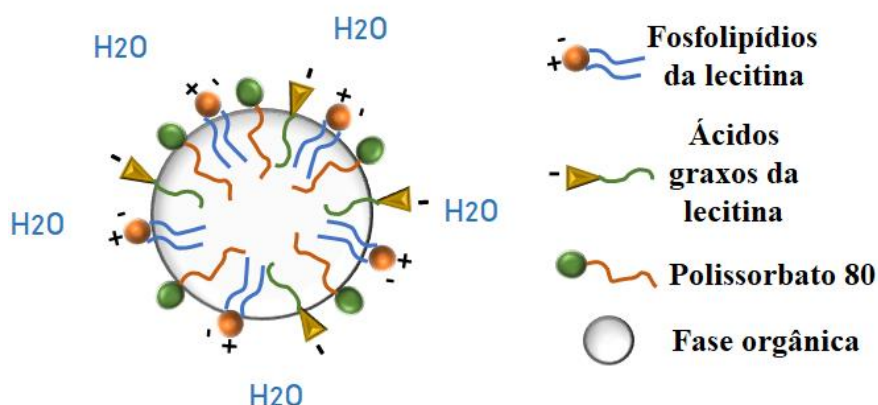


Figura 27. Representação esquemática da estrutura dos NEs.

Consequentemente, a modificação da concentração do tensoativo e deve influenciar a composição e estrutura desse filme. Nesse sentido, o aumento da concentração polissorbato 80 pode favorecer a formação de um maior número de gotículas com menor diâmetro e menor densidade de carga negativa (Tabela 16).

5.7.2.2. Análise da estabilidade física das NEs

O processo de desestabilização de sistemas emulsionados ocorre em três etapas principais: floculação, quando as forças repulsivas são inferiores às atrativas, gerando a aproximação das gotículas; a cremagem, a partir da união e migração dos agregados de gotículas para a superfície e, a coalescência em que ocorre a separação irreversível das fases do sistema, devido à ruptura total do filme interfacial (BRUXEL et al., 2012).

Problemas de estabilidade das preparações emulsionadas podem, algumas vezes, ser evidenciados logo após o seu preparo; no entanto, considerando que diversos fatores podem alterar a estrutura ao longo do tempo, modificando características como o potencial zeta ou a rigidez e organização do filme interfacial, o estudo de estabilidade deve ser realizado um período após a obtenção dos sistemas (BRUXEL et al., 2012; SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014).

Nesse estudo, a estabilidade da emulsão foi avaliada após 30 dias de armazenamento, sob refrigeração ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), com a medição do diâmetro, PDI e potencial zeta (Tabela 17). Além disso, as amostras foram submetidas a centrifugação e o aspecto visual foi avaliado.

Tabela 17. Diâmetro (nm), PDI e potencial zeta (mV) das nanoemulsões após 30 dias de armazenamento (média $\pm$ DP).

Amostras	Diâmetro $\pm$ DP	PDI	Potencial zeta $\pm$ DP
F1	171,2 $\pm$ 6,8	0,14	-35,0 $\pm$ 3,9
F2	134,9 $\pm$ 4,2	0,17	-21,3 $\pm$ 2,0
F3	129,1 $\pm$ 20,1	0,20	-27,6 $\pm$ 7,0

Macroscopicamente, as três formulações não apresentaram separação de fase, antes e após a centrifugação. Em relação ao diâmetro, apenas a amostra F1 apresentou um aumento estatisticamente significativo no diâmetro médio ($p < 0,05$), de aproximadamente 11 nm, no entanto, não houve aumento significativo do seu valor de PDI. Com relação ao potencial zeta, não houve variação estatisticamente significativa dos valores após o armazenamento ($p > 0,05$). O conjunto de resultados permite concluir que a estabilidade das emulsões foi mantida após 30 dias. Após o armazenamento, para todas as amostras houve a manutenção dos diâmetros < 200 nm, elevado potencial zeta negativo e baixo valor de PDI. Dessa forma, as nanoemulsões F1 e F2, com menores concentrações de tensoativos, foram selecionadas para a etapa posterior de revestimento.

5.7.3. Revestimento das nanoemulsões para a formação das nanocápsulas (NCs)

A primeira etapa de funcionalização foi realizada com a QS de elevado grau de desacetilação ($\sim 90\%$) e baixa massa molecular, a partir de duas metodologias.

A metodologia “I” foi baseada nos estudos de Sonvico et. al. (2006) e Haas et. al. (2013), em que um revestimento foi formado simultaneamente ao processo de emulsificação.

As NCs obtidas por meio da metodologia “I” foram denominadas de acordo com a sua composição com o prefixo F1 ou F2 (referente a composição do núcleo, Tabela 14), seguida da concentração da dispersão de QS utilizada (0,5; 1 ou 1,5) (exemplo F1_0,5).

Macroscopicamente, após 24 horas da obtenção, as formulações não apresentaram separação de fase e o aspecto leitoso foi mantido.

Para essas NCs, o diâmetro, PDI e potencial zeta foram avaliados, e os resultados estão apresentados na Figura 28. As NCs apresentaram valores de diâmetro médio entre 175 e 536 nm, PDI na faixa de 0,20 a 0,54 e potencial zeta entre +0,1 e +23,2 mV (Figura 28).

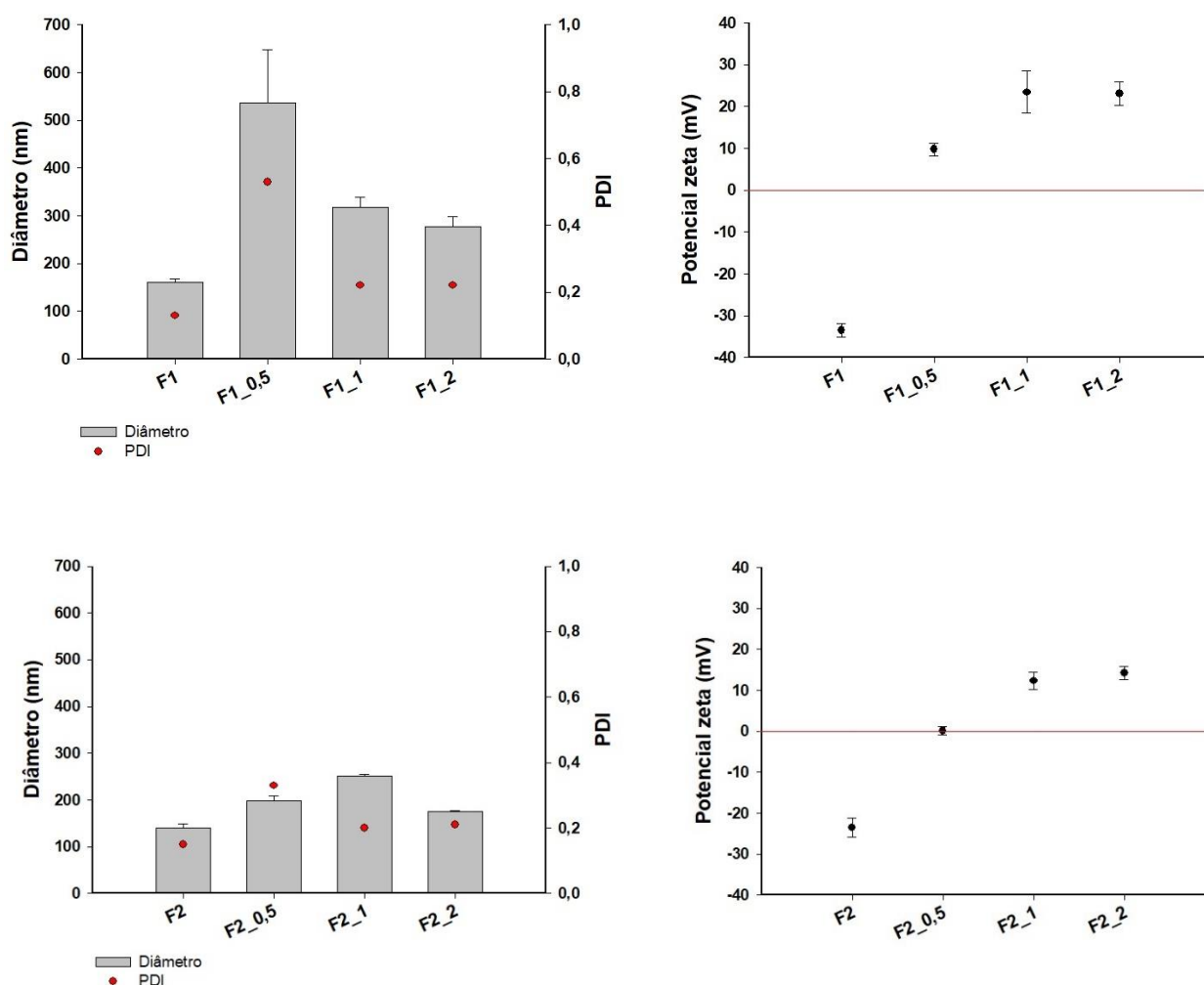


Figura 28. Diâmetro, PDI e potencial zeta das nanoemulsões F1 e F2 revestidas com QS pela metodologia “I”.

Em todas as amostras, principalmente para as obtidas a partir da nanoemulsão F1, a adição de QS resultou no aumento significativo do diâmetro, entre 120 a 530 nm, ($p < 0,05$). A

adição de QS também resultou na inversão do potencial zeta para valores positivos, superiores à +10 mV.

A utilização de concentrações crescentes de QS, de 0,5 para 1,0 mg.mL⁻¹, resultou em aumento do valor de potencial zeta positivo da NCs. Entre as concentrações de QS de 1,0 a 2,0 mg.mL⁻¹, não houve modificação significativa do potencial zeta, que se manteve na faixa de +15 a +18 mV ($p>0,05$).

Em relação à quantidade inicial de tensoativo na nanoemulsão, as partículas obtidas a partir de F1 (menor concentração de polissorbato 80), apresentaram os maiores aumentos de tamanho, principalmente com a adição de QS na concentração de 0,5mg/ml. O aumento da concentração de QS utilizada no revestimento, promoveu diminuição do tamanho médio, bem como, maior densidade de carga positiva (+9,8 a +23,4 mV) ($p<0,05$).

Apesar dos valores na escala nanométrica, distribuição de tamanho unimodal e PDI abaixo de 0,5, ao se analisar os gráficos de distribuição de potencial zeta, observou-se duas populações de partículas com diferentes médias de carga de superfície, predominando partículas de potencial zeta próximo a neutralidade (Figura 29).

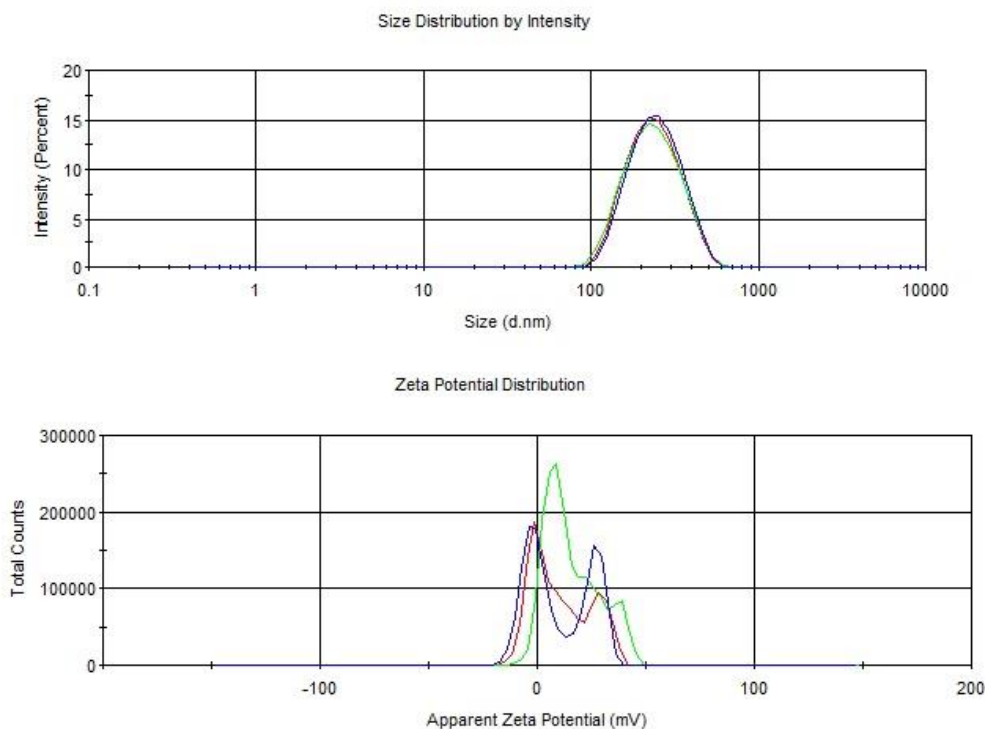


Figura 29. Distribuição de tamanho e potencial zeta da amostra F1_1 (perfil semelhante foi observado para as demais partículas).

A sonicação é um processo de aplicação de energia para agitar de forma vigorosa moléculas ou partículas em um líquido. Essa agitação utiliza a energia das ondas sonoras, fornecendo uma energia muito elevada ao sistema e resultando na formação de partículas nanométricas. No entanto, essa mesma energia pode também causar a quebra de polímeros, como a QS, resultando na formação de frações de diferentes massas moleculares (SAVITRI et al., 2014). Dessa forma, a utilização da metodologia “I” pode ter gerado essas frações de QS que interagiram de diferentes formas com os componentes da formulação. Outra possibilidade é a formação de micelas entre a L e o polissorbato 80, originando na mesma formulação partículas de composição e carga superficial diferentes.

Após a avaliação dos resultados da metodologia “I”, realizou-se a formação do revestimento com QS por outra metodologia.

A metodologia “II”, baseou-se nos trabalhos de Alonso et. al. (2006) e Park et. al. (2016), em que se utilizou diferentes concentrações e razões de massa de L:QS, para formar o revestimento. A denominação dessas amostras seguiu o prefixo anteriormente citado de F1 ou F2, seguido do valor de razão de massa entre L:QS e do sufixo 0,5; 1 ou 2, que representa a concentração inicial de QS utilizada (exemplo: F1_3,6_1 em que tem-se o núcleo F1 (1,5% de tensoativo) revestido com QS a 1 mg.mL^{-1} , resultando na razão de massa L:QS final de 3,6:1). Essas amostras também apresentaram aspecto leitoso, no entanto, após 24 horas algumas apresentaram separação de fases, sendo excluídas da etapa de caracterização.

Para as amostras em que a funcionalização foi realizada após a formação das nanoemulsões, ou seja, metodologia “II”, os resultados de diâmetro, PDI e potencial zeta estão apresentados na Figura 30.

A faixa de diâmetro observada para essas NCs, foi de 173 a 3822 nm e PDI entre 0,21 e 1,0. Para a maioria das amostras não houve modificação significativa no tamanho com a adição de maiores concentrações e proporções de QS ($p > 0,05$) (Figura 30). O comportamento observado pode estar relacionado à capacidade de organização das moléculas de QS ao interagirem com a gotícula, em que o maior número de moléculas associadas à superfície resulta em uma espécie de rearranjo conformacional e consequentemente na formação de camadas de revestimento com maior número de moléculas de QS, porém mais compactadas.

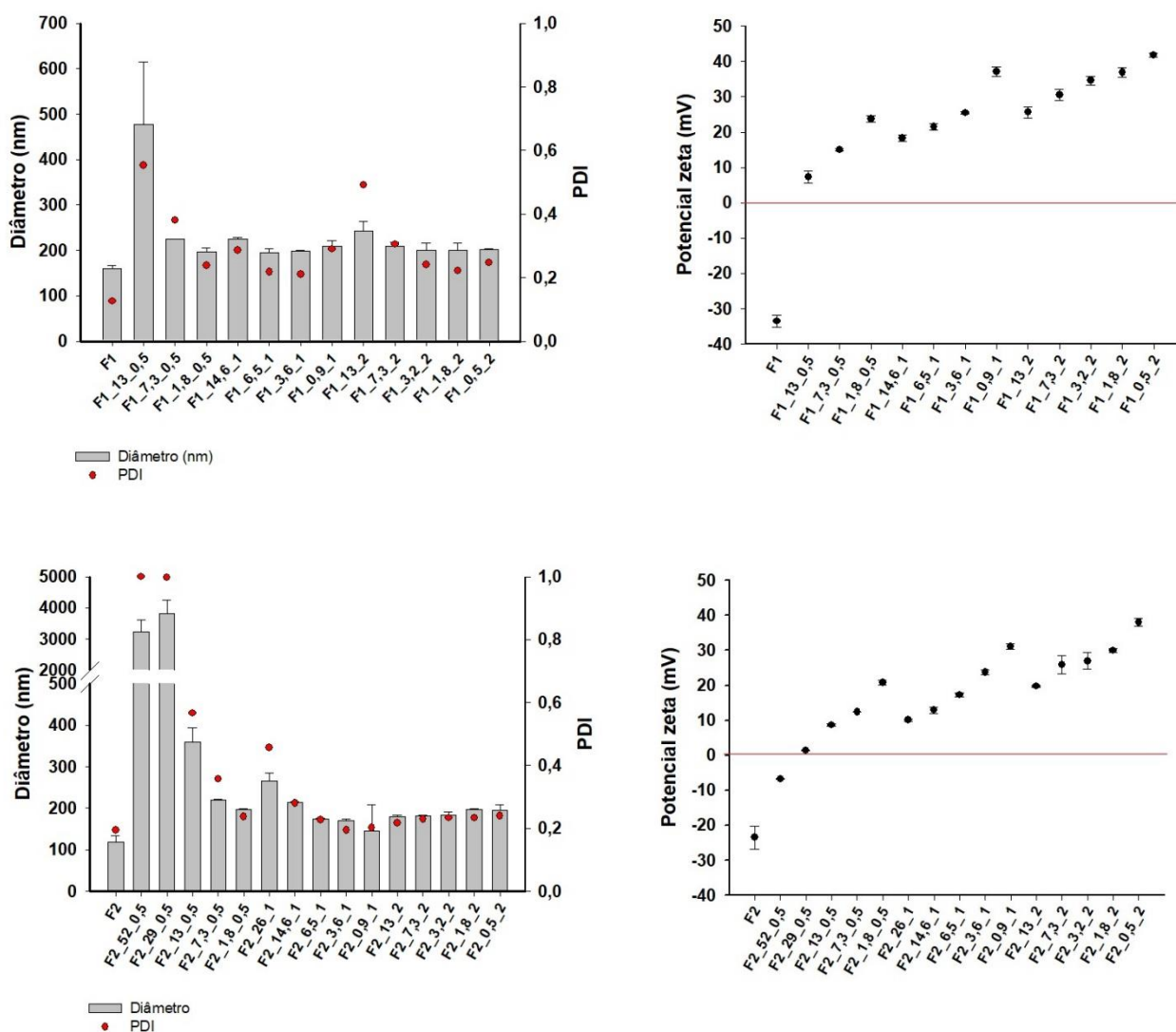


Figura 30. Diâmetro, PDI e potencial zeta das amostras revestidas com QS pela metodologia “II”.

Comportamento semelhante foi observado por Liu e co-autores (2016), os quais testaram o revestimento, utilizando QS de elevado grau de desacetilação, em núcleos de lecitina contendo insulina e observaram que em razões entre 10:1 e 40:1 (L:QS) não houve variação significativa no diâmetro médio das partículas, que se mantinham em torno de 180 nm (LIU et al., 2016). Da mesma forma, Hafner e co-autores (2009) ao desenvolverem nanopartículas de lecitina e QS, para a incorporação de melatonina, observaram que nas proporções lecitina:QS de 10:1 e 20:1 as nanopartículas se mantinham com aproximadamente 120 nm (HAFNER et al., 2009).

Para as amostras F1_13_0,5, F2_52_0,5, F2_29_0,5 e F2_13_0,5, obtidas a partir dos núcleos F1 e F2 (1,5 % e 2,5% de polissorbato 80, respectivamente), com a menor concentração

de QS ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e maiores razões entre L:QS (13:1, 52:1 e 29:1), observou-se aumento significativo do tamanho das partículas, alcançando valores entre 650 e 4000 nm (Figura 30).

Diferentemente das demais partículas, que apresentaram potencial zeta positivo ($> +10 \text{ mV}$), essas amostras apresentaram cargas de superfície muito próximas a zero (entre $-6,3 \text{ mV}$ e $+7,2 \text{ mV}$) (Figura 30 e 31). Provavelmente nessa concentração ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de QS) e faixa de razão (13 a 52:1), a quantidade de QS disponível não foi suficiente para revestir toda a superfície da gotícula pré-formada, ou seja, as amins protonadas das moléculas de QS foram capazes apenas de neutralizar parcialmente os carboxilatos de superfície, presentes pela composição de ácidos graxos na interface da gotícula.

Simultaneamente à essa redução de potencial zeta, deve ter ocorrido a aglomeração das partículas, principalmente devido à perda de estabilidade eletrostática, resultando na formação de partículas grandes e heterogêneas quanto à distribuição de tamanho, como demonstrado na Figura 31, e quantitativamente representado pelo elevado valor de PDI (de 0,6 a 1,0) (HAFNER et al., 2009; SONVICO et al., 2006).

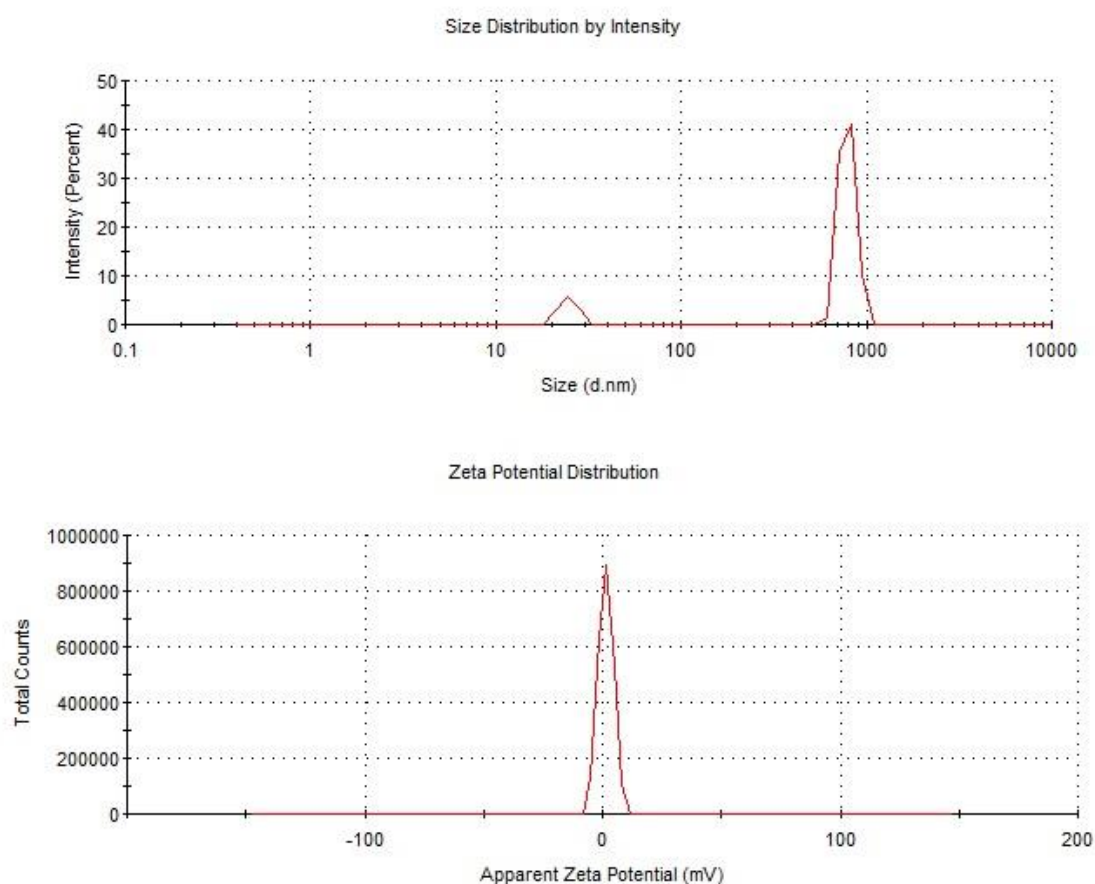


Figura 31. Gráfico de distribuição de tamanho e potencial zeta da F2_13_0,5.

Para as outras NCs obtidas por meio da metodologia “II”, a diminuição da razão de massa entre L:QS resultou no aumento discreto do potencial zeta positivo, principalmente nas partículas em que a razão L:QS era de 14,6 a 1,8:1. Esse comportamento pode indicar que com a adição da QS ocorre o deslocamento de algumas moléculas de polissorbato 80 e fosfatidilcolina da interface das gotículas, os quais simultaneamente se rearranjam, formando uma espécie de corona de carga neutra ao redor das NCs formadas. A formação dessa corona pode “mascarar” o resultado de potencial zeta.

O conjunto de dados obtidos podem indicar que a modificação de superfície utilizando QS é predominantemente dirigida por interações eletrostáticas.

De forma complementar aos resultados obtidos, analisou-se os gráficos de distribuição de tamanho e potencial zeta dessas NCs (Figura 32), com características promissoras, obtidas a partir da metodologia “II” (revestimento da nanoemulsão pré-formada). Nesta figura é possível observar distribuição de tamanho unimodal, bem como uma única população de partículas com potencial zeta positivo.

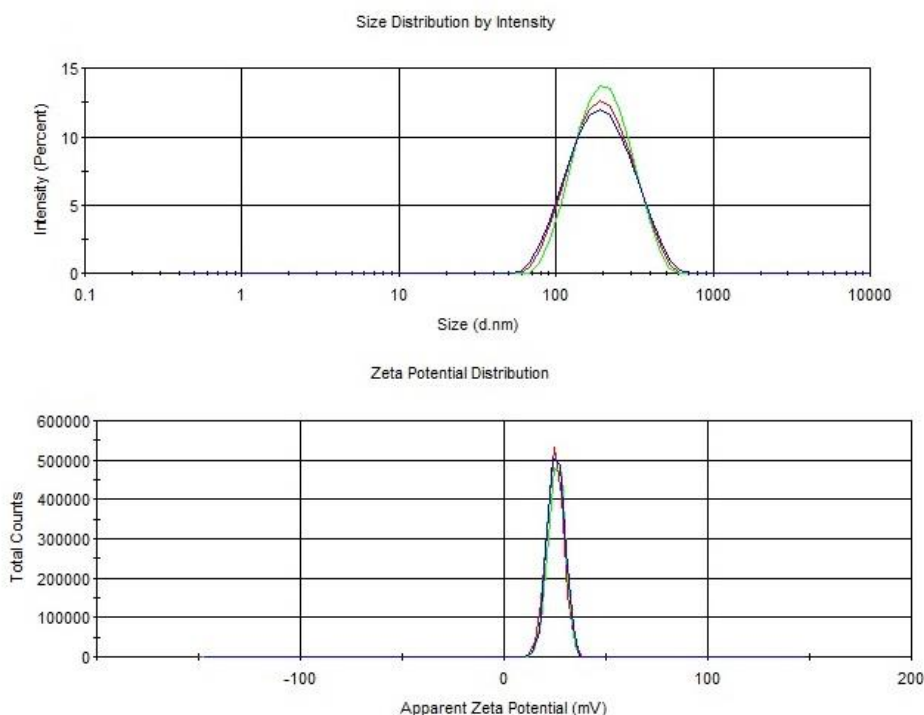


Figura 32. Gráfico de distribuição de tamanho e potencial zeta da amostra F2_3,6_1.

Apesar da metodologia “I” ser relativamente mais simples, a funcionalização simultânea ao processo de emulsificação foi excluída das etapas seguintes do estudo, considerando que nesse processo houve a formação de partículas com ampla faixa de distribuição de potencial

zeta, o que pode resultar em partículas heterogêneas e também na instabilidade física do sistema.

Entre as amostras funcionalizadas empregando a metodologia “II”, a F1_3,6_1; F2_3,6_1; F1_1,8_2 e F2_1,8_2 foram selecionadas, devido a seus atributos favoráveis como diâmetro próximo a 200 nm), baixo PDI ($\sim 0,2$) e potencial zeta positivo (na faixa de +25 mV).

Após essa etapa, seguindo com a formação das NCs, realizou-se a segunda etapa de revestimento, com o poliânion ácido hialurônico (AH), baseando-se na teoria da atração eletrostática e interações supramoleculares entre o polímero negativo com a superfície da nanocápsula carregada positivamente, devido a presença de QS da primeira camada de revestimento.

As formulações que nesta etapa apresentaram separação de fase após 24 horas foram descartadas da etapa de caracterização.

As NCs revestidas com os polímeros QS+AH, de aparência homogênea foram avaliadas e os dados obtidos estão apresentados na Figura 33.

Com a adição do polímero aniônico (AH) foi possível observar dois comportamentos, sendo a razão L:QS e a concentração da dispersão de QS, utilizada na primeira fase de revestimento, os fatores que influenciaram de forma significativa esse comportamento (Figura 33).

Para as F1_3,6_1 e F2_3,6_1, com o aumento da quantidade de AH (razões de 0,25 a 1:1) houve uma discreta redução do potencial zeta, acompanhada do aumento significativo do diâmetro e PDI, de 200 nm para 370 nm e 0,20 para 0,50 e, 170 nm para 300 nm e 0,20 para 0,45, respectivamente.

Com o aumento da quantidade de AH, na razão de massa de 2:1 (AH:QS), houve a inversão completa de carga das NCs, para valores de aproximadamente -30 mV, acompanhada de uma redução de ± 50 nm no diâmetro médio, bem como, no PDI, para valores próximos aos iniciais de 0,30. Esse comportamento indica que houveram modificações estruturais com a incorporação do AH, o que, de maneira indireta, indica o sucesso do processo.

Kalam (2016), em trabalho com nanopartículas de QS, relatou comportamento semelhante com o revestimento utilizando AH. O aumento de 50 a 150 nm no diâmetro médio das partículas foi observado com a adição do poliânion, assim como a inversão completa de carga, que passou de cerca de +32,5 mV para -33,7 mV (KALAM, 2016).

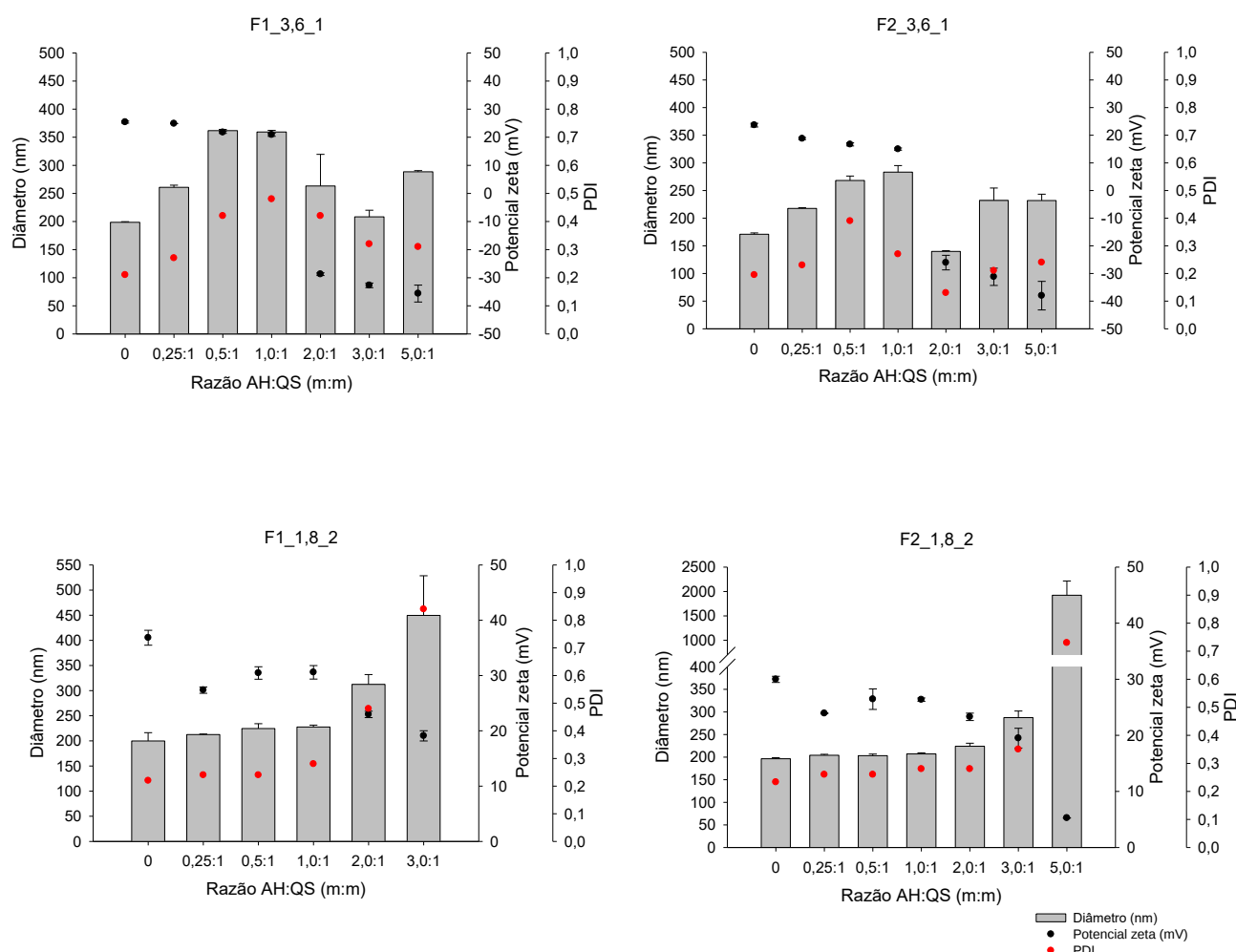


Figura 33. Gráficos de diâmetro, PDI e potencial zeta das partículas revestidas com AH.

Comportamento diferente foi observado para as F1_1,8_2 e F2_1,8_2 (menor razão L:QS e nas quais utilizou-se QS mais concentrada 2 mg.mL⁻¹). Nestas amostras, o aumento da concentração de AH, até as razões 3:1 e 5:1, não promoveu a inversão de potencial zeta. A adição de AH até a razão 1:1 também não resultou no aumento significativo de diâmetro e PDI, que se mantiveram na faixa de ± 225 nm e 0,30, respectivamente (Figura 33). Nas máximas razões de AH:QS (3 e 5:1), observou-se para a F1_1,8_2 e F2_1,8_2, alteração significativa ($p < 0,05$) do diâmetro para valores entre 550 a 2000 nm, do PDI para valores entre 0,75 e 0,90 e do potencial zeta para +20 e +5 mV, respectivamente.

A construção de revestimento multicamadas em nanoemulsões, é o resultado de um equilíbrio complexo de interações polieletrólito - polieletrólito, polieletrólito - solvente e polieletrólito - superfície da gotícula, as quais envolvem fatores eletrostáticos e entrópicos (GUZMÁN et al., 2017; NAYEF; CASTIELLO; TABRIZIAN, 2017).

Em revestimentos compostos por moléculas ionicamente carregadas, de elevada massa molecular, como polímeros, a inversão de carga ocorre após a deposição de ao menos duas camadas consecutivas na superfície da partícula. Isso significa que a deposição do polímero carregado não ocorre apenas até a neutralização de carga da superfície da partícula, mas ela continua ocorrendo até que um certo grau de carga oposta apareça na superfície, levando à uma sobrecompensação da carga das camadas anteriores (GUZMÁN et al., 2017; SOLANKI et al., 2019). Portanto, a quantidade de poliânion (AH) no meio deve ser suficiente para neutralizar toda a superfície da partícula e continuar, em maior extensão, para a formação de ao menos mais uma camada. Apenas dessa forma a inversão da carga superficial é alcançada.

Sendo assim, a resistência à inversão de carga das amostras F1_1,8_2 e F2_1,8_2, mesmo com a adição das maiores razões de poliânion, podem ser atribuídos à insuficiência de moléculas de AH para neutralizar a carga de superfície positiva da partícula revestida com a maior quantidade e concentração de QS (2 mg.ml⁻¹).

Com base nos resultados apresentados, a adição da mistura de AH e do derivado de celulose (HP) foi realizada apenas para as amostras F1_3,6_1 e F2_3,6_1, nas razões de 3,0:1 e 5,0:1, nas quais a inversão total de carga foi observada, provavelmente proveniente da formação de mais de uma camada de revestimento com o poliânion.

Para essas amostras com múltiplas camadas de revestimento, adicionou-se à nomenclatura já descrita o sufixo 3 ou 5, referente a razão de massa de AH (a) ou AH+HP (p), considerando fixa em 1 a razão de QS (Exemplo: F1_3,6_1a3, se refere a amostra F1_3,6_1 revestida com a razão AH:QS de 3,0:1). Essas NCs foram analisadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18. A formulação F1_3,6_1p3 não foi analisada porque apresentou separação de fase 24 horas após a obtenção.

Tabela 18. Características das partículas revestidas com AH ou AH e HP.

Polímero de revestimento	Amostras	Diâmetro ±DP	Potencial zeta ±DP	PDI
AH	F1_3,6_1a3	208,4 ±11,7	-32,7±0,82	0,32
	F1_3,6_1a5	288,5±2,2	-35,6±3,0	0,31
	F2_3,6_1a3	232,1±22,3	-31,2±3,12	0,21
	F2_3,6_1a5	231,9±11,6	-38,0±5,17	0,24
AH+HP	F1_3,6_1p3	-	-	-
	F1_3,6_1p5	265,5±17,2	-20,8±0,69	0,23
	F2_3,6_1p3	225,0±1,62	-15,3±0,6	0,23
	F2_3,6_1p5	193,8±5,8	-15,2±1,11	0,18

Como observado na Tabela 18, a adição de HP resultou em partículas de menor carga superficial ($p < 0,05$), comparadas às revestidas apenas com AH, com valores entre -20,8 e -15,2 mV em comparação à -38 e -31,2 mV, respectivamente.

O HP é um derivado da celulose, biodegradável, com pKa de aproximadamente 4,9, constituído por grupamentos hidroxila, que podem ser substituídos por éster metílico, éster 2-hidroxipropílico ou éster ftálico. De acordo com dados obtidos em estudo anterior (BONI et al., 2021), o HP utilizado não apresenta densidade de carga negativa elevada, mantendo-se em torno de -10 mV, no valor de pH 5,0. Diferentemente, o AH é um polissacarídeo aniônico, devido a ionização dos grupamentos carboxílicos das unidades de ácido- β -glicurônico (47% no AH utilizado nesse estudo). De acordo com o mesmo estudo anterior, a partir do valor de pH 3,5 a densidade de carga negativa do AH alcança a faixa de -30 a -35 mV. Dessa forma, a densidade de carga superficial das NCs deve estar diretamente relacionada à característica do material de funcionalização.

As amostras revestidas com ambos os polímeros (AH+HP) apresentaram diâmetros entre 194 e 265 nm e PDI de 0,18 a 0,23 (Tabela 18). O tipo de material de revestimento da segunda camada não influenciou de forma significativa o tamanho das NCs ($p > 0,05$).

De acordo com os achados do trabalho, um modelo estrutural das NCs desenvolvidas foi racionalizado e a representação esquemática está apresentada na Figura 34.

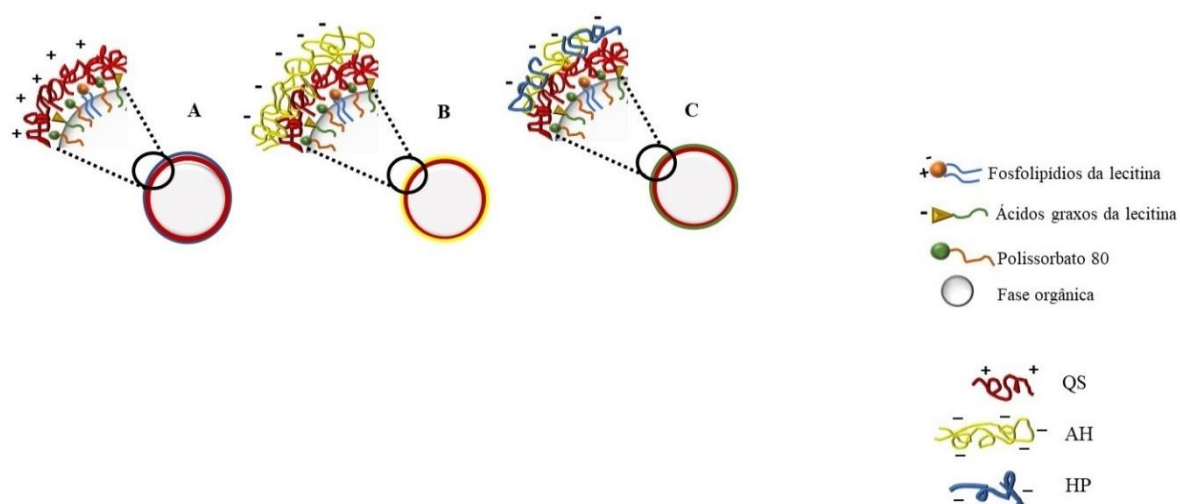


Figura 34. Representação esquemática das NCs revestidas com A: QS, B: QS+AH e C: QS+AH+HP.

Baseando-se na estabilidade macroscópica, bem como, nos resultados da Tabela 18, que indicam diâmetro abaixo de 250 nm, PDI menor que 0,25 e potencial zeta negativo, as amostras

F2_3,6_1a3 e F2_3,6_1p3 foram selecionadas para a avaliação da morfologia e incorporação do fármaco.

5.7.3.1. Morfologia das NCs

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que necessita do processo de secagem da amostra e não permite a utilização de corante para o contraste das estruturas, dessa forma, a visualização das estruturas não foi obtida de forma satisfatória por meio dessa técnica.

Contudo, a partir das imagens apresentadas na Figura 35, é possível observar a presença de estruturas esféricas nanométricas, característico das NCs, e a presença de agregados. Para as amostras contendo CPT, a microscopia eletrônica de transmissão com contraste negativo foi realizada, objetivando a melhor visualização da morfologia e estrutura.

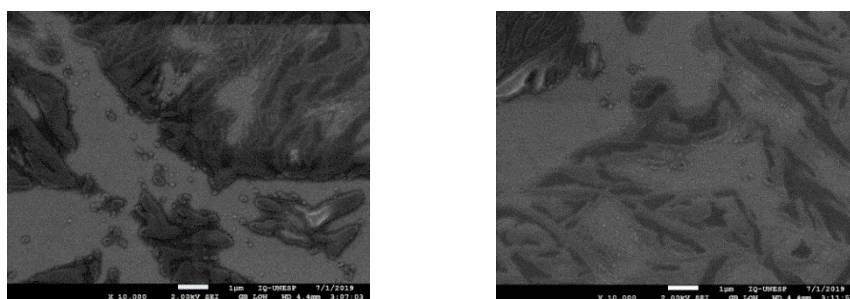


Figura 35. Fotomicrografias das amostras F2_3,6_1a3 e F2_3,6_1p3, aumento 10.000 vezes.

5.8. Nanocápsulas contendo CPT

A obtenção das NCs contendo CPT seguiu a metodologia descrita no item 4.2.6. Para as amostras contendo fármaco, a nomenclatura seguiu o descrito anteriormente, com a adição da letra “C”. As características das NCs após a incorporação da CPT estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Diâmetro, PDI, SPAN e potencial zeta das nanocápsulas contendo CPT.

Amostras	Zetasizer Nano-ZS			NanoSight NS300		
	Diâmetro (nm) $\pm$ DP	Potencial zeta (mV) $\pm$ DP	PDI	Diâmetro (nm)		
				médio $\pm$ DP	moda $\pm$ DP	SPAN
F2_3,6_1a3C	160,9 $\pm$ 4,82	-28,3 $\pm$ 0,47	0,21	221,1 $\pm$ 2,3	184,7 $\pm$ 5,2	0,59
F2_3,6_1p3C	170,3 $\pm$ 2,62	-17,8 $\pm$ 1,52	0,23	223,8 $\pm$ 1,4	216,4 $\pm$ 10,9	0,49

O diâmetro médio das NCs contendo CPT, mensurado pela técnica de espalhamento de luz, variou de 161 a 170 nm (Tabela 19), com distribuição de tamanhos unimodal (Figura 36).

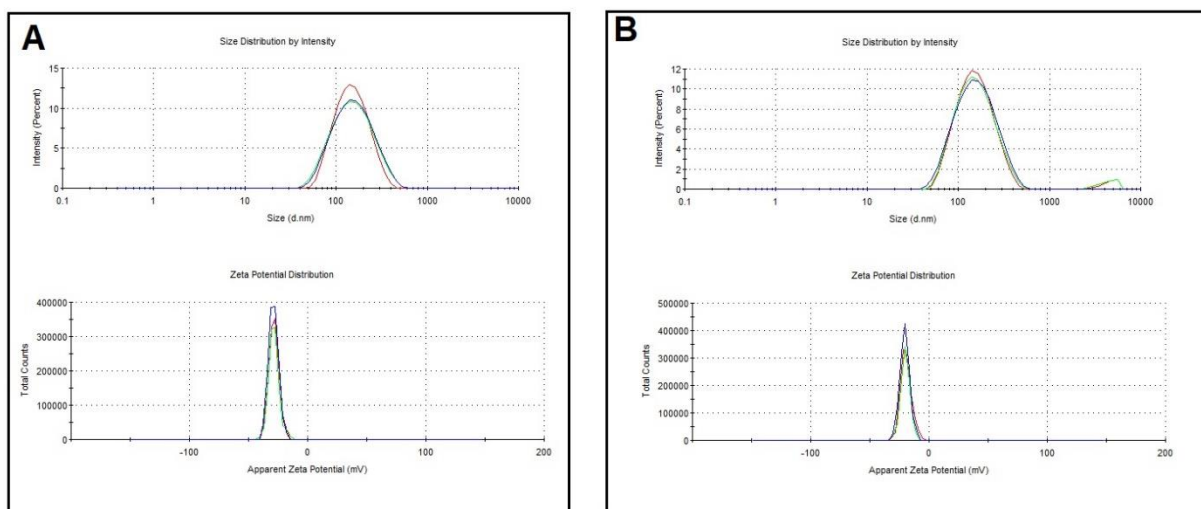


Figura 36. Distribuição de tamanho e potencial zeta das NCs revestidas com AH ou AH+HP.

Comparando-se com a análise das NCs sem adição do fármaco, houve uma redução de 72 e 55 nm, para as amostras revestidas com AH e AH+HP, respectivamente. A redução de diâmetro observada pode estar relacionada à interação entre o óleo do interior da partícula e a CPT, em que como resultado tem-se a redução do volume da gotícula. Outra possibilidade é a compactação da estrutura como resultado de uma atração entre os polímeros de revestimento e o fármaco disperso na gotícula.

O PDI das amostras manteve-se em torno de 0,23 indicam homogeneidade de distribuição de tamanhos, o que pode ser confirmado pelo perfil de distribuição unimodal apresentado na Figura 36. Para a partícula F2_3,6_1p3C é possível observar uma pequena cauda no perfil de distribuição (população menor que 3%), com tamanho superior a 1000 nm, indicativo de um processo de precipitação.

A adição de fármaco não influenciou de forma significativa o potencial zeta das NCs ($p > 0,05$), o qual permaneceu negativo, com valores de -17,8 e -28,3 mV para a F2_3,6_1p3C e F2_3,6_1a3C, respectivamente, com predomínio de apenas uma população de carga média negativa (Figura 36).

Ao se analisar os resultados obtidos por NTA, observou-se uma diferença em relação aos valores obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Tabela 19).

A técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) é utilizada para avaliar a distribuição de tamanho de nanopartículas em dispersão, de forma individual, utilizando as propriedades de espalhamento de luz, movimento browniano e a equação de Stokes–Einstein (BENDER et al., 2012). Por meio dessa técnica, os diâmetros médios das NCs F2_3,6_1a3C e

F2_3,6_1p3C foram de 221,1 e 223,8 nm, respectivamente e, a moda (representando os valores de tamanho que apareceram mais vezes) de 185 e 216 nm, respectivamente. A distribuição de tamanho com os correspondentes quadros de vídeo capturados durante a análise, estão apresentados da Figura 37.

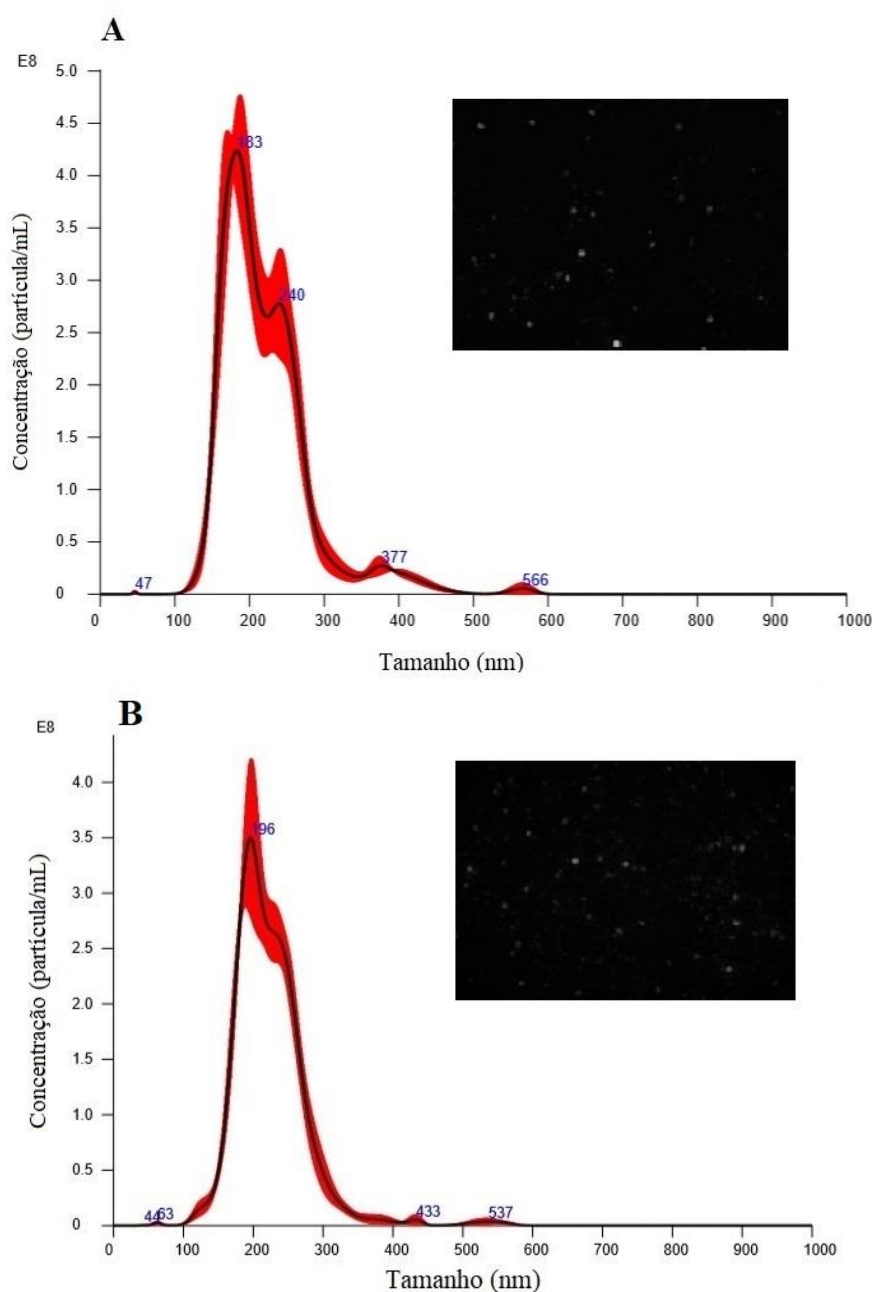


Figura 37. Distribuição de tamanho a partir de medições de NTA (A:F2_3,6_1a3C e B: F2_3,6_1p3C).

É possível observar uma estreita faixa de distribuição, com pequenas populações de diâmetros menores que 100 e maiores que 300 nm. O resultado está em concordância com os

resultados de DLS, nos quais os valores de PDI foram menores que 0,5, característica que também pode ser evidenciada pelos baixos valores de valor de span de 0,49 e 0,59 (Tabela 19). Os valores de diâmetro médio obtidos pela técnica de NTA foram aproximadamente 60 nm maiores do que os observados por DLS, contudo quando observamos a moda, os valores obtidos apresentam semelhança.

Diferentemente da técnica de DLS, o NTA realiza a medida de diâmetro em número, dessa forma, permitindo ainda, a estimativa das concentrações iniciais das NCs, as quais foram de $4,38 \times 10^8$ e $3,35 \times 10^8$ partículas/mL para as F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C, respectivamente.

Os valores próximos de concentração entre as duas formulações eram esperados, considerando que em ambas as amostras as mesmas razões de nanoemulsão/QTS e poliânions foram utilizadas.

5.8.1. Avaliação da forma das NCs

As partículas F2_3,6_1C, F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C, revestidas com QS, QS+AH ou QS+AH+HP, respectivamente, foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

A partir das fotomicrografias apresentadas, é possível sugerir que houve a formação de partículas esféricas, com a presença de um núcleo ou múltiplos núcleos de maior densidade eletrônica, em que provavelmente está localizado o fármaco (Figura 38). Pode-se observar também na Figura 38 camadas de estruturas circulares ao redor de toda superfície das NCs, principalmente das revestidas apenas com QS (Figura 38-A).

Como observado por Cé e co-autores (2016) com nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona e revestidas com QS, essas estruturas provavelmente são organizações micelares entre os surfactantes polissorbato 80 e a fosfatidilcolina da L, os quais foram deslocados da interface da nanoemulsão, com a adição dos polieletrólitos para o revestimento, se rearranjando e constituindo uma corona hidrofílica ao redor da partícula (CÉ et al., 2016).

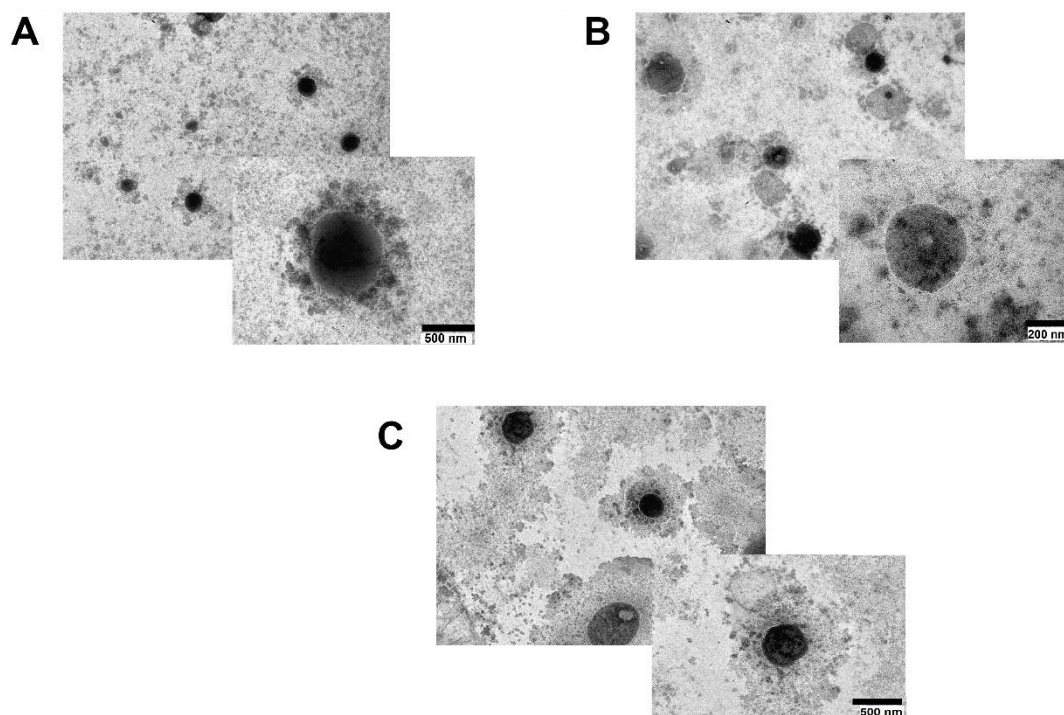


Figura 38. Fotomicrografias das NCs contendo CPT A: F2_3,6_1C; B: F2_3,6_1a3C e C: F2_3,6_1p3C.

5.8.2. Eficiência de encapsulação da CPT

A alta eficiência de encapsulação do fármaco é um atributo crítico do sistema desenvolvido, e a seleção da plataforma e técnica de obtenção são importantes para alcançar estes valores. Neste trabalho, a obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico resultou em uma elevada porcentagem de encapsulação da CPT, com valores variando de 94,8 a 96,1% (Tabela 20).

A adição de múltiplas camadas poliméricas de revestimento não influenciou significativamente a eficiência de encapsulação da CPT nas NCs ($p > 0,05$).

Tabela 20. Porcentagem de EE da CPT nas NCs.

Amostra	EE (%) $\pm$ DP
F2_3,6_1	94,8 $\pm$ 0,23
F2_3,6_1a3	96,1 $\pm$ 0,18
F2_3,6_1p3	95,9 $\pm$ 0,26

Os valores encontrados foram expressivamente superiores ao de Unal e colaboradores (2015), os quais relataram a encapsulação de 39,2 a 50,7% de CPT em nanocápsulas de

ciclodextrinas e PCL revestidas com QS de baixa massa molecular, destacando o sucesso no delineamento da plataforma proposta nesse trabalho.

5.8.3. Permeação *in vitro* em mucosa suína

O ensaio de permeação *in vitro* teve como objetivo avaliar a influência dos sistemas desenvolvidos no perfil de permeação da CPT através da membrana intestinal.

A utilização do intestino suíno para esse estudo baseou-se na similaridade anatômica, histológica e fisiológica ao intestino humano.

A mucosa intestinal suína atuou como uma barreira complexa, composta pelas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa, sendo a mucosa, a camada mais proximal ao lúmen, a que contém uma espessa camada de muco cobrindo as células epiteliais (NUNES; SILVA; CHAVES, 2016).

O perfil de permeação, permeabilidade aparente da CPT livre e veiculada nas NCs estão apresentados na Figura 39-A e B, respectivamente.

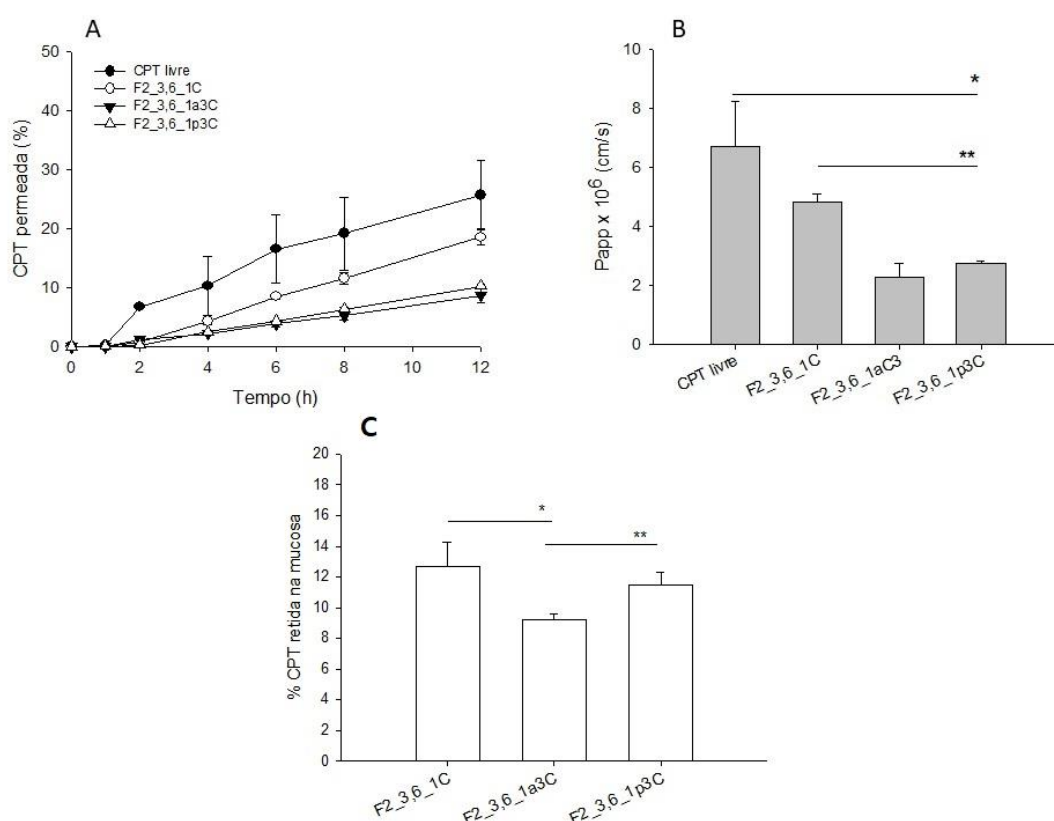


Figura 39. Ensaio de permeação *in vitro*: (A) Perfis de permeação através da membrana intestinal suína; (B) Permeabilidade aparente da CPT veiculada nas diferentes NCs e (C) Retenção de CPT veiculada em NCs na mucosa intestinal.

O transporte através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico, que pode ocorrer principalmente por dois mecanismos passivos distintos: permeabilidade paracelular (entre as células adjacentes) e transcelular (através das células).

A biodisponibilidade da CPT é muito variável, devido à sua baixa solubilidade e efluxo via Pg-P (SADEKAR et al., 2013). Apesar dessa característica, observou-se para a CPT livre uma elevada porcentagem de permeação, chegando à 30 %, valor superior aos observados para o fármaco veiculado nas NCs. O valor de permeabilidade aparente (Papp) da CPT livre também foi de 2 a 3 vezes superior aos observados para o fármaco veiculado nas NCs.

Nesse modelo utilizado para permeação, alguns mecanismos fisiológicos não atuam de forma semelhante aos de tecidos viáveis *in vivo*. Provavelmente, um desses mecanismos é o de efluxo via Pg-P, justificando a elevada permeação observada para o fármaco livre. Além disso, para o ensaio utilizou-se uma solução de CPT em fase móvel e tampão fosfato (pH 6,8) devido à baixa solubilidade aquosa da CPT, diretamente relacionado à sua baixa absorção intestinal e biodisponibilidade (ROZEHNAL et al., 2012).

Para as NCs, observou-se menor porcentagem de permeação através da mucosa intestinal suína, comparado ao fármaco livre, porém com aumento crescente da porcentagem permeada para todas as formulações durante as 12 horas de ensaio (Figura 39-A). A quantidade média de CPT permeada foi de 18,5 %, 8,7 % e 10,3 %, para as formulações F2_3,6_1C (revestida apenas com QS), F2_3,6_1a3C (revestida com QS+AH) e F2_3,6_1p3C (revestida com QS+AH+HP), respectivamente.

A nanocápsula revestida apenas com QS apresentou a maior porcentagem de permeação ($p < 0,05$), aproximadamente 2 vezes maior, comparado às demais NCs revestidas, destacando o efeito da modificação de superfície da partícula no perfil de permeação do fármaco encapsulado.

Diversos estudos relatam a propriedade da QS em aumentar a permeação de fármacos. Dentre os mecanismos de ação, sugere-se uma combinação de mucoadesão e do afrouxamento transitório das junções paracelulares. Ou seja, após a retenção local que permite a interação com o epitélio, a QS deve ser capaz de induzir a redistribuição da F-actina e da proteína ZO-1 das junções paracelulares, afrouxando essa junção e facilitando a passagem do fármaco (THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001).

O elevado valor de Papp (Figura 39-B) para a F2_3,6_1C ($4,84 \times 10^{-6}$ cm/s) corrobora esse achado, uma vez que esse parâmetro está relacionado ao transporte paracelular, indicando a capacidade da QS em modular as junções celulares da região intestinal.

Entre as F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C, não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem permeada e Papp ($2,60 \times 10^{-6}$ e $2,74 \times 10^{-6}$ cm/s), indicando que ocorre a permeação mais lenta da CPT através da membrana intestinal para ambos os sistemas revestidos com os poliânions.

De forma complementar, avaliou-se a porcentagem de fármaco, veiculado nas NCs, que permaneceu retido na mucosa intestinal (Figura 39-C). O valor de retenção variou de 9,2 a 12,7 %.

Para as partículas F2_3,6_1C e F2_3,6_1p3C não houve diferença significativa na porcentagem retida, ou seja, apesar da partícula revestida com AH+HP permear menos em comparação à revestida apenas com QS, a porcentagem retida de ambas foi semelhante, sendo uma característica vantajosa para a ação local da CPT, que deve resultar na redução de efeitos colaterais sistêmicos, permitindo o tratamento localizado do tumor colônico.

Para os estudos seguintes, a partícula revestida apenas com QS foi excluída, mantendo-se as F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C.

5.8.4. Estudo da interação entre as NCs contendo CPT e a mucina a partir da análise do potencial zeta

A Figura 40 apresenta as variações no potencial zeta das F2_3,6_1aC e F2_3,6_1p3C após incubação com diferentes concentrações de mucina dispersas em meios com valores de pH 1,2 e 6,8.

As dispersões de mucina nos valores de pH 1,2 e 6,8, que simulam o pH gástrico e entérico, apresentaram potencial zeta médio de +2,47 e -21,25 mV, respectivamente. Em valores de pH superiores ao seu pKa (2,6), os grupamentos siálicos das moléculas de mucina apresentam-se carregados negativamente devido à ionização. Em contrapartida, em pH inferior ao seu valor de pKa, os grupamentos encontram-se protonados, apresentando carga residual positiva.

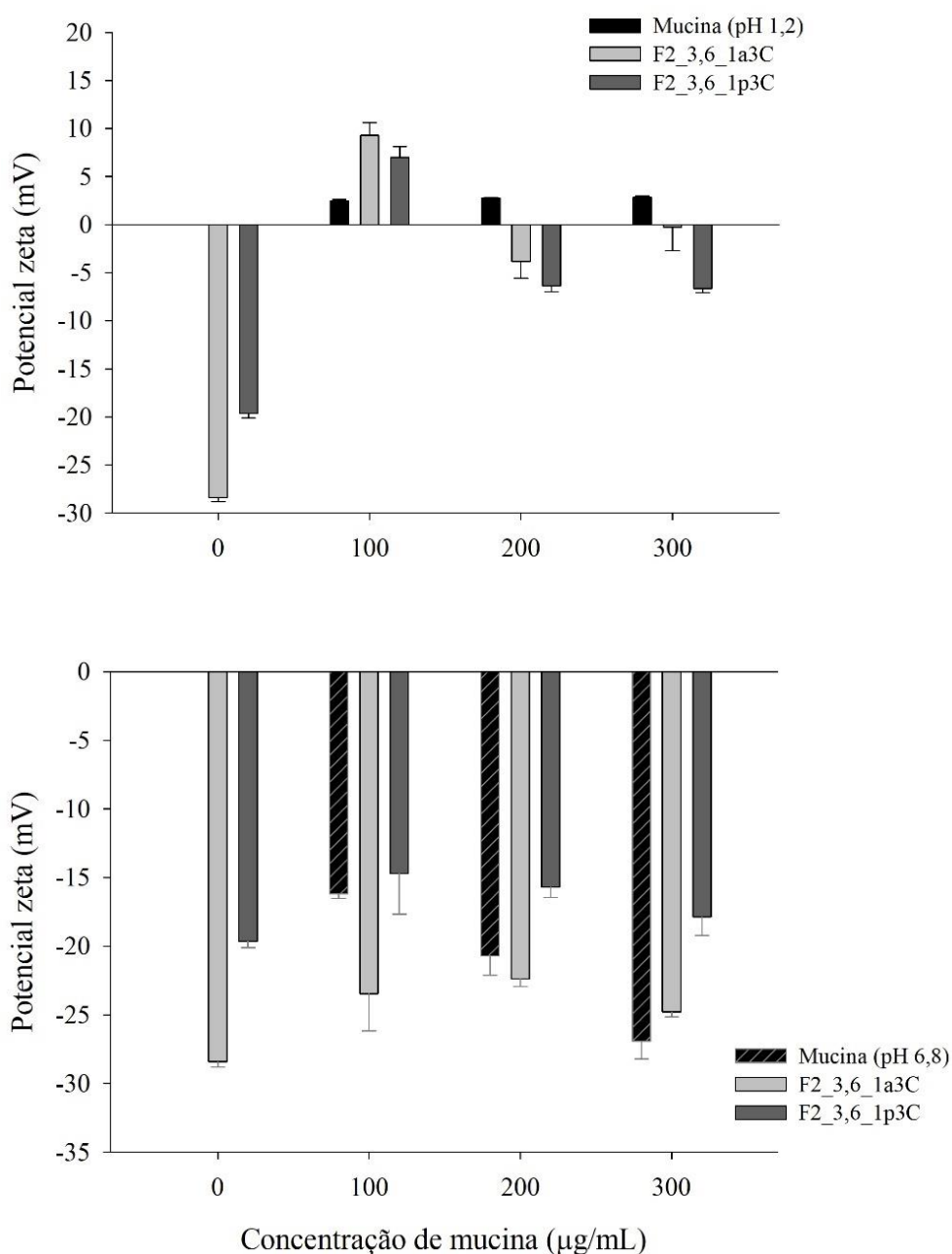


Figura 40. Influência da adição de soluções de mucina no potencial zeta das nanocápsulas contendo CPT.

Em pH 1,2 observou-se que a adição de mucina na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ alterou de forma significativa os valores potencial zeta, das nanocápsulas F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C, promovendo a reversão de cargas de -28 mV e -19 mV para +10 mV e +8 mV, respectivamente (Figura 40). Essa alteração significativa indica que houve a adsorção de mucina na superfície das NCs, governada principalmente por interações eletrostáticas. Com o

aumento da concentração de mucina para 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ observou-se novamente inversão de carga, para valores na faixa de -7,0 mV a -9,0 mV.

No valor de pH 1,2 as moléculas de mucina apresentam carga superficial positiva, porém muito próxima à neutralidade (+2,47 mV). Quando há um excesso de mucina no meio, como nas concentrações de 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, devem ocorrer interações entre as moléculas de mucina, as quais não se repelem eletrostaticamente, formando agregados. Quando esses agregados de mucina entram em contato com as NCs, as interações supramoleculares com a superfície das NCs devem ser dificultadas, considerando que podem ocorrer mudanças na conformação da mucina, tornando seus sítios menos disponíveis para interação. No entanto, a adsorção desses agregados deve ocorrer, porém de forma heterogênea, mantendo alguns sítios ionizados livres na superfície das NCs, resultando no potencial zeta negativo observado (Figura 40).

Já com a adição de mucina em pH 6,8 em todas as concentrações houve a manutenção dos valores potencial zeta negativo das NCs. Apesar da mudança menos significativa, deve-se considerar que o potencial zeta da mucina encontra-se altamente negativo neste valor de pH, justificando a menor alteração observada na Figura 40. Neste valor de pH, a interação eletrostática entre a mucina e a superfície das NCs, ambas com valores de potencial zeta negativos, não é favorecida, porém os grupamentos carboxila presentes nos polímeros aniônicos do revestimento, podem formar ligações de hidrogênio com as moléculas de mucina, além da possibilidade da formação de interações hidrofóbicas, permitindo o processo de adsorção, observado pelas variações na densidade de carga negativa das partículas (Figura 40).

Os resultados indicam maior interação com a mucina em meio ácido. Para contornar este comportamento, as NCs serão microencapsuladas nos sistemas matriciais pH responsivos, os quais devem prevenir sua liberação prematura no meio gástrico. Por outro lado, a indicação da menor interação das NCs com a mucina em pH 6,8, pode ser um atributo favorável, já que além de interagir com o muco da região entérica as NCs devem permear essa camada que reveste o epitélio intestinal ou a massa tumoral. Dessa forma, a menor mucoadesividade em pH 6,8 pode ser um atributo favorável que possibilita a retenção do sistema no muco, permitindo, ainda, a mucopenetração, o que pode favorecer a interação do sistema com as células tumorais para a internalização e/ou liberação local do fármaco.

5.8.5. Avaliação da atividade antiangiogênica da CPT utilizando membrana corioalantóica de galinha (CAM)

O modelo da membrana corioalantóica de ovo de galinha (CAM, do inglês ChorioAllantoic Membrane) tem sido amplamente utilizado para simular a avaliação da angiogênese de diversos tipos de neoplasias como o CC (SUBAUSTE et al., 2009). Em relação a outros testes de performance biológica *in vivo*, a CAM é relativamente simples, reproduzível e de baixo custo.

A CPT apresenta comprovada atividade antitumoral, no entanto, sua ação antiangiogênica é pouco estudada. Considerando a complexa terapia do CC, a co-administração de fármacos que atuem em diferentes vias, inibindo a progressão tumoral, é uma estratégia vantajosa.

Além disso, os polissacarídeos utilizados na composição das NCs podem atuar de formas diferentes, como angiogênicos ou antiangiogênicos.

Neste estudo, a primeira etapa foi avaliar a morfologia e padrão dos vasos da CAM, após a aplicação das amostras. As imagens *in ovo* obtidas após a incubação com as diferentes amostras estão apresentadas na Figura 41.

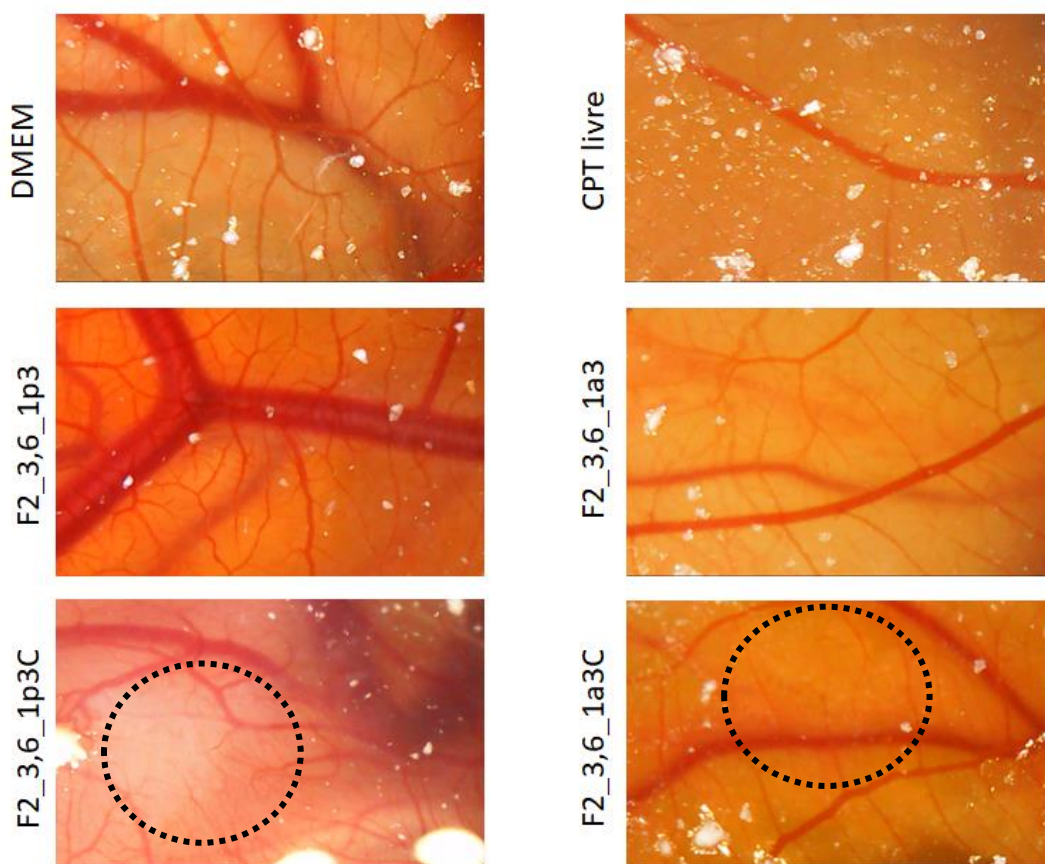


Figura 41. Imagens *in ovo* 48 horas após aplicação das amostras.

A partir da análise qualitativa das imagens, verificou-se diferentes comportamento após a aplicação das amostras. Para as NCs sem CPT (F2_3,6_1p3 e F2_3,6_1a3), não houve mudanças significativas do padrão ou estrutura dos vasos, em relação ao grupo controle – DMEM (Figura 41). Já para a CPT livre foi possível observar uma redução expressiva do número de vasos, confirmando a ação antiangiogênica do fármaco.

Quando a CPT foi encapsulada nas NCs (F2_3,6_1p3C e F2_3,6_1a3C), observou-se uma modificação no padrão da rede de vasos da CAM, porém diferentemente do fármaco livre, a redução da quantidade de vasos e alteração morfológica foi concentrada na região da aplicação da formulação (local destacado pelos círculos na Figura 41).

Quando o fármaco livre foi administrado na CAM, possivelmente se espalhou por toda a superfície agindo em toda a rede vascular, como pode ser observado na Figura 41. No caso das NCs, provavelmente devido à propriedade bioadesiva, ao aplica-las na CAM, as partículas devem ter aderido na região resultando na liberação e ação localizada da CPT. O comportamento de muco/bioadesão é um atributo favorável ao desempenho do sistema. Considerando que o design das NCs foi racionalizado para possibilitar o direcionamento do sistema para a região/massa tumoral no cólon, a adesão na região e ação localizada da CPT veiculada nas partículas (F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C) é vantajosa, visto que a mesma concentração de fármaco, quando livre, atuou sobre toda a rede de vasos sanguíneos da CAM, ou seja, no paciente poderia agir na vascularização de uma extensa região do intestino, incluindo regiões saudáveis, resultando em efeitos adversos prejudiciais.

Para uma análise quantitativa dos dados, realizou-se a contagem do número de vasos a partir das imagens *ex ovo*. Os resultados estão apresentados na Figura 42.

As NCs sem fármaco (F2_3,6_1a3 e F2_3,6_1p3) apresentaram resultado de número de vasos semelhante ao do grupo controle, ou seja, apenas a plataforma não apresentou efeito angiogênico ou antiangiogênico.

Em contrapartida, uma redução expressiva do número de vasos foi observada para o fármaco livre (Figura 42), corroborando com o resultado da análise qualitativa. As NCs contendo fármaco (F2_3,6_1a3C e F2_3,6_1p3C) também induziram a redução no número de vasos, de forma semelhante ao fármaco livre (Figura 42).

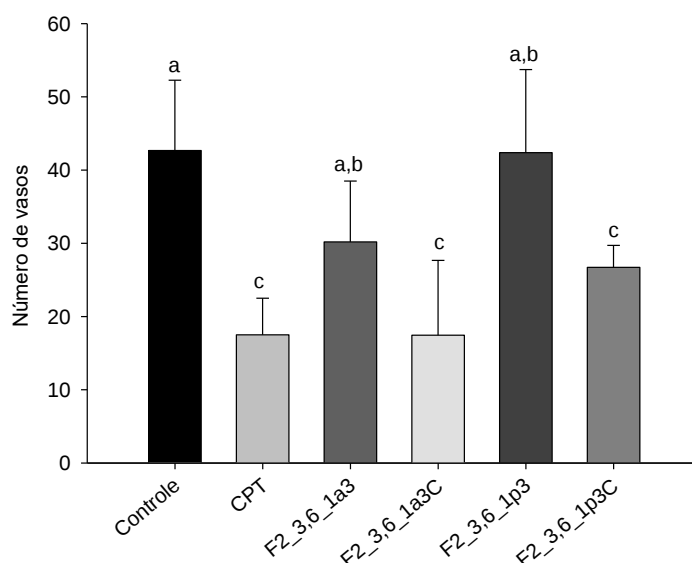


Figura 42. Análise quantitativa do número de vasos após a aplicação das amostras e incubação por 48 horas. *letras iguais representam similaridade.

Os resultados demonstram que mesmo com a encapsulação da CPT, a atividade antiangiogênica foi mantida. Adicionalmente, de acordo com os resultados da análise qualitativa, o efeito de redução e morfologia da vascularização foi concentrado na região de aplicação, evidenciando que a incorporação da CPT nas NCs desenvolvidas parece ser uma estratégia vantajosa para o tratamento local do tumor colônico, com potencial tanto para a aplicação como tratamento principal quanto em combinação com o tratamento convencional, resultando em maior efetividade terapêutica.

5.9. Desenvolvimento das micropartículas contendo as nanocápsulas com CPT

As NCs carregadas com CPT e funcionalizadas com QS+AH ou QS+AH+HP foram incorporadas às dispersões poliméricas selecionadas e, as misturas foram gotejadas na solução resfriada de Ca^{2+} , seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.2.2.

As dispersões de GG:P contendo as NCs apresentaram-se menos viscosas, dificultando o gotejamento e a manutenção da forma esférica da gota ao entrar em contato com o agente reticulante. Diferentemente, as dispersões de GG:AR apresentaram maior viscosidade aparente, o que conferiu uma maior resistência da gota à deformação durante o processo de gotejamento e, portanto, a obtenção de partículas de forma mais regular e esférica.

As amostras obtidas foram denominadas como GA ou GP (de acordo com sua composição polimérica sendo GA=GG:AR e GP=GG:P), seguido das letras A ou P (A: para os carreadores revestido com QS+AH e P: para os revestidos com QS+AH+HP). O rendimento de

ambas as MCs foi elevado, variando de 81,3 a 93,4% (Tabela 20), sendo as partículas baseadas em GG:AR as que apresentaram o maior rendimento.

Após a obtenção, a morfologia de superfície e da parte interna das micropartículas foram analisadas por microscopia e as imagens estão apresentadas na Figura 43. É possível observar nas fotomicrografias a diferença na esfericidade das MCs obtidas a partir das dispersões de GG:P e GG:AR, as quais apresentam forma irregular e esférica, respectivamente. Para a GAA e GAP, no aumento de 80 vezes, é possível observar uma superfície regular, com certa rugosidade, sem a presença de poros e/ou fissuras (Figura 43-A e B). Em contrapartida, para as GPA e GPP, observa-se uma superfície mais irregular e rugosa, com algumas áreas de retração na matriz, além da presença de ranhuras (Figura 43-C e D).

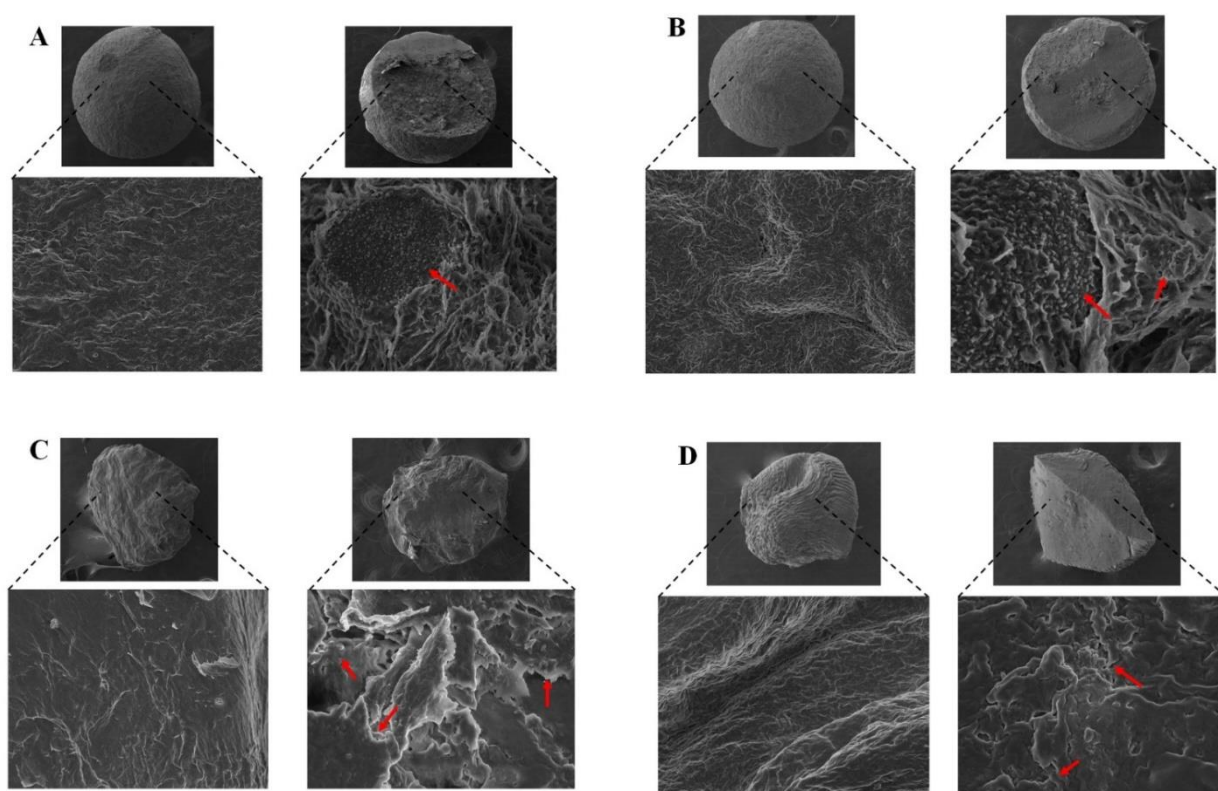


Figura 43. Fotomicrografias da superfície (aumentos de 80 e 5.000 vezes) e estrutura interna (aumentos de 80 e 20.000 vezes) das MCs A: GAP, B:GAA; C: GPA e D: GPP.

As fotomicrografias da estrutura interna (Figura 43) da GAA, GAP e GPA demonstram a formação de uma matriz porosa, já as imagens da GPP evidenciaram a formação de uma estrutura matricial mais compacta e coesa, com a presença de poucos poros. Para todas as amostras no aumento de 20.000 vezes, foi possível observar internamente estruturas esféricas

em escala nanométrica, característico das NCs (setas em vermelho), indicando sua incorporação na matriz. Nas micropartículas de GG:AR, as NCs encontram-se concentradas em algumas regiões da matriz (Figura 43- A e B), enquanto que de GG:P as nanoestruturas parecem incorporadas por toda a matriz polimérica, de forma homogênea (Figura 43- C e D).

5.9.1. Avaliação do diâmetro, circularidade e valor de span das MCs

Para uma análise comparativa entre as amostras obtidas, fotomicrografias foram compiladas na Figura 44. As imagens corroboram os resultados observados, em que as partículas GAA e GAP apresentam maior esfericidade. Em contrapartida, as obtidas a partir da dispersão GG:P (GPA e GPP) são irregulares, apresentando formato oblongo.

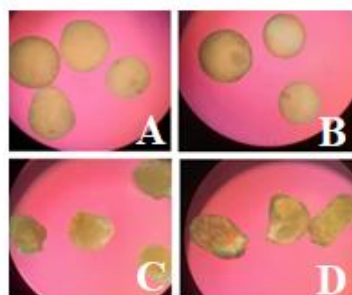


Figura 44. Fotomicrografia das A: GAA; B: GAP; C: GPA e D: GPP (aumento de 50 vezes).

A média e o desvio padrão dos diâmetros do círculo equivalente das MCs foram calculados, e de acordo com os dados da Tabela 21, todas as MCs apresentaram diâmetro médio inferior a 1000 μm , com valores variando de 756 a 921 μm .

Tabela 21. Diâmetro, circularidade, valor de span e rendimento das MCs (n=100, média $\pm$ DP).

Amostra	Diâmetro (μm)	Circularidade	Índice SPAN	Rendimento (%)
GAA	920 $\pm$ 135	0,97 $\pm$ 0,03	0,29	88,9
GAP	915 $\pm$ 66	0,97 $\pm$ 0,04	0,30	93,4
GPA	756 $\pm$ 65	0,84 $\pm$ 0,02	0,40	81,3
GPP	921 $\pm$ 112	0,89 $\pm$ 0,02	0,33	88,2

As MCs baseadas em GG:AR apresentaram maiores diâmetros, com a incorporação das NCs contendo CPT e funcionalizadas tanto com QS+AH quanto com QS+AH+HP. Comparando-se os valores obtidos com os das micropartículas vazias (item 5.2.2), é possível

concluir que houve uma redução significativa, de até 687 μm , no diâmetro médio das partículas com a incorporação das NCs.

Devido a presença de vários grupamentos ionizados na superfície das NCs (caracterizados pelo potencial zeta negativo, Tabela 19), provenientes do revestimento com AH ou AH+HP, os íons Ca^{2+} devem ter atuado criando pontos adicionais de interação entre as nanoestruturas e as cadeias poliméricas de GG:P ou GG:AR, originando uma matriz com maior grau de reticulação e estrutura mais compacta, resultando em partículas menores (Figura 45).

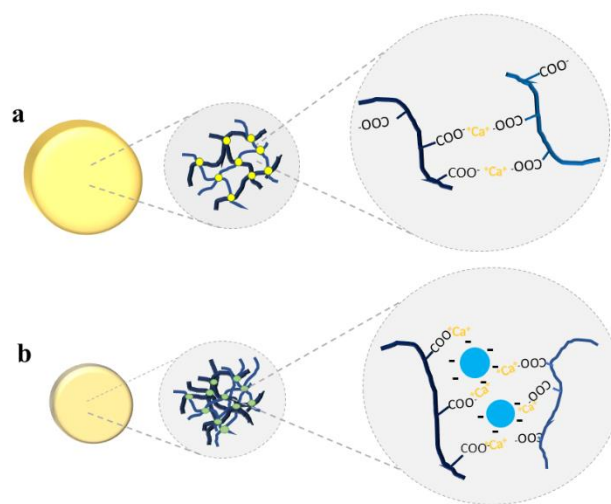


Figura 45. Representação esquemática da estrutura das micropartículas a: vazia e b: contendo as NCs.

Em relação a forma, as MCs apresentaram elevada circularidade, sendo as GAA e GAP, baseadas em GG:AR, as que apresentaram os maiores valores, de aproximadamente 0,97, evidenciando a forma mais esférica dessas partículas. Os valores de circularidade observados após a incorporação das NCs foram superiores aos observados para as micropartículas vazias (0,76 a 0,77, Tabela 10). A microencapsulação das NCs contendo CPT, resultou na formação de partículas com faixa mais ampla de distribuição de tamanho, demonstrada pelos valores superiores do valor de span, na faixa de 0,29 a 0,40, em relação à 0,27 a 0,29 para as micropartículas vazias (Tabela 21 e Tabela 11). Apesar do aumento do valor de span, os valores mantiveram-se abaixo de 0,5. Pequenas variações na altura de gotejamento, na pressão exercida sobre o êmbolo da seringa e na velocidade de gotejamento podem ocasionar variação no tamanho das partículas, além disso, a carga de nanocápsulas em cada micropartícula pode variar, influenciando tanto no volume quanto na reticulação da matriz, e consequentemente, na homogeneidade de tamanho.

5.9.2. Avaliação da eficiência de incorporação das NCs nas micropartículas

De acordo com a Tabela 22 a eficiência de incorporação (%EI) das NCs contendo CPT nas micropartículas variou de 16,4 a 56,2%.

Tabela 22. Eficiência de incorporação das NCs contendo CPT nas micropartículas.

Amostra	EI (%) $\pm$ DP
GAA	34,4 $\pm$ 3,5
GAP	16,4 $\pm$ 2,8
GPA	56,2 $\pm$ 2,4
GPP	29,3 $\pm$ 3,1

Avaliando-se os resultados é possível afirmar que a composição das micropartículas influenciou de forma significativa a eficiência de incorporação das NCs, sendo as compostas por GG:P as que apresentaram maior EI% (29,3 a 56,2%) ($p < 0,05$). O Ca^{2+} deve promover a interação eletrostática entre os grupamentos ionizados dos polímeros de revestimento (AH e HP) das NCs e os grupamentos carboxílicos dos polímeros GG:P ou GG:AR, que compõe a matriz da micropartícula (Figura 45). Comparando-se a densidade de carga da P e do AR, a P apresenta maior número de grupamentos carboxilato e, portanto, maior número de sítios para ligação iônica com o Ca^{2+} e com as NCs, incorporando mais eficientemente as nanoestruturas na matriz. Diferentemente, a menor disponibilidade de grupamentos ionizáveis no AR deve desfavorecer a interação iônica com as nanocápsulas e o Ca^{2+} e, conseqüentemente, seu aprisionamento efetivo na matriz. Provavelmente, nessa matriz, a incorporação deve ocorrer majoritariamente por interações físicas, em que as NCs ficam aprisionadas na malha polimérica de GG:AR, discussão que corrobora com o apresentado no item 5.9.1 e com as fotomicrografias da Figura 40. Dessa forma, provavelmente nas micropartículas GAA e GAP as NCs, majoritariamente retidas por interações físicas na malha polimérica de estrutura mais expandida, em comparação com a malha da GG:P, devem difundir mais facilmente para o meio reticulante, resultando na menor %EI (16,4 a 34,4%, Tabela 22).

Além da composição das micropartículas, a composição das NCs também influenciou de forma significativa a %EI. Para as NCs com QS+AH, a porcentagem de incorporação foi duas vezes maior do que para contendo QS+AH+HP ($p < 0,05$) (Tabela 22).

Como apresentado na Tabela 18, a F2_3,6_1a3C (QS+AH) apresentou potencial zeta de -28,3 mV e a F2_3,6_1p3C (QS+AH+HP) de -17,8 mV, ou seja, cargas superficiais significativamente diferentes, devido às características dos materiais de revestimento. Nesse sentido, a maior densidade de carga observada para a F2_3,6_1a3C deve facilitar a formação

de um maior número de pontos de interações eletrostáticas com os íons cálcio e os carboxilatos das cadeias poliméricas, retendo mais fortemente as NCs na malha. Como resultado, observa-se a maior %EI para as micropartículas GAA e GPA.

5.10. Estudo da mucoadesividade das MCs

5.10.1. Avaliação da mucoadesividade utilizando a técnica “wash off”

A mucosa intestinal é composta por uma barreira epitelial, pela lâmina própria e pela musculatura lisa, apresentando o muco como revestimento externo, voltado ao lúmen. A camada epitelial varia em composição celular, de acordo com a porção da região entérica que pertence, bem como na distribuição dos polissacarídeos conjugados ao glicocálix, gerando rugosidades superficiais características de cada tecido. Da mesma forma, o muco que reveste essas diferentes mucosas também difere em concentração de mucina, espessura e pH. Todos esses fatores devem interferir diretamente no processo de mucoadesão (SOSNIK; DAS NEVES; SARMENTO, 2014).

O teste *ex vivo* teve como objetivo mimetizar as condições em que o sistema será exposto, avaliando a capacidade das MCs de aderirem ao muco que reveste o epitélio do intestino delgado e cólon. Os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultado do ensaio *ex vivo* de mucoadesão das MCs.

Amostra	Intestino delgado	Cólon
	Partículas aderidas (%)	Partículas aderidas (%)
GAA	100	100
GAP	80	60
GPA	100	100
GPP	80	80

As amostras GAA e GPA, que continham as NCs revestidas com QS+AH permaneceram 100% aderidas tanto ao intestino delgado quanto ao cólon. Para as micropartículas GAP e GPP, que continham as NCs revestidas com QS+AH+HP, a porcentagem de adesão variou de 60 a 80% (Tabela 23). Essa variação, pode ser resultante de modificações estruturais que ocorreram com a incorporação dessas NCS à matriz polimérica e reticulação, principalmente à nível superficial, que devem ter dificultado a interação/interpenetração das cadeias com o muco.

De forma geral, considerando a condição forçada a que o sistema foi exposto (angulação e fluxo de meio sobre o tecido), os valores observados evidenciam o elevado potencial mucoadesivo das MCs desenvolvidas.

5.10.2. Avaliação da mucoadesividade *in vitro* em texturomêtro

A capacidade mucoadesiva das MCs foi também avaliada por meio da medida da força necessária para destacar as partículas (*FMax*), mantidas em contato com discos de mucina, utilizados para mimetizar o substrato biológico. O ensaio foi conduzido com os discos de mucina umedecidos com HCl 0,1N (pH 1,2) ou tampão fosfato (pH 6,8), mimetizando as características da mucina nos meios gástrico e entérico, respectivamente.

A força máxima de mucoadesão (*FMax*, N) das MCs foi elevada, variando de 0,471 a 0,641 N em pH 1,2 e de 0,521 a 1,510 N em pH 6,8 (Figura 46).

A partir da Figura 46 é possível observar uma tendência das MCs em aderirem mais fortemente aos discos de mucina umedecidos com tampão fosfato (pH 6,8).

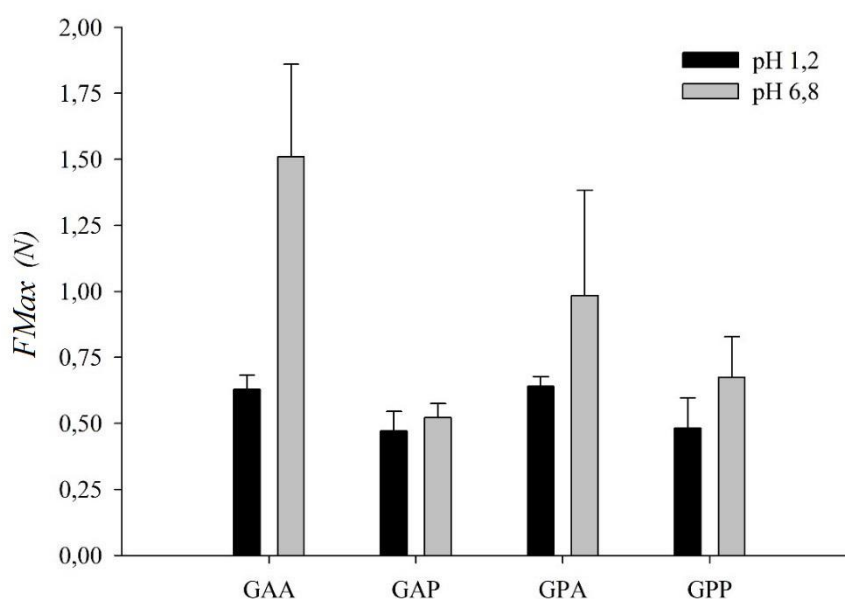


Figura 46. Força máxima de mucoadesão (*FMax*) das MCs.

Szekalska e co-autores (2017) em trabalho com micropartículas para veiculação de metformina, baseadas em quitosana e alginato, polímeros com capacidade mucoadesiva conhecida, realizaram estudo de mucoadesividade simulando o meio gástrico com discos de mucina imersos em HCl (pH 1,2). Como resultado, observaram valores de *FMax* entre 0,6 e 0,8 N, valores próximos aos observados no nosso estudo.

Ribeiro e co-autores (2016) obtiveram filmes de triacetato de celulose para o revestimento de micropartículas de GG e, avaliaram sua capacidade mucoadesiva utilizando discos de mucina hidratados com tampão fosfato (pH 6,8). Os filmes apresentaram elevados valores de *FMax*, entre 5,9 e 6,9 N. Considerando que o triacetato de celulose é um polímero que contém grupamentos acetila e hidroxila, a interação com a mucina deve ocorrer via ligações de hidrogênio e de Van der Waals, reforçando que diversos tipos de interações, não apenas as eletrostáticas, estão envolvidas na consolidação do processo de mucoadesão.

Comparando-se os resultados com os do item 5.5, os valores de *FMax* obtidos com o disco de mucina foram superiores aos utilizando mucosa intestinal suína (*FMax* média de 0,2 N). Além da possibilidade das mudanças estruturais que ocorreram nas micropartículas com a incorporação das NCs, deve-se considerar que a porcentagem de mucina presente no muco intestinal varia de 0,2 a 0,5 % (m/v) e, a mucina é o principal componente do muco responsável por estabelecer interações com os sistemas para o estabelecimento do processo de adesão. Nesse ensaio os discos eram compostos por 100% de mucina e, portanto, esperava-se que ocorresse maior número de interações, de elevada intensidade com esse substrato, em comparação ao tecido intestinal suíno, impondo maior resistência ao destacamento.

5.11. Avaliação da liberação da CPT utilizando modelo estático para simulação da digestão (INFOGEST)

O ensaio de digestão *in vitro* foi realizado para analisar a influência de um meio complexo, de grande biorrelevância, contendo eletrólitos, enzimas e sais biliares na matriz das micropartículas, processo que impacta diretamente na liberação das NCs e consequentemente da CPT.

O ensaio foi conduzido por 2 horas em meio gástrico simulado (Tabela 3). Nesse período, as partículas apresentaram liberaram de 66 a 80 % da CPT (Figura 47).

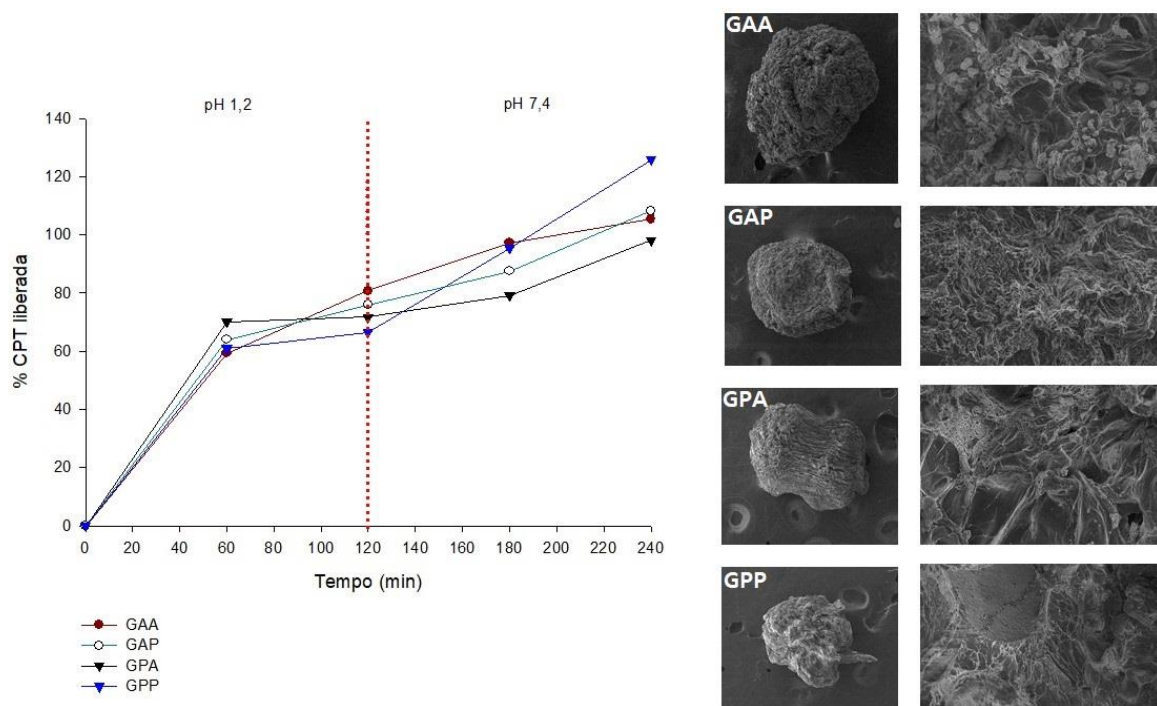


Figura 47. Perfil de liberação da CPT a partir do ensaio de digestão “in vitro” e imagem das MPs após o processo.

De acordo com a Figura 47, é possível observar que no primeiro tempo de coleta do meio gástrico simulado (60 minutos), as partículas liberaram de 59 a 70 % do fármaco. Esse comportamento indica que as enzimas ou eletrólitos presentes no meio complexo promoveram maior grau de erosão da matriz, resultando na formação de um grande número de poros e/ou canalículos na estrutura, além de favorecer o relaxamento da malha reticulada. Tais fenômenos facilitam a difusão de líquido para o interior da matriz, bem como a liberação da CPT para o meio.

Entre as amostras é possível observar para a GPP e GPA (ambas obtidas a partir da dispersão de GG:P) um platô de liberação da CPT no meio gástrico entre 60 e 120 minutos, com valores de 60,9 e 70,2% em 60 minutos e 66,4 a 71,6 % após 120 minutos (Figura 47). Esse comportamento pode indicar uma tendência dessa matriz polimérica em controlar de forma mais eficiente a liberação em meio gástrico, comparado a mistura GG:AR.

As imagens das MCs após o ensaio de digestão, apresentadas na Figura 47, evidenciam a ocorrência da erosão de forma uniforme por toda a extensão da matriz, com a formação de poros, canalículos e depressões em toda a estrutura. Deve-se considerar ainda, que a

incorporação das NCs na matriz das MPs pode ter promovido um rearranjo estrutural que tornou mais fácil o acesso das enzimas à rede polimérica, em comparação com as MPs vazias.

Deve-se considerar que os sistemas multiparticulados com diâmetro inferior à 2 mm (2000 μm), de modo geral, apresentam comportamento semelhante à um líquido, com tempo de trânsito pelo TGI reduzido, alcançando tempo médio de retenção na região gástrica de aproximadamente trinta minutos (NEWTON, 2010). Portanto, as condições do presente ensaio foram forçadas, considerando que dificilmente o sistema permaneceria por 120 minutos no estômago, sofrendo menor a ação enzimática e do pH ácido, o que favoreceria a redução da liberação do fármaco no estômago.

Djoullah e co-autores (2020) observaram resultado semelhante com micropartículas contendo riboflavina. Os autores descreveram a liberação de 60 % da riboflavina em meio ácido contendo pepsina. No meio de mesmo valor de pH, porém sem enzima, a liberação foi de aproximadamente 20 %, demonstrando a influência das enzimas no processo de liberação do fármaco (DJOULLAH; SAUREL, 2021).

Com a troca de pH do meio e adição da enzima pancreatina e dos sais biliares, a liberação da CPT continuou ocorrendo de forma crescente, com as MPs GAA, GAP e GPP liberando praticamente 100 % do fármaco em 60 minutos de ensaio nesse meio. A partícula GPA liberou 100 % do fármaco apenas após 120 minutos em meio entérico simulado.

Adicionalmente, a interpretação quantitativa das curvas de liberação foi realizada, utilizando equações que traduzem matematicamente o perfil obtido em função de parâmetros relacionados à forma farmacêutica.

De acordo com o valor do coeficiente de correlação (r^2), o modelo que apresentou melhor correlação com os dados de liberação CPT a partir das MPs GAA, GAP e GPP foi o de Korsmeyer – Peppas, enquanto que para a GPA foi o modelo de Weibull que melhor se correlacionou com os dados de liberação (Tabela 24).

Tabela 24. Coeficiente de correlação e parâmetros dos modelos matemáticos de liberação da CPT.

Amostras	Modelos				
	Korsmeyer – Peppas			Weibull	
	R^2	K	n	R^2	b
GAA	-	-	-	0,9998	0,6701
GAP	0,9947	12,21	0,3901	-	-
GPA	0,9877	24,12	0,2429	-	-
GPP	0,9830	3,976	0,6208	-	-

O modelo de Korsmeyer–Peppas é baseado na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo. A constante k é dependente de características do sistema e do fármaco, representando a velocidade que ocorre a liberação. Já o expoente de liberação n , indica o mecanismo de transporte do fármaco em função do tempo (BRUSCHI, 2015).

Para as partículas GAP, GPA e GPP o valor de K indica que a taxa de liberação da GPP é significativamente menor comparada à GAP e GPA, da mesma forma para essas amostras o valor do expoente n indica que a liberação do fármaco é controlada concomitantemente pelas taxas de relaxamento das cadeias poliméricas que forma a matriz da micropartícula e a as taxas de difusão do fármaco por essa estrutura intumescida. Já para a GAP e GPA, o valor de $n < 0,43$ indica que a liberação da CPT dessas partículas é a governada pelo mecanismo de difusão Fickiana. Ou seja, a taxa de transporte ou difusão do solvente pela superfície da matriz é muito mais rápida do que o processo de relaxamento da cadeia polimérica, formando um gradiente de hidratação em que a superfície da partícula torna-se muito hidratada e intumescida e o interior menos, dificultando a liberação do fármaco do interior da partícula (BRUSCHI, 2015).

Para a amostra GAA, o valor de $b < 0,75$ indica que a liberação da CPT nessa partícula foi governada também pela difusão Fickiana (PERMANADEWI et al., 2019). Da mesma forma, a composição e estruturação dessa partícula resultou em dificuldade da difusão dos meios para o interior da matriz e conseqüentemente do fármaco para o meio externo, controlando a liberação da CPT. De acordo com a imagem apresentada na Figura 47, a GAA foi a partícula que aparentemente sofreu menor grau de erosão durante o teste.

6. CONCLUSÕES

Apesar dos importantes avanços na área da tecnologia farmacêutica, particularmente no desenvolvimento de novos sistemas micro e nanoestruturados para a liberação vetorizada de fármacos, o sucesso no direcionamento de fármacos para a mucosa intestinal ainda impõe grandes desafios devido à complexidade das barreiras anátomo-fisiológicas a serem superadas até que o fármaco atinja o local de ação.

Nesse contexto, a liberação e ação seletiva do fármaco nas células tumorais do cólon, a partir da administração oral, representam um cenário particularmente desafiador.

No presente estudo, uma plataforma multifuncional inovadora para a liberação cólon-específica da CPT e ação vetorizada nas células tumorais foi desenvolvida como estratégia para a ação mais seletiva e específica desse fármaco nas células tumorais, visando uma alternativa potencial para o tratamento local do câncer colônico pela via oral.

Devido as propriedades do fármaco e as propriedades pretendidas ao sistema, a plataforma proposta baseou-se no desenvolvimento de sistema complexo, envolvendo a compartimentalização da CPT em nanocápsulas (NCs) multi-revestidas com diferentes polímeros, e a microencapsulação das NCs em blendas poliméricas.

Os diferentes materiais e abordagens tecnológicas foram explorados para conferir ao sistema atributos críticos para o objetivo pretendido, como a proteção contra a liberação prematura nas porções superiores do TGI, favorecendo a liberação no cólon, bem como a mucoadesividade. A superexpressão dos receptores CD44 na superfície das células tumorais foi explorada como alvo para a interação específica do fármaco com essas células, permitindo que a CPT atue na inibição da progressão tumoral, principalmente pela via antiangiogênica.

Os materiais e tecnologias explorados nesse estudo permitiram a obtenção de NCs com elevados teores de CPT e propriedades físico-químicas desejáveis. A modificação da superfície das NCs com diferentes polímeros permitiu a modulação da permeabilidade da CPT, sendo que a variação da composição do revestimento multi-camadas mostrou-se uma ferramenta tecnológica promissora para a modulação da permeabilidade do fármaco, a fim de favorecer a ação local.

A nanoencapsulação do fármaco não afetou a atividade antiangiogênica da CPT, e de acordo com o modelo da CAM, a ação mais localizada na região de aplicação foi observada, o que pode ser um atributo favorável à redução do efeito nos tecidos saudáveis adjacentes ao tumor.

O estudo de liberação *in vitro* indicou que as microcápsulas selecionadas como carreadoras das NCs não promoveram o efetivo controle das taxas de liberação em meio ácido, indicando a necessidade pela busca por estratégias tecnológicas adicionais para se atingir esse objetivo. No entanto, é importante considerar o pioneirismo desse estudo na utilização do modelo estático para simulação da digestão (INFOGEST), o qual é tradicionalmente empregado para a avaliação de digestão de alimentos, no estudo de liberação do fármaco, explorando meios com elevada complexidade e biorrelevância (pH, enzimas, íons e sais biliares), o qual pode agregar importantes avanços na compreensão dos efeitos dessas variáveis fisiológicas no processo de liberação.

REFERENCIAS

- ADHIKARI, H. S.; YADAV, P. N. Anticancer Activity of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Their Mechanism of Action. **International Journal of Biomaterials**, v. 2018, p. 1–29, 30 dez. 2018.
- ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 15 ago. 2012.
- ALMALIK, A. et al. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, p. 5369–5380, jul. 2013.
- AMBIGAIPALAN, P. et al. Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2962–2974, 2011.
- ATUMA, C. et al. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G922–G929, 1 maio 2001.
- AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, fev. 2010.
- BECKER, L. C. et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. **International Journal of Toxicology**, v. 28, n. 4_suppl, p. 5–67, 7 jul. 2009.
- BENDER, E. A. et al. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, n. 1–2, p. 271–279, abr. 2012.
- BODDUPALLI, B. et al. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 381, 2010.
- BONI, F. I. et al. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 73–82, jan. 2018.
- BONI, F. I. et al. Computational and experimental approaches for chitosan-based nano PECs design: Insights on a deeper comprehension of nanostructure formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117444, fev. 2021.
- BONI, F. I.; PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F. Gellan gum microspheres crosslinked with trivalent ion: Effect of polymer and crosslinker concentrations on drug release and mucoadhesive properties. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 8, p. 1283–1290, 2016.
- BRASIL ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017**, 2017.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. [s.l.] AMGH Editora, 2012.
- BRUSCHI, M. Mathematical models of drug release. In: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 63–86.
- BRUXEL, F. et al. Revisão. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.
- CARBINATTO, F. M. et al. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, fev. 2012.
- CARBINATTO, F. M. et al. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical**

- Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27–34, fev. 2014.
- CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1–17, mar. 2010.
- CÉ, R. et al. Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 153–161, dez. 2016.
- CHAVANPATIL, M. D. et al. Surfactant–Polymer Nanoparticles Overcome P-Glycoprotein-Mediated Drug Efflux. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 5, p. 730–738, 18 out. 2007.
- CHU, X. Y. et al. Improving antitumor outcomes for palliative intratumoral injection therapy through lecithin–chitosan nanoparticles loading paclitaxel–cholesterol complex. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 689–705, 2019.
- CLEMENTS, M. K. et al. Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 411–416, 17 set. 1999.
- CORTESI, R. et al. Formulation study for the antitumor drug camptothecin : liposomes , micellar solutions and a microemulsion. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v. 159, n. 1, p. 95–103, 1997.
- COUVREUR, P. et al. Nanocapsule Technology Review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2012.
- DAI, M. et al. Preparation of camptothecin-loaded PCEC microspheres for the treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 189–196, 2011.
- DAMICO, F. M. et al. Injeção intravítrea de polissorbato 80: estudo funcional e morfológico. **Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 6, p. 603–611, 2017.
- DATE, A. A.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 504–526, 2016.
- DE OCA-ÁVALOS, J.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties Author: **Food Science**, v. 16, n. 1, p. 1–6, 2017.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M. et al. Insights into the impact of cross-linking processes on physicochemical characteristics and mucoadhesive potential of gellan gum/retrograded starch microparticles as a platform for colonic drug release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101445, fev. 2020.
- DE OLIVEIRA CARDOSO, V. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CURY, B. S. F. Mucin-polysaccharide interactions: A rheological approach to evaluate the effect of pH on the mucoadhesive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 234–245, abr. 2020.
- DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H.-C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 964–981, nov. 2016a.
- DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H. C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 964–981, 2016b.
- DEDAKIA, A. et al. Preparation and Evaluation of Poly Caprolactone Composite Microparticles By W / O / W Emulsion Method. v. 13, n. 3, p. 2738–2752, 2010.
- DENARDIN, C. C. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, p. 1–10, 2006.
- DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. e67–e67, 26 jul. 2004.
- DJOULLAH, A.; SAUREL, R. Controlled release of riboflavin encapsulated in pea protein microparticles prepared by emulsion-enzymatic gelation process. **Journal of Food**

- Engineering**, v. 292, p. 110276, mar. 2021.
- DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials : Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.
- DOS SANTOS, A. M. et al. Understanding the role of colon-specific microparticles based on retrograded starch/pectin in the delivery of chitosan nanoparticles along the gastrointestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 158, p. 371–378, jan. 2021.
- 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.
- FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152–157, 1998.
- FENTON, O. S. et al. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. **Advanced Materials**, v. 1705328, p. 1–29, 2018.
- FUENTES-ZARAGOZA, E. et al. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 931–942, 2010a.
- FUENTES-ZARAGOZA, E. et al. Resistant starch as functional ingredient : A review. **Food Research International**, v. 43, p. 931–942, 2010b.
- FULZELE, D. P.; SATDIVE, R. K. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, n. 1, p. 9–13, 2005.
- GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J. G. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 641–661, 2002.
- 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, maio 2008.
- GHOSH, I. et al. Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1, p. 12–19, 2011.
- GIAVASIS, I. et al. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8551, n. 2000, p. 177–211, 2008.
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177–211, 29 jan. 2000.
- GILBERT, D. C.; CHALMERS, A. J.; EL-KHAMISY, S. F. Topoisomerase I inhibition in colorectal cancer: biomarkers and therapeutic targets. **British journal of cancer**, v. 106, n. 1, p. 18–24, 3 jan. 2012.
- GOPINATH, V. et al. A review of natural polysaccharides for drug delivery applications: Special focus on cellulose, starch and glycogen. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, n. April, p. 96–108, nov. 2018.
- GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **Annual Review of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 615–627, 1 fev. 2002.
- GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNU, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers B. **advance**, v. 57, p. 1713–1723, 2005.
- GRANFELDT, Y. E.; DREWS, A. W.; BJÖRCK, I. M. E. Starch Bioavailability in Arepas Made from Ordinary or High Amylose Corn: Concentration and Gastrointestinal Fate of Resistant Starch in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1676–1684, 1 out. 1993.
- GREMIÃO, M. P. D.; DE CASTRO, A. D. Consideração sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões molecular. **Infarma**, v. 9, n. 7–11, 1999.
- GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

- GUZMÁN, E. et al. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 290–307, nov. 2017.
- HAAS, S. E. et al. Development of innovative oil-core self-organized nanovesicles prepared with chitosan and lecithin using a 23 full-factorial design. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 7, p. 769–778, 2014.
- HAFNER, A. et al. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 2, p. 205–213, 2009.
- HARALAMPU, S. G. Resistant starch — a review of the physical properties and biological impact of RS 3. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 285–292, 2000.
- HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H.-J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 129, 19 mar. 2019.
- HOSSEINI, SEYEDE MARZIEH HOSSEINI, H. et al. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 573–580, 2014.
- HSU, J.; WAKELEE, H. Monoclonal Antibodies Targeting Vascular Endothelial Growth Factor. **Biodrugs**, v. 23, n. 5, p. 289–304, 2009.
- HUA, S. et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1117–1132, 2015.
- HUA, S.; SALOMONE, S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. April, p. 1–22, 2020.
- HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.
- IBEKWE, V. C. et al. Interplay Between Intestinal pH, Transit Time and Feed Status on the In Vivo Performance of pH Responsive Ileo-Colonic Release Systems. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 8, p. 1828–1835, 2008.
- JAIN, R. K.; MARTIN, J. D.; STYLIANOPOULOS, T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. **Annual review of biomedical engineering**, v. 16, p. 321–346, 11 jul. 2014.
- KALAM, M. A. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 127–136, ago. 2016.
- KHAFAGY, E.-S. et al. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521–1546, 2007.
- KHOTIMCHENKO, M. Pectin polymers for colon-targeted antitumor drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 1110–1124, 2020.
- KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, p. 748–764, 2011.
- KOHANE, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 203–209, 1 fev. 2007.
- KOTELEVETS, L. et al. Nanotechnologies for the treatment of colon cancer: From old drugs to new hope. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 514, n. 1, p. 24–40, nov. 2016.
- KOTLA, N. G. et al. Bioresponsive drug delivery systems in intestinal inflammation: State-of-the-art and future perspectives ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 146, p. 248–266, 2019.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based

- drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 2010.
- KURTZ, J.-E. et al. Oral chemotherapy in colorectal cancer treatment: review of the literature. **European Journal of Internal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 18–25, fev. 2003.
- LEONARDI, E.; MATOS, J. **INDÚSTRIA FARMACÊUTICA TEM CRESCIMENTO ACELERADO**. Disponível em: <[LI, J. et al. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 138–147, out. 2016.

LIAO, Y.-H. et al. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. **Drug Delivery**, v. 12, n. 6, p. 327–342, 10 jan. 2005.

LIU, H. et al. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 756–762, 2007.

LIU, L. et al. Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues. **Biomaterials**, v. 26, n. 29, p. 5907–5916, out. 2005.

LIU, L. et al. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 761–769, 2016.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LOBO, A. R.; DE LEMOS SILVA, G. M. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutricao**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 626–639, 2011.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353–367, mar. 2014.

MAITI, S. et al. Al³⁺ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164–172, 2011.

MANSOORI, B. et al. Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 10, p. 6817–6830, 28 out. 2020.

MCLEOD, H. L. et al. Topoisomerase I and II activity in human breast, cervix, lung and colon cancer. **International Journal of Cancer**, v. 59, n. 5, p. 607–611, 1 dez. 2007.

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. 1, p. 84–94, 2018.

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

MIKULIC, M. **Global spending on medicines in 2010, 2019 and forecast 2024**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/280572/medicine-spending-worldwide/>>.

MURUGESAN, S. et al. Oral Modified Drug Release Solid Dosage Form with Special Reference to Design; An Overview. **Current Drug Research Reviews**, v. 12, p. 16–25, 2020.

NAYEF, L.; CASTIELLO, R.; TABRIZIAN, M. Washless Method Enables Multilayer Coating of an Aggregation-Prone Nanoparticulate Drug Delivery System with Enhanced Yields, Colloidal Stability, and Scalability. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 6, p. 1600535, jun. 2017.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface.](https://www.ictq.com.br/industria-farmaceutica/1380-industria-farmaceutica-tem-crescimento-acelerado#:~:text=A publicação informa que o,%246%2C2 trilhões).>)

- Nature Materials**, v. 8, p. 543, 14 jun. 2009.
- NEWTON, J. M. Gastric emptying of multi-particulate dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 2–8, ago. 2010.
- NUNES, R.; SILVA, C.; CHAVES, L. **Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies**. [s.l.: s.n.].
- OLIVEIRA CARDOSO, V. M. DE et al. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 317–333, 2017.
- OLIVEIRA, R. B. DE; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 976–984, 2002.
- OSMAŁEK, T.; FROELICH, A.; TASAREK, S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1, p. 328–340, 2014.
- PEDREIRO, L. N. et al. A novel approach in mucoadhesive drug delivery system to improve zidovudine intestinal permeability. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 715–725, 2016.
- PEREIRA, D. G. **Importância do metabolismo no planejamento de fármacos** Química Novascielo, , 2007.
- PERMANADEWI, I. et al. Modelling of controlled drug release in gastrointestinal tract simulation. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1295, n. 1, p. 012063, 1 set. 2019.
- 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, p. 44–52, 2010.
- PRABHAKAR, K. et al. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 5, p. 345–353, set. 2013.
- PREGO, C. et al. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 549–556, 16 mar. 2006.
- PREGO, C.; TORRES, D.; ALONSO, M. J. Chitosan Nanocapsules as Carriers for Oral Peptide Delivery: Effect of Chitosan Molecular Weight and Type of Salt on the In Vitro Behaviour and In Vivo Effectiveness. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 9, p. 2921–2928, 1 set. 2006.
- PREZOTTI, F. G. et al. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354–1359, 18 nov. 2012.
- PREZOTTI, F. G. et al. Gellan Gum / Pectin Beads Are Safe and Efficient for the Targeted Colonic Delivery of Resveratrol. **Polymers**, v. 50, n. 10, p. 1–14, 2018.
- PREZOTTI, F. G. et al. Oral nanoparticles based on gellan gum/pectin for colon-targeted delivery of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 2, p. 236–245, 1 fev. 2020.
- 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, nov. 2014.
- QIN, C. et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 111–117, dez. 2002.
- RÊGO, A. G. S. et al. Colorectal Carcinoma in Young Patients. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 173–180, 2012.
- RIBEIRO, S. D. et al. Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 764–774, 2016.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, jul. 2006.

- ROWINSKY, E. K. et al. The Current Status of Camptothecin Analogues as Antitumor Agents. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 4, p. 271–291, 17 fev. 1993.
- ROZEHNAL, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 367–373, ago. 2012.
- SADEKAR, S. et al. Poly(amido amine) dendrimers as absorption enhancers for oral delivery of camptothecin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 175–185, nov. 2013.
- SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Starch — A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. Figure 2, p. 1–17, 2006.
- SAVITRI, E. et al. Degradation of chitosan by sonication in very-low-concentration acetic acid. **Polymer Degradation and Stability**, v. 110, p. 344–352, dez. 2014.
- SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Artigo. **Química nova**, v. 37, n. 7, p. 1193–1198, 2014.
- SEDAGHAT DOOST, A. et al. Influence of non-ionic emulsifier type on the stability of cinnamaldehyde nanoemulsions: A comparison of polysorbate 80 and hydrophobically modified inulin. **Food Chemistry**, v. 258, p. 237–244, ago. 2018.
- SHAFIQ, S. et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 227–243, 2007.
- SHAH, P. et al. Formulation development of linagliptin solid lipid nanoparticles for oral bioavailability enhancement: role of P-gp inhibition. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 2020, n. 1, p. 1–20, 17 ago. 2020.
- SHARMA, A.; YADAV, B. S. Resistant starch: Physiological roles and food applications. **Food Reviews International**, v. 24, n. 2, p. 193–234, 2008.
- SIEPMAN, J. et al. Effect of the Size of Biodegradable Microparticles on Drug Release : Experiment and Theory Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release : experiment and theory. **Journal of Controlled Release** 96, v. 96, n. July 2016, p. 123–134, 2004.
- SILVA, T. et al. Alzheimer ' s disease , enzyme targets and drug discovery struggles : From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116–145, 2014.
- SIPOS, F. Physiological and pathological role of local and immigrating colonic stem cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 4, p. 295, 2012.
- SITU, W. et al. Preparation and characterization of glycoprotein-resistant starch complex as a coating material for oral bioadhesive microparticles for colon-targeted polypeptide delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 16, p. 4138–4147, 2015.
- SOARES, G. A. et al. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135–142, 2013.
- SOLANKI, N. G. et al. Effects of Surfactants on Itraconazole-HPMCAS Solid Dispersion Prepared by Hot-Melt Extrusion I: Miscibility and Drug Release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1453–1465, 2019.
- SONVICO, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67–73, 2006.
- SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 12, p. 2030–2075, dez. 2014.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96–100, 9 fev. 2012.

- SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 54–59, jan. 2010.
- SUN, L.-C. et al. Effects of camptothecin on tumor cell proliferation and angiogenesis when coupled to a bombesin analog used as a targeted delivery vector. **Anti-Cancer Drugs**, v. 18, n. 3, p. 341–348, mar. 2007.
- TARTA, C. et al. Angiogênese no carcinoma colorretal _ revisão e perspectivas. **Rev bras Coloproct**, v. 20, n. 4, p. 227–230, 2000.
- THAKUR, B. R. et al. Chemistry and uses of pectin — A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47–73, 1 fev. 1997.
- THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers q. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 91–101, 2001.
- THIRAWONG, N. et al. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132–140, ago. 2007.
- THOMAS, C. J.; RAHIER, N. J.; HECHT, S. M. Camptothecin: current perspectives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1585–1604, 2004.
- TILLY, H. Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4284–4289, 15 dez. 2003.
- TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 528, 1 jul. 2004.
- TRAN, T. H. et al. Development and Evaluation of Artesunate-Loaded Chitosan-Coated Lipid Nanocapsule as a Potential Drug Delivery System Against Breast Cancer. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 6, p. 1307–1316, 19 dez. 2015.
- VICTORELLI, F. D. et al. Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable in vivo model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 153, p. 273–284, ago. 2020.
- VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.
- WASUPALLI, G. K.; VERMA, D. Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan-sodium alginate based polyelectrolyte complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 10–17, 2018.
- WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 223–244, fev. 2018.
- YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373–385, ago. 2011.
- YIN WIN, K.; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713–2722, 2005.
- YUAN, Z. et al. Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance in colon cancer by cinobufagin. **Oncology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1815–1825, mar. 2017.
- YUCEL, U.; ELIAS, R. J.; COUPLAND, J. N. Journal of Colloid and Interface Science Localization and reactivity of a hydrophobic solute in lecithin and caseinate stabilized solid lipid nanoparticles and nanoemulsions. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 394, p. 20–25, 2013.
- ZHOU, Y. et al. Increased brain uptake of venlafaxine loaded solid lipid nanoparticles by overcoming the efflux function and expression of P-gp. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 7, p. 1325–1335, 8 jul. 2015.

ZOU, Q. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 8, p. 1672–1678, 2011.