

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
POTENCIAL ADMINISTRAÇÃO NASAL DA DISBa-01, UMA
DESINTEGRINA RECOMBINANTE DO VENENO DA SERPENTE
Rhinocerothis alternatus

CHARLENE PRISCILA KIILL

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Helena Bruno

ARARAQUARA – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA
POTENCIAL ADMINISTRAÇÃO NASAL DA DISBa-01, UMA
DESINTEGRINA RECOMBINANTE DO VENENO DA SERPENTE
Rhinocerothis alternatus

CHARLENE PRISCILA KIILL

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

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Helena Bruno

ARARAQUARA – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K48d Kiill, Charlene Priscila
Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para potencial
administração nasal da DISBa-01, uma desintegrina recombinante do
veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus* / Charlene Priscila Kiill. –
Araraquara, 2012
106 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Cristina Helena Bruno

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3. Desintegrina. 4. Gelificação
ionotrópica. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Bruno, Cristina
Helena, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

CHARLENE PRISCILA KIILL

“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA POTENCIAL ADMINISTRAÇÃO NASAL DA DISBa-01, UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DO VENENO DA SERPENTE *Rhinocerophis alternatus*”

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25/06/2012, considerou a candidata

Charlene Priscila Kiill:

() REPROVADA

(X) APROVADA

1) Examinadora (*Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos*) _____

2) Examinadora (*Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo*) _____

3) Presidente (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*) _____

Dedico em primeiro lugar a Deus, segundo aos meus pais e minha irmã por terem acreditado no meu sonho e por este ter se tornado realidade, tudo graças ao amor e esforços que me dedicaram.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me permitiu superar tantos obstáculos e no final obter tantas conquistas.

À minha mãe e ao meu pai, que me ensinaram que as conquistas não são fáceis de serem atingidas, muitos obstáculos haverá pela frente, e que devemos sempre seguir pelo caminho do bem sem fazer mal a ninguém. Agradeço também por todo amor, carinho, dedicação e cuidado que tens por mim.

À minha família, em especial a minha irmã, aos meus avós Maria Geni e Osvaldo, minha madrinha e avó Celestrina (*in memoriam*) por sempre acreditarem em mim, ao meu tio Edvaldo, por me incentivarem a seguir em frente, independente das dificuldades.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por toda a paciência e dedicação, por ter me recebido de braços abertos e ter confiado que eu seria capaz. Sou inteiramente grata por sua orientação e acima de tudo amizade. Meu respeito e admiração ultrapassam esta dissertação.

A Profa. Dra. Cristina Helena Bruno, minha co-orientador, pela sabedoria transmitida e pela amizade, além da colaboração nas análises de cultura de células. Meu muitíssimo obrigado.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com a DisBa-01, por toda a orientação prestada e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos por ter cedido as células para cultura celular e por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização destes ensaios.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela amizade e oportunas manifestações de companheirismo, além de muitas discussões sobre este trabalho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo e a técnica Andressa, do Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de São Paulo, pela colaboração nos estudos de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior e seu aluno de doutorado Wesley Renato Viali do Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, pelas análises de diâmetro médio e potencial zeta.

Ao técnico Mateus Scotri pelas análises de infravermelho realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Fármacos e medicamentos da UNESP – Araraquara.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi do Laboratório de Microscopia por Varredura de Alta Resolução do Instituto de Química da UNESP – Araraquara pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, em especial ao Tarek Fernandes pela imensa ajuda nas análises.

À Lívia, por ter realizado os experimentos em cultura de células, por toda paciência e dedicação, agradeço imensamente sua contribuição.

A Araceli, Kelli Micocci do Laboratório de Biologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, por ter me auxiliado com a DisBa-01 e com ensaios de cultura celular.

Aos meus amigos, Andréia Meneguim, Beatriz, Cristina Bruno, Cristina Franzini, Fabíola, Fernanda Carbinatto, Fernanda Kolenyak, Flávia Chiva, Flávio, Gabriela, Giovanna, Gisela, Gisele, Graziela, Gustavo, Hilris, Juliana Galli, Kelly, Lilian, Liliane, Márcia, Marcelo, Priscileila, pela alegre convivência, longas conversas, sugestões e, sobretudo, amizade. A vocês, meu muito obrigada!

A Mariana Barbi que aceitou o desafio de me auxiliar no desenvolvimento deste projeto quando ainda era aluna de iniciação científica, com muita disposição e cuidado.

Agradecimentos

À Ana Luiza, sempre tão dedicada e preocupada comigo. Obrigada pelos conselhos, por me ouvir, me ensinar e me guiar. Com certeza, sem essa sua cumplicidade e carinho tudo seria muito mais difícil. Sou muito grata pela sua amizade e cuidado!!!

Às minhas amigas Camila, Daniela, Luzinete, Michele, que apesar de não terem dividido o mesmo laboratório, e mesmo estando longe, sempre me apoiaram e participaram de cada conquista, me encorajando e torcendo. Obrigada pela amizade sincera de vocês.

À Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira e ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, pela amizade e incentivo.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, pelo auxílio e amizade, em especial à Margareth e à Fátima.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e dedicação.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos que eventualmente eu tenha esquecido de citar os nomes e que foram de extrema importância para a realização deste projeto.

*“Nunca deixe que lhe digam que
não vale a pena acreditar nos
sonhos que se têm ou que os seus
planos nunca vão dar certo ou que
você nunca vai ser alguém.”*

(Renato Russo)

RESUMO

Venenos de serpentes possuem propriedades que têm sido exploradas como alternativas terapêuticas. Entre as diversas classes de proteínas de venenos de serpentes que têm sido estudadas destacam-se as desintegrinas. Os efeitos biológicos das desintegrinas relacionam-se com suas ligações a receptores celulares sendo consideradas potentes inibidores de adesão celular, podendo ser utilizadas no combate de diversas patologias como, por exemplo, o câncer, trombose e osteoporose. A desintegrina-RGD monomérica, DisBa-01, foi recentemente identificada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Rhinocerosphis alternatus*. É uma proteína recombinante que interage especificamente com as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{11b}\beta_3$ exibindo potentes propriedades antimetastática, antiangiogênica e antitrombótica. Entretanto a aplicação de proteínas na terapêutica é limitada por diversas dificuldades que inclui a baixa estabilidade em fluídos fisiológicos, potencial imunogênico e alergênico, assim como a baixa biodisponibilidade. Para contornar estes problemas, tem-se buscado novos sistemas de liberação, como as nanopartículas de quitosana e vias alternativas para administração de proteínas, como por exemplo, a via nasal. Portanto neste trabalho estudou-se o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas de quitosana para potencial administração nasal de DisBa-01. Para isso as nanopartículas de quitosana foram desenvolvidas pelo método de gelificação ionotrópica, através da reticulação da quitosana com tripolifosfato de sódio. A caracterização físico-química demonstrou que a presença do quitosana 0,2 % (NPQS2); 0,3 % (NPQS3) e 0,5 % (NPQS5) (*m/v*) influenciou o diâmetro médio, a eficiência de encapsulação, assim como o potencial de superfície das partículas. O diâmetro médio e o potencial zeta das nanopartículas com DisBa-01 foram de 364,5 nm para NPQS2, 302,7 nm para NPQS3 e 644 nm para NPQS5. O potencial zeta da nanopartícula NPQS2 com DisBa-01 aumentou significativamente de +30 mV para +45.9 mV, assim como a NPQS3 que passou de +38.6 mV para +53.2 mV, por fim, NPQS5 passou de +44.6 para +49.6. A eficiência de encapsulação e capacidade de incorporação de DisBa-01 determinada por ensaio de BCA variaram de 34 a 71%.

Nos estudos de mucoadesão, as nanopartículas apresentaram-se mais mucoadesivas com o aumento do tempo de contato com a mucosa nasal suína comparada com polímeros já conhecidos por sua mucoadesão. A citotoxicidade de DisBa-01 e das nanopartículas foram investigadas em linhagem celular de K-562 (Linhagem de leucemia mielóide) e HUVEC (Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano). Foi observado que a DisBa-01, incorporada ou não nas nanopartículas não apresentou citotoxicidade. Também foi investigada a inibição da adesão de células K-562 e HUVEC, demonstrando que DisBa-01 incorporada ou não em nanopartículas promoveu a inibição da adesão das células tumorais de leucemia mielóide e de células endoteliais. Estes resultados sugerem que as nanopartículas de quitosana apresentam um grande potencial como sistema de liberação de proteínas.

ABSTRACT

Snake venoms have properties that have been exploited as therapeutic alternatives. Among the various classes of proteins from snake venoms that have been studied stand out the disintegrins. The biological effects of disintegrins relate to their connections to cellular receptors being considered inhibitors potent of cell adhesion, can be used in the diseases various combat, such as, cancer, thrombosis, and osteoporosis. The RGD-monomeric disintegrin, DisBa-01, was recently identified from a cDNA library made with RNAs from the venom gland of *Rhinocerophis alternatus*. It is a recombinant protein that interacts specifically with the $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrins showing potent properties antimetastatic, antithrombotic and antiangiogenic. However, the use of protein in the therapeutic is limited by several difficulties which includes the low stability in physiological fluids, immunogenic and allergenic potential, as well the low bioavailability. To overcome these problems, researchers have tried to new delivery systems, such as chitosan nanoparticles and alternative routes for administration of proteins, for example, nasal route. In this work we studied the development and characterization of chitosan nanoparticles for potential administration nasal of DisBa-01. For this, the chitosan nanoparticles have been developed by ionotropic gelation method, across crosslinking of chitosan with sodium tripolyphosphate. The physico-chemical characterization showed that the presence of chitosan influences the mean diameter, encapsulation efficiency and superficial charge of the nanoparticles. The nanoparticles shape varied in function of chitosan concentration, the better results being obtained with the lowest chitosan concentration. The mean diameter and zeta potential of the nanoparticles with DisBa-01 were 364.5 ± 14 to NPQS2, NPQS3 302.7 ± 4 to ± 12 and 644 to NPQS5. The zeta potential of the nanoparticles NPQS2 increased significantly from +30 mV to +45,9 mV, NPQS3 increased of +38.6 mV to +53.2 mV and finally NPQS5 +44.6 to +49.6. The encapsulation efficiency and capacity of incorporation DisBa-01 determined by BCA assay was between 34% and 71%. In the mucoadhesion studies, the nanoparticles showed the most mucoadhesive with increasing time of contact with the porcine nasal mucosa compared with polymers known for their

mucoadhesion. The cytotoxicity of Dis*Ba*-01 and nanoparticles were investigated in cell line K-562 (myeloid leukemia) and HUVEC (endothelial cells of human umbilical vein) it was observed that samples were not cytotoxic even when Dis*Ba*-01 was incorporated into nanoparticles. Finally, the test of inhibition of cell adhesion to HUVEC and K-562 showed that Dis*Ba*-01 and Dis*Ba*-01 in the nanoparticles, promoted the adhesion inhibition of myeloid leukemia tumor cells and endothelial cells. These results make the chitosan nanoparticles is a promising system for the release of proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Rhinocerophis alternatus</i>	20
Figura 2. Modelo estrutural da DisBa-01.....	24
Figura 3. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da DisBa-01.....	25
Figura 4. Esquema de inibição de integrinas pela DisBa-01.....	25
Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	29
Figura 6. Estrutura da QS e quitina.....	31
Figura 7. Reticulação da QS com TPP.....	34
Figura 8. Representação dos métodos de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas empregadas.....	45
Figura 9. Analisador de textura usado para medir o trabalho de mucoadesão e a força de destacamento.....	46
Figura 10. Esquema da metodologia para análise da mucoadesão das nanopartículas.....	46
Figura 11. Curva analítica de primeira derivada de NAG a 204 nm.....	49
Figura 12. Espectro de primeira derivada de soluções de NAG em diferentes concentrações na região do UV em 204 nm.....	50
Figura 13. Relação entre a concentração e viscosidade reduzida, usada para a determinação da viscosidade intrínseca	52
Figura 14. Efeito do pH da solução de TPP sobre a condutividade durante a reticulação da QS com TPP.....	53
Figura 15. Curva de titulação: efeito do pH do TPP	54
Figura 16. Classificação visual das amostras.....	55
Figura 17. Diagrama de fase dos sistemas formados classificados em: S = solução; DO = dispersão opalescente e A = agregados.....	56
Figura 18. (A) Estrutura química da QS, (B) reticulação da QS com TPP nas três regiões de formação das nanopartículas.....	57
Figura 19. Comparação dos diâmetros médios e índice de polidispersidade das nanopartículas obtidas pelo processo de gelificação ionotrópica.....	62

Figura 20. Comparação das técnicas de obtenção das nanopartículas através do potencial zeta.....	64
Figura 21. Efeito da liofilização sobre o diâmetro médio e potencial zeta das nanopartículas	66
Figura 22. Espectro de infravermelho do TPP.....	68
Figura. 23. Espectros de infravermelho de QS (A), NPQS2 (B), NPQS3 (C) e NPQS5 (D).....	68
Figura 24. Espectroscopia de dicroísmo circular de DisBa-01 em água.....	70
Figura 25. Espectroscopia de dicroísmo circular de DisBa-01 em solução de TPP.....	70
Figura 26. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS2 e NPQS2-DisBa-01.....	73
Figura 27. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS3 e NPQS3-DisBa-01.....	74
Figura 28. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS5 e NPQS5-DisBa-01.....	75
Figura 29. Potencial zeta das nanopartículas com e sem DisBa-01.....	76
Figura 30. Espectros de infravermelho da NPQS2, NPQS2-DisBa-01, NPQS3, NPQS3-DisBa-01, NPQS5 e NPQS5-DisBa-01	77
Figura 31. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS2 e NPQS2-DisBa-01 no aumento de 50.000x	78
Figura 32. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS3 e NPQS3-DisBa-01 no aumento de 50.000x	79
Figura 33. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS5 e NPQS5-DisBa-01 no aumento de 50.000x	79
Figura 34. Curva padrão de BSA, obtida por espectroscopia do UV-visível a 562 nm.....	80
Figura 35. Força máxima de destacamento das nanopartículas sobre a mucosa nasal suína.....	81
Figura 36. Trabalho de mucoadesão das nanopartículas sobre a mucosa nasal suína.....	84
Figura 37. Viabilidade celular das células K-562 em 24 horas de ensaio.....	85
Figura 38. Viabilidade celular das células HUVEC em 24 horas de ensaio.....	86
Figura 39. Porcentagem de células K-562 aderidas a placas recobertas com	

Lista de Figuras

fibronectina	87
Figura 40. Porcentagem de células HUVEC aderidas a placas recobertas com vitronectina	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de desintegrinas e atividade sobre as células tumorais.....	23
Tabela 2. Polímeros utilizados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas.....	30
Tabela 3. Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida das soluções de QS.....	51
Tabela 4. Estudo das concentrações finais adequadas de QS e TPP após formação das nanopartículas.....	58
Tabela 5. Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de todas as nanopartículas preparadas por bomba peristáltica	59
Tabela 6. Diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanopartículas pelo processo de gelificação ionotrópica.....	63
Tabela 7. Potencial zeta de DisBa-01.....	71
Tabela 8. Diâmetro médio e Pdl das nanopartículas com DisBa-01.....	72
Tabela 9. Avaliação da eficiência de incorporação e capacidade de incorporação das nanopartículas com DisBa-01.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA - Ácido bicinchonico

DisBa-01 - Desintegrina *Bothrops alternatus*

FTIR - Infravermelho por transformada de Fourier

GD - Grau de desacetilação

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NAG - N-acetilglicosamina

NPQS2 - Nanopartículas com 2 mg.mL⁻¹ de quitosana e 1 mg.mL⁻¹ de TPP

NPQS3 - Nanopartículas com 3 mg.mL⁻¹ de quitosana e 1 mg.mL⁻¹ de TPP

NPQS5 - Nanopartículas com 5 mg.mL⁻¹ de quitosana e 1 mg.mL⁻¹ de TPP

NPQS2-DisBa-01 - Nanopartículas com 2 mg.mL⁻¹ de quitosana e 150 µg de DisBa-01

NPQS3-DisBa-01 - Nanopartículas com 3 mg.mL⁻¹ de quitosana e 150 µg de DisBa-01

NPQS5-DisBa-01 - Nanopartículas com 5 mg.mL⁻¹ de quitosana e 150 µg de DisBa-01

QS - Quitosana

RGD - Sequência de aminoácidos Arginina, Glicina, Ácido aspartático

TPP - Tripolifosfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Venenos de Serpentes	20
1.1.1. Desintegrinas.....	21
1.2. Via de administração nasal.....	26
1.3. Proteínas e Sistemas de Liberação Nanoestruturados.....	27
1.3.1. Nanopartículas de Quitosana.....	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. MATERIAIS.....	36
3.1.1. Substâncias e Reagentes.....	36
3.1.2. Equipamentos e Acessórios.....	36
3.2. MÉTODOS.....	37
3.2.1. Caracterização da quitosana.....	37
3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas.....	39
3.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas	41
3.2.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade (Pdl) das nanopartículas.....	41
3.2.3.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas.....	41
3.2.3.3. Determinação da morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
3.2.3.4. Caracterização física da QS, TPP, nanopartículas sem e com DisBa- 01 por infravermelho por transformada de Fourier	42
3.2.4. Caracterização da DisBa-01.....	42
3.2.5. Avaliação da eficiência e capacidade de incorporação de DisBa-01 nas nanopartículas.....	43
3.2.6. Avaliação da mucoadesão das nanopartículas.....	45
3.2.7. Avaliação da viabilidade celular de células K-562 e HUVEC pela	

técnica do MTT.....	46
3.2.7.1. Avaliação da inibição da adesão de células K-562 e HUVEC.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Caracterização da quitosana.....	49
4.2. Desenvolvimento das nanopartículas.....	55
4.3. Caracterização físico-química das nanopartículas	58
4.3.1. Distribuição granulométrica das nanopartículas.....	58
4.3.2. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade das nanopartículas	61
4.3.3. Determinação do potencial zeta das nanopartículas	64
4.3.4. Efeito da liofilização sobre as nanopartículas	65
4.3.5. Caracterização física da QS, TPP e nanopartículas sem DisBa-01 por infravermelho por transformada de Fourier	67
4.4. Caracterização da DisBa-01.....	69
4.4.1. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	69
4.4.2. Avaliação do potencial zeta da DisBa-01.....	71
4.5. Caracterização físico-química das nanopartículas com DisBa-01.....	72
4.6. Avaliação dos métodos de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas por meio da eficiência e capacidade de incorporação.....	80
4.7. Avaliação da mucoadesão das nanopartículas.....	82
4.8. Avaliação da viabilidade celular de células K-562 e HUVEC pela técnica do MTT.....	85
4.9. Avaliação da inibição da adesão de células K-562	86
4.10. Avaliação da inibição da adesão de células HUVEC	88
5. CONCLUSÕES.....	90
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. VENENOS DE SERPENTES

A *Rhinocerophis alternatus* antigamente classificada por *Bothrops alternatus*, pertence à família *Viperidae*, sub-família *Crotalinae* é mais conhecida como urutu ou cruzeira. Sua ocorrência é na região Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, é encontrada também na região central da Argentina e limite meridional do Uruguai, ocupando predominantemente áreas abertas (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Esta serpente é terrestre, possui o corpo robusto e pode atingir 1,7 metros de comprimento (Figura 1).

Figura 1. *Rhinocerophis alternatus*.



CAMPBELL; LAMAR, 1989.

Do veneno desta serpente foram isoladas, a Balterobin, enzima tipo-trombina (SMOLKA *et. al.*, 1998) e a Bothroalternin (27 kDa) que inibe a agregação plaquetária e coagulação do fibrinogênio (CASTRO *et al.*, 1998) e mais recentemente, a DisBa-01 (11,67 kDa), apresentando potenciais propriedades antimetastática, antitrombótica e antiangiogênica (RAMOS, 2005).

Cerca de 3200 espécies de serpentes são conhecidas atualmente, mas, apenas uma minoria (cerca de 200 espécies) pode causar envenenamento em humanos. Na América Latina, a maioria das espécies venenosas pertence à família

Crotalidae e *Viperidae* e seus venenos constituem ricas fontes de compostos ativos na hemostasia (ROMANO-HOGE, 1990).

O Brasil possui uma grande biodiversidade, fornecendo uma valiosa oportunidade de exploração de moléculas bioativas para a descoberta e produção de novos fármacos.

Venenos de serpentes possuem propriedades que têm sido exploradas com fins terapêuticos e como ferramentas para o estudo de vários processos biológicos, tais como a adesão, agregação, migração, proliferação celular e angiogênese.

Os componentes originais de venenos de serpentes não podem ser utilizados como terapêuticos, contudo modificações pela química, química farmacêutica e tecnologia farmacêutica têm possibilitado o uso de proteínas de venenos de serpentes. Um dos melhores exemplos da aplicação dessas substâncias derivadas de venenos é o captopril, fármaco amplamente utilizado contra hipertensão cujo princípio ativo é derivado de um inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina, IECA, encontrado no veneno da *Bothrops jararaca*.

1.1.1. Desintegrinas

Entre as diversas classes de proteínas de venenos de serpentes que têm sido estudadas destacam-se as desintegrinas, cujos efeitos biológicos relacionam-se com ligações a receptores celulares e são potentes inibidores de agregação plaquetária e de adesão celular (CALVETE *et al.*, 2005). Trabalhos têm demonstrado resultados interessantes na inibição do desenvolvimento de metástases, sugerindo a utilização dessas moléculas como uma alternativa terapêutica para neoplasias, pois são capazes de se ligar em integrinas superexpressas em células tumorais impedindo a adesão, migração e proliferação celular destas células a matriz extracelular (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; SHEU *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2000).b

O termo desintegrina foi usado pela primeira vez em 1989 para descrever um grupo de moléculas de baixo peso molecular, ricos em cisteína, derivados de venenos de serpentes, as quais interagem com receptores da superfície celular

(DENNIS; HENZE; PITTI, 1990; GOOD *et al.*, 1990; HUANG, 1998; McLANE *et al.*, 1998; NIEWIAROWISK *et al.*, 1994).

As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária, algumas possuem a sequência adesiva RGD (arginina, glicina, ácido aspartático) através da qual se ligam especificamente ao receptor de fibrinogênio e glicoproteína IIb/IIIa encontrada em membrana de plaquetas (integrina α_{IIb}/β_3), o que resulta na inibição da agregação plaquetária dependente de fibrinogênio, além de se ligar a outras integrinas RGD-dependentes como a integrina $\alpha_V\beta_3$ e a $\alpha_5\beta_1$ (HUANG; NIEWIAROWSKI, 1994).

As desintegrinas de veneno de serpentes são da família das metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPS) e são classificadas de acordo com sua estrutura e multidomínio em PI, PII e PIII. Membros da classe PI são formados somente por um domínio metaloprotease, enquanto as desintegrinas tipo P-II, apresentam uma metaloproteinase e um domínio desintegrina. As desintegrinas do tipo P-III originam as desintegrina-like, são formadas por ligação covalente desintegrina-like e domínios ricos em cisteínas (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2008).

Várias desintegrinas derivadas de SVMPS, do tipo P-II, são capazes de inibir a adesão de células de linhagens tumorais. Durante o processo de invasão e metástase, as células tumorais invadem a membrana basal, sendo um dos eventos adesivos mais importantes na formação da metástase. A adesão ao endotélio vascular expõe a membrana basal endotelial que possui uma variedade de proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina e laminina (TARIN, 1985). A capacidade das desintegrinas de se ligar as integrinas presentes nas células de linhagens tumorais e a inibição da adesão destas células as proteínas presentes na matriz extracelular faz com que muitas desintegrinas sejam capazes de inibir metástases (COMINETTI, 2004).

A desintegrina eritostatina foi estudada em um modelo de metástase experimental empregando as células tumorais MV3, que são altamente invasivas, na veia caudal de camundongos. Observou-se que a desintegrina foi capaz de inibir em 87 % a formação de metástases pulmonares (DANEN *et al.*, 1998). Outra desintegrina estudada foi a salmosina, que foi capaz de inibir a adesão de células de

melanoma B16F10 à fibronectina, vitronectina e colágeno tipo I e IV de maneira dose dependente. O efeito da salmosina na supressão da metástase tumoral está relacionada com a inibição da adesão das células B16F10 às proteínas da matriz extracelular através do bloqueio das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_1$ na superfície destas células (KANG *et al.*, 1998).

Derivados de desintegrinas, também estão sendo desenvolvidos e estudados para combater o câncer. O pentapeptídeo cíclico RGD cilengitide também conhecido como EMD121974, é um inibidor das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ e está em fase III de estudo devido as suas propriedades antiangiogênicas e anticancerígenas (STUPP *et al.*, 2007).

Na tabela 1 temos outros exemplos de desintegrinas de venenos de serpentes que têm sido estudadas e a atividade que exercem sobre as células tumorais.

Tabela 1. Tipos de desintegrinas e atividade sobre as células tumorais.

Desintegrina	Motivo adesivo	Integrina ligante	Atividade inibitória	Referência
Salmosina 2	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Angiogênese	KANG <i>et al.</i> , 1998
Flavoridina	RGD	$\alpha_5\beta_1$	Melanoma de pulmão (metástase)	OLIVA <i>et al.</i> , 2007
Trigramina	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Metástase de osso	YANG <i>et al.</i> , 2005
Eristostatina	RGD	$\alpha_{11b}\beta_3$	Melanoma (metástase)	DANEN <i>et al.</i> , 1998
DisBa-01	RGD	$\alpha_v\beta_3$	Melanoma (metástase)	RAMOS <i>et al.</i> , 2008
Cilengitide	RGD	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$	Glioblastoma	STUPP <i>et al.</i> , 2007

Adaptado de Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010.

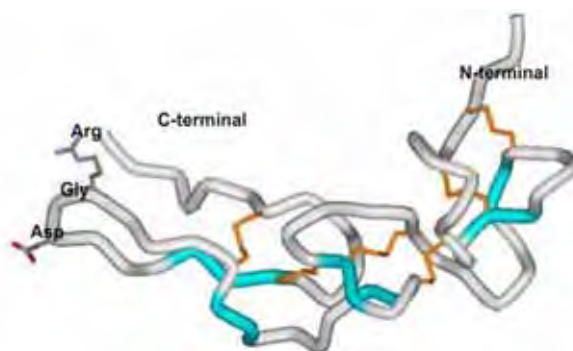
As desintegrinas de venenos de serpentes apresentam um enorme potencial para estudos básicos de reconhecimento celular em metástases e angiogênese,

bem como potencial terapêutico (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; GENTILUCCI *et al.*, 2010; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009).

DisBa-01

Da glândula venenífera de um espécime de *Rhinocerophis alternatus*, foram extraídos ácidos ribonucléicos mensageiros (mRNAs) e utilizando a tecnologia do DNA recombinante através da fusão His-Tag, foi obtida a desintegrina recombinante DisBa-01, que é derivada de uma metaloproteinase de tipo P-II e possui massa molecular de 11,637 kDa, podendo ser produzida de forma heteróloga em bactérias e posteriormente purificada (KAUSTOT *et al.*; 2008; RAMOS, 2005). A figura 2 ilustra a estrutura molecular da DisBa-01.

Figura 2. Modelo estrutural da DisBa-01.



RAMOS, 2005.

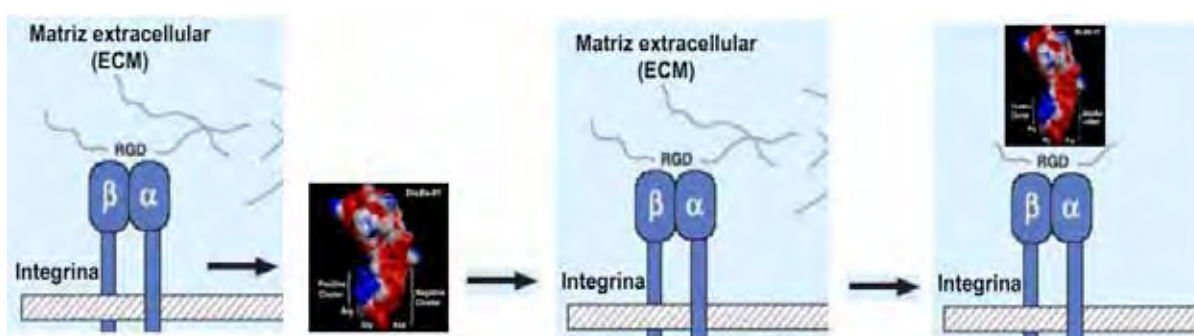
A DisBa-01 apresenta uma estrutura terciária composta por 78 resíduos de aminoácidos conectados por seis pontes de dissulfeto, o que a classifica na classe das desintegrinas médias e possui o motivo adesivo arginina, glicina, ácido aspartático (RGD), como é mostrado na figura 3 (RAMOS *et al.*, 2008).

Figura 3. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da DisBa-01.

pET28a fusion peptide		
1	ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG	90
1	M G S S H H H H H S S G L V F R G S H M A S M T G G Q Q M	30
DisBa-01		
91	GGT CGC GGA TCC GGA AAT GAA CTT TTG GAG GCG GGA GAA GAA TGT GAC TGT GGC ACT CCT GGA AAT CCG TGC TGC GAT GCT GCA ACC TGT	180
31	G R G S I G N E L L E A G E E C D C G T P G N P C C D A A T C	60
181	AAA CTG AGA CCA GGG GCG CAG TGT GCA GAA GGA CTG TGT TGT GAC CAG TGC AGA TTT ATG AAA GAA GGA ACA GTA TGC CGG ATT GCA AGG	270
61	K L R P G A Q C A E G L C C D Q C R F M K E G T V C R I A R	90
271	GGT GAT GAC ATG GAT GAT TAC TGC AAT GGC ATA TCT GCT GGC TGT CCC AGA AAT CCC TTC CAT GCC TAA	339
91	G D D M D D Y C N G I S A G C P R N P F H A F	105

RAMOS *et al.*, 2008.

Esta desintegrina possui alta afinidade pelas integrinas $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, que são proteínas envolvidas na formação de tumores e trombose (RAMOS *et al.*, 2008). A $\alpha_V\beta_3$ é expressa em vasos sanguíneos de diversos tumores humanos e em regiões amplamente inflamadas ou em cicatrização, mas está em níveis muito reduzidos ou mesmo ausente nos tecidos humanos normais (GENTILUCCI *et al.*, 2010). Esta integrina parece estar relacionada ao controle do crescimento celular, sobrevivência e migração de células tumorais durante a angiogênese (AVRAAMIDES; GARMY- SUSINI; VARNER, 2008; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009).

Figura 4. Esquema de inibição de integrinas pela DisBa-01.

(Adaptado de GIANCOTTI, RUOSLAHTI, 1999).

Estudos demonstraram que a DisBa-01 inibe significativamente a proliferação de células endoteliais de capilares da derme HMEC-1, inibe a adesão a vitronectina e reduz significativamente a implantação de metástases pulmonares de melanoma

B16F10, além de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e fibrinogênio *in vitro*, diminuindo o tempo de oclusão trombótica e sangramento *in vivo* através da interação com a integrina $\alpha_V\beta_3$ (KAUSKOT *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009; RAMOS *et al.*, 2008). Também avaliou-se o efeito de DisBa-01 sobre células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231. DisBa-01 inibiu fortemente a adesão tumoral de MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, possivelmente devido a ativação de $\alpha_V\beta_3$ por fluxo que pode ter reforçado as interações com DisBa-01 (RIBEIRO, 2009).

Em estudos recentes, Montenegro e colaboradores (2012) demonstraram que DisBa-01 adere a fibroblastos e células de câncer de mama (MDA-MB-231) e inibe a adesão destas células no colágeno tipo I sob condições de fluxo, simulando o fluxo sanguíneo. Além disso, DisBa-01 diminui fortemente a liberação de mRNA de VEGF e dos seus receptores (VEGFR1 e VEGFR2) em células endoteliais. Segundo os autores, estes resultados demonstram que a inibição de integrinas por DisBa-01 pode resultar em bloqueio da angiogênese e inibição do tumor.

1.2. VIA DE ADMINISTRAÇÃO NASAL

Apesar da via oral ser muito utilizada na administração de fármacos, a via nasal tem suscitado grande interesse como rota alternativa para administração de fármacos e biomoléculas que são suscetíveis à degradação ácida e/ou enzimática ou que apresentam metabolismo pré-sistêmico, como é o caso das proteínas (GAVINI *et al.*, 2008).

A mucosa nasal apresenta grandes vantagens para a absorção sistêmica de proteínas, pois apresenta epitélio com microvilosidades e uma grande área superficial, além de características como camada subepitelial altamente vascularizada e membrana basal com endotélio poroso, facilitando a permeação do fármaco, que pode ser absorvido diretamente na circulação sistêmica sem sofrer metabolização pré-sistêmica, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, diminuição de efeitos adversos do fármaco e aumento da adesão ao tratamento (MAINARDES *et al.*, 2006).

Apesar das vantagens desta via, há algumas barreiras que limitam a absorção nasal de fármacos. Essas barreiras incluem os mecanismos de depuração mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal, além da degradação enzimática que pode acontecer tanto no lúmen da cavidade nasal como na passagem através da barreira epitelial. Outros fatores que limitam a absorção nasal de fármacos são a baixa permeabilidade do epitélio nasal que dificulta a absorção de fármacos polares ou de alta massa molecular, como os peptídeos e proteínas, o pH do sistema que deve ser compatível com o da cavidade nasal e o baixo volume que pode ser administrado (MAINARDES *et al.*, 2006). Uma estratégia utilizada para retardar a remoção da formulação pela depuração mucociliar é a utilização de sistemas mucoadesivos, que aumentam o tempo de contato entre a formulação e o local de absorção na cavidade nasal (ILLUM, 2003).

Moléculas catiônicas como a QS têm sido utilizadas no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos, pois podem interagir com a superfície de absorção da mucosa nasal, a qual é carregada negativamente em pH fisiológico, devido à natureza química das membranas celulares e das moléculas de mucina (WOODLEY, 2001).

O muco contém mucina, que apresenta vários constituintes químicos, dentre eles o ácido siálico. Em pH fisiológico, o ácido siálico apresenta carga negativa, com isso, a QS e a mucina podem apresentar fortes interações eletrostáticas. Essa observação é base do mecanismo proposto para mucoadesão de polímeros catiônicos, como a QS, cuja mucoadesão é estabelecida pelas interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina presente no muco, além de promover a absorção de moléculas hidrofílicas pela promoção da reorganização estrutural das proteínas associadas às junções intercelulares (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007).

1.3. PROTEÍNAS E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANOESTRUTURADOS

A administração de proteínas na terapêutica é limitada, principalmente, pela intensa degradação enzimática nos fluidos biológicos e fraca permeabilidade através das membranas biológicas. Para contornar os problemas relacionados com a

estabilidade das proteínas e a conseqüente perda de atividade, pesquisadores começaram a explorar sistemas de liberação de fármacos como lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas que podem ser administrados por via oral, vaginal, retal, pulmonar e nasal. Os sistemas de liberação nanoestruturados representam uma estratégia interessante para administração de fármacos protéicos, pois podem protegê-los contra degradação e possibilitar liberação no local específico de ação em uma taxa controlada (KANG; CHO; YOO, 2009).

Lestine e colaboradores (2002) desenvolveram lipossomas para a liberação de fármacos em doenças cardiovasculares, utilizando peptídeos contendo a sequência adesiva ácido aspártico-arginina-glicina (RGD) para o direcionamento de integrinas GPIIb-IIIa envolvidas na doença cardiovascular restenose. Stevenson e colaboradores (2005) desenvolveram sistemas líquidos cristalinos e microemulsões para a incorporação e liberação controlada de insulina e vacinas de DNA. As nanopartículas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de hormônio do crescimento (GH ou somatotrofina) e insulina para administração nasal (CHALASANI *et al.*, 2007; VERENA *et al.*, 2004).

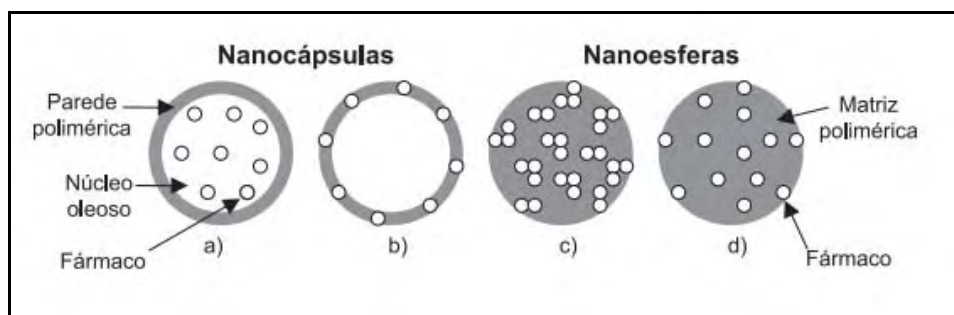
Mais recentemente, o primeiro teste clínico com nanopartículas poliméricas contendo docetaxel para o tratamento do câncer foi realizado nos Estados Unidos e os resultados foram publicados na revista médica americana *Science Translational Medicine*. O teste clínico de fase I foi realizado com um pequeno grupo de 17 pacientes que sofriam de diferentes tipos de câncer em estágio avançado. O teste demonstrou que uma paciente teve redução do tumor no colo do útero, enquanto outros cinco tiveram seus cânceres (de pâncreas, ânus, cólon, vias biliares e garganta) estabilizados. Portanto as nanopartículas produziram efeitos favoráveis contra os tumores, inclusive com doses pequenas de fármaco, que representavam até 20% do que normalmente se prescreve em quimioterapia tradicional por via oral ou intravenosa, sendo uma ferramenta promissora para o tratamento do câncer (HRKACH *et al.*, 2012).

Dentro do contexto da nanotecnologia farmacêutica, as nanopartículas poliméricas se mostram como eficientes sistemas para promover liberação controlada de fármacos protéicos (MAINARDES *et al.*, 2006). As nanopartículas

foram introduzidas nos anos 70 como potenciais carreadores para liberação controlada de fármacos por Kreuter e Speiser (1976) utilizando, na época, polímeros não biodegradáveis. A aplicação de nanopartículas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos foi reavaliada na década de 80, após o advento da síntese de polímeros biodegradáveis pela equipe de Couvreur e colaboradores (COUVREUR; KANTE; ROLAND, 1978; COUVREUR, 1985; COUVREUR *et al.*, 1989). Posteriormente, outros grupos de pesquisas desenvolveram sistemas nano e microparticulados contendo diferentes substâncias ativas tais como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, partículas virais e vacinas (DAMGÉ *et al.*, 1997; KUBIK; BOGUNIA-KUBIK; SUGISAKA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2004; FERDUS; STEMBRIDGE; SINGH, 1998; WARGAFTIG, 2000), bem como fármacos como antibióticos, analgésicos, imunossupressores e anticancerígenos (FATTAL *et al.*, 1998; MOLPECERES; ABERTURAS; GUZMAN, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a, TOBÍO *et al.*, 1998; YOO *et al.*, 1999).

As nanopartículas apresentam diâmetro inferior a 1000 nm e o termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Por outro lado, as nanoesferas, são formadas por uma matriz polimérica, em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso em seu interior e desta forma obtém-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a).

Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a.

A escolha do polímero é um dos fatores mais importantes na preparação das nanopartículas, sendo os biodegradáveis os mais indicados para compor matrizes ou cápsulas de sistemas nanoparticulados.

Os sistemas de liberação nanoestruturados poliméricos agem como compartimentos transportadores de substâncias ativas e apresentam vantagens que justificam sua aplicação, dentre elas, a boa estabilidade física, química e biológica e boa reprodutibilidade, além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias visando melhorar suas propriedades químicas. Outro fator importante é que o material que compõe as partículas produza metabólitos não-tóxicos e seja degradado facilmente (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a).

A tabela 2 nos mostra exemplos de vários polímeros que têm sido usados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas e os diferentes fármacos utilizados.

Tabela 2. Polímeros utilizados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas.

Polímero	Fármaco	Referência
PLGA	siRNA	CUN <i>et al.</i> , 2011
PLA-PEG	zidovudina	MAINARDES; KHALIL; GREMIÃO, 2010
PCL	α - tocoferol	BYUN <i>et al.</i> , 2011
PLA/Quitosana	lamivudina	DEV <i>et al.</i> , 2010
PLGA	siRNA	JENSEN <i>et al.</i> , 2010
Quitosana	tacrina	BARNABAS <i>et al.</i> , 2010

PLGA (Poliéster de Ácido Láctico-Co-Glicólico), **PLA** (Ácido polilactato), **PEG** (Polietilenoglicol), **PCL** (poli(ϵ -caprolactona).

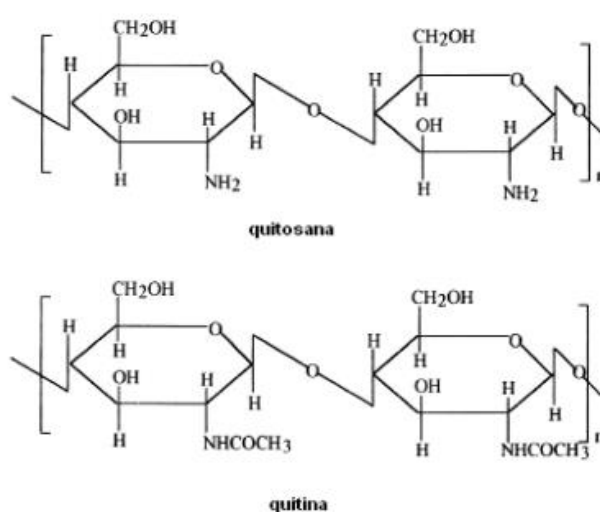
1.3.1. Nanopartículas de quitosana

Vários polímeros têm sido empregados no desenvolvimento de nanopartículas, dentre eles a quitosana (QS), polímero semi-sintético obtido da desacetilação da quitina (AMIDI *et al.*, 2006; AMIDI *et al.*, 2007; CERCHIARA *et al.*, 2005; DYER *et al.*, 2002; FUNDUEANU *et al.*, 2004; GAVINI *et al.*, 2006; GAVINI *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2007; KRAULAND; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2006; SOANE *et al.*, 2001).

A descoberta da QS data do século XIX. No entanto, somente nas últimas duas décadas a importância deste polímero tem crescido significativamente em função de ser uma fonte renovável, devido a sua propriedade biodegradável e, também, por causa do recente aumento em aplicações tecnológicas e farmacêuticas (AJUN *et al.*, 2009).

A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, composto pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (Figura 6). Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química (HEIN *et al.*, 2008).

Figura 6. Estrutura da QS e quitina.



SILVA, 2006.

A insolubilidade da quitina é o fator limitante da sua utilização, por isso, a QS é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino, podendo facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. Os grupamentos amino e as hidroxilas da QS estão relacionados às características de solubilidade e reatividade que esse polímero apresenta. A QS é uma base fraca com valor de pKa do resíduo D-glicosamina em torno de 6,5, sendo portanto, insolúvel

em meios neutro e alcalino (AMIDI *et al.*, 2006; AMIDI *et al.*, 2007; BARNABAS *et al.*, 2010; BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007; CALVO *et al.*, 1997; CERCHIARA *et al.*, 2005; LARANJEIRA; FAVERE, 2009).

A QS possui várias aplicações na área alimentícia, cosmética e tem atraído grande interesse na área farmacêutica como excipiente em formulações e tem sido muito utilizada no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados poliméricos para a liberação de fármacos (LARANJEIRA; FAVERE, 2009).

O uso da QS nos sistemas de liberação nanoestruturados tem atraído a atenção devido a suas propriedades bioadesivas. A protonação da QS em pH fisiológico pode promover a interação eletrostática com cargas negativas das superfícies celulares, caracterizando o mecanismo de bioadesividade, quando esta interação é restrita a camada de muco, o termo mucoadesividade é empregado (MUZZARELLI, 1997).

O potencial das nanopartículas de QS tem sido reforçado por sua capacidade de abrir transitoriamente as junções oclusivas entre as células epiteliais, permitindo transporte intercelular de fármacos polares como, vacinas, DNA, peptídeos e proteínas, sendo, portanto, considerado promotores de absorção, aumentando, assim, a biodisponibilidade dessas substâncias. A capacidade de abrir junções também se deve à natureza catiônica da QS, cujos grupamentos amino protonados interagem com os sítios carregados negativamente nas superfícies celulares (DAVIS, 1999; JUNGINGER; VERHOEF, 1998). Por isso, é de grande interesse a utilização de nanopartículas de QS para administração nasal de fármacos de origem protéica, pois as interações da QS com muco podem resultar em um tempo maior de permanência no sítio de absorção, podendo promover aumento da biodisponibilidade.

Difusas técnicas são descritas na literatura para o preparo de micro e nanopartículas de QS e seus derivados, e dentre elas a secagem por atomização (*spray-drying*), emulsificação, coacervação/precipitação e gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio (TPP) (AMIDI *et al.*, 2006; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007; DYER *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2005; LAUS *et al.*, 2006; SADEGHI *et al.*, 2008).

Secagem por Atomização (Spray Drying)

Esse método baseia-se na dissolução da QS em uma solução aquosa em pH ácido, o fármaco é dissolvido ou disperso no mesmo solvente usado para dissolver o agente reticulante. Esta dispersão é atomizada, na forma de pequenas gotas, dentro de uma câmara de secagem aquecida. A água é evaporada rapidamente, formando um pó seco (PENICHE *et al.*, 2003).

Emulsificação/ Evaporação do solvente

Na técnica da emulsificação, as partículas são formadas pela dispersão de uma solução aquosa de QS em óleo contendo um tensoativo, formando uma emulsão óleo-em água (O/A). As gotículas da fase oleosa podem ser precipitadas pela adição de um ânion polivalente como o TPP, como agente de reticulação. Após a precipitação, o solvente é evaporado e as nanopartículas em suspensão são separadas. O fármaco a ser incorporado usualmente é adicionado na solução de QS antes da obtenção da emulsão.

O tamanho e a morfologia das partículas dependerão de múltiplos fatores, tais como: temperatura, velocidade de agitação, concentração da QS, concentração do tensoativo, viscosidade das fases, configuração do reator e do agitador (AGNIHOTRI; NADAGOUDA; AMINABHAVI, 2004; SINHA *et al.*, 2004).

Coacervação/Precipitação

De acordo com Peniche e colaboradores (2003), a técnica da coacervação envolve a separação de uma solução polimérica diluída em duas fases coexistindo: uma fase rica em polímero e outra muito diluída. A coacervação pode ser classificada em simples ou complexa. Na coacervação simples, o colóide hidrofílico é subtraído do solvente pela adição de uma substância hidrofílica concorrente, tal como um sal ou álcool ("salting out").

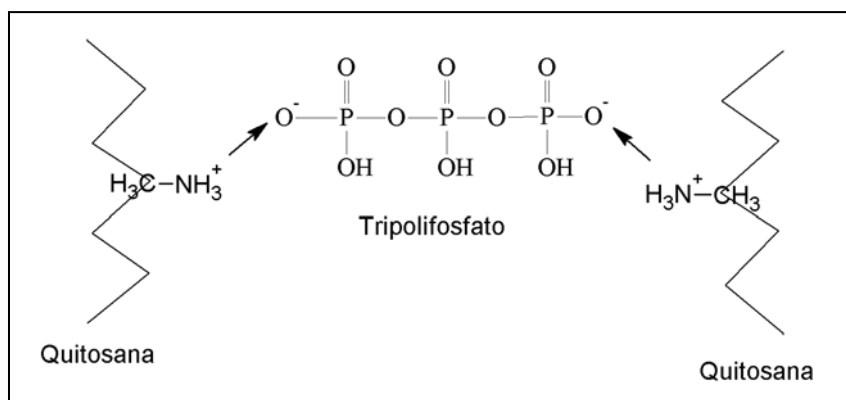
A coacervação complexa é produzida pela mistura de dois polieletrólitos de cargas opostas. O polieletrólito complexo (também chamado de coacervato complexo) se separa numa fase rica em polímero que coexiste com uma fase muito diluída. Há a formação de um filme insolúvel ou barreira que cobre a

nano/micropartícula. As partículas podem ser formadas tanto pelo gotejamento da solução de QS à solução do outro polímero (como por exemplo: carboximetilcelulose, alginato, pectina) ou o procedimento contrário (PENICHE *et al.*, 2003).

Gelificação Ionotrópica

Uma propriedade da QS muito interessante é sua habilidade de geleificar em contato com poliânions específicos. Esse processo de gelatinização se deve a reticulação inter e intramolecular mediada por poliânions (Figura 7). O método de gelificação ionotrópica é um dos métodos mais utilizados na obtenção de nanopartículas de QS (CALVO *et al.*, 1997). Essa técnica envolve a adição, a temperatura ambiente, de um poliânion como o TPP em uma solução (pH 4-6) de QS. As nanopartículas são formadas imediatamente após a mistura das duas fases através de ligações intra e intermoleculares formadas entre os grupamentos fosfato do TPP e os grupos amino da QS.

Figura 7. Reticulação da QS com TPP.



CALVO *et al.*, 1997.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas de QS pelo processo de gelificação ionotrópica, incorporar a desintegrina DisBa-01 em nanopartículas e avaliar a atividade em células tumorais e não tumorais.

ETAPAS PARA ALCANÇAR O OBJETIVO PROPOSTO

- Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas de quitosana;
- Incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas e caracterização físico-química após a incorporação desta desintegrina;
- Avaliação da força mucoadesiva das nanopartículas;
- Avaliação do efeito da DisBa-01 incorporada ou não em nanopartículas de quitosana, sobre a viabilidade celular e inibição da adesão em linhagens celulares de células K-562 (Linhagem de leucemia mielóide) e HUVEC (Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano).

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

3.1.1. Substâncias e Reagentes

- A desintegrina recombinante DisBa-01, foi gentilmente cedida pela professora Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar);
- Linhagem celular K-562 (ATCC-CCL 243);
- Linhagem celular HUVEC (ATCC-PCS-100-010);
- Mucina de suínos, tipo II (Sigma- Aldrich)
- Quitosana de baixa massa molecular (Sigma Aldrich);
- Tripolifosfato de Sódio (LabSynth).

3.1.2. Equipamentos e Acessórios

- Agitador Mecânico (Marconi);
- Analisador de partículas *Light Scattering* – Brookhaven Instruments Corporation, modelo EMI 9863 - Fonte de Laser He-Ne 10 mW, 514 e 532 nm;
- Analisador de partículas Zetasizer Nano series Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator (metodologia de análise - MIE);
- Analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®);
- Bomba peristáltica (Pharmaco Biotech) – Pump P1;
- Centrífuga (Beckman Coulter), modelo Avanti Centrifuge J25;
- Espectrofotômetro de arranjo de diodo UV-Vis (Hewlett Packard®- mod. 8453);
- Espectrofotômetro por transformada de Fourier (FT-IV Prestige-21);
- Liofilizador (Edwards), modelo Modulyo;
- Microscópio de Varredura (Jeol JSM 7500 F);
- Microviscosímetro automático AMVn (Anton Paar);
- pHmetro Digital (Gehaka- PG 1800).

MÉTODOS

3.2.1. Caracterização da quitosana

3.2.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Para a realização dessa análise foi utilizada QS e N-acetilglicosamina (NAG) dissolvidas em ácido acético. Para verificar a interferência do ácido acético no espectro de absorção das amostras, foram preparadas três soluções nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,03 mol.L⁻¹.

Para determinação do grau de desacetilação da QS foi necessário a obtenção da curva de calibração da NAG e para isso foi preparada uma solução estoque de 200 µg.mL⁻¹ em solução de ácido acético 0,01 mol.L⁻¹ da qual foram preparadas diferentes concentrações (5, 10, 20, 30 e 40 µg.mL⁻¹) e observado a convergência dos espectros para um ponto comum, chamado de ponto isobéptico.

Para quantificação dos grupos acetil nas amostras de QS, foram preparadas dispersões de QS na concentração de 40 µg.mL⁻¹ em solução de ácido acético 0,01 mol.L⁻¹ (TAN *et al.*, 1998), a porcentagem de grupos amino na QS foi determinada pela equação 1.

$$GD = 100 - [A / (W - 204A) / 161 + A] \times 100 \quad (1)$$

Onde A é quantidade de NAG determinada em 204 nm e W é a massa de QS nas amostras.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em comprimento de onda entre 200 nm e 400 nm, determinado pelo método de primeira derivada por espectrofotometria na região do ultravioleta (TAN *et al.*, 1998).

3.2.1.2. Determinação da massa molar da QS por microviscosimetria

Para a determinação da massa molar, o método utilizado foi o viscosimétrico, em que as amostras de QS foram dissolvidas em ácido acético (0,1 M), cloreto de

sódio (0,2 M) e água destilada. Então foi medida a viscosidade das amostras de QS em cinco diferentes concentrações, variando de 0,001 a 0,003 g.mL⁻¹, em triplicata.

Para análise da viscosidade das dispersões utilizou-se um microviscosímetro automático, empregando as dispersões de QS no volume de 150 µL. O princípio da medição é baseado na lei de Stokes, em que a viscosidade será determinada pelo tempo de rolamento de uma esfera sólida sob a influência da gravidade em um tubo cilíndrico inclinado preenchido com a amostra líquida.

Primeiramente foi obtida a viscosidade relativa (η_{rel}) das dispersões e a partir desta calculou-se a viscosidade específica (η_{sp}); para a estimativa da viscosidade intrínseca empregando a equação de Huggins (Equação 2):

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad (2)$$

em que: η_{sp} = viscosidade específica; $\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida; K_H = coeficiente de Huggins; $[\eta]$ = viscosidade intrínseca; C = concentração de QS.

A viscosidade intrínseca da dispersão é obtida por meio de um gráfico de $\frac{\eta_{sp}}{C}$ em função da C das dispersões das amostras, por extrapolação da reta.

Para a determinação da massa molar viscosimétrica média (Mw-KDa), a equação empírica de Mark-Houwink Sakuraba, que relaciona a viscosidade intrínseca à massa molar da QS, foi utilizada, conforme apresentado na Equação 3 (ALSARRA *et al.*, 2002):

$$[\eta] = K M^{\frac{a}{v}} \quad (3)$$

em que: $[\eta]$ = estimativa da viscosidade intrínseca da amostra obtida através da regressão linear; K é a constante característica do polímero, solvente e temperatura e a é a constante que depende da geometria da molécula do polímero. Para a QS

em um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1 M e cloreto de sódio 0,2 M, à temperatura de 25 °C, K é $1,81 \cdot 10^{-3}$ e $a = 0,93$ (ROBERTS, DOMSZY, 1982).

A medida da viscosidade intrínseca fornece uma forma simples e eficaz para a determinação da massa molar da QS.

3.2.1.3. Efeito do pH na reticulação da QS com tripolifosfato de sódio

As mudanças no pH da dispersão de QS em solução de ácido acético 0,1 M foram medidas em peagâmetro após a adição de solução de TPP 0,1 % (*m/v*) pH 5,5 e 9,0 sob agitação magnética. O pH da mistura foi analisado após a adição de alíquotas de 1 mL até a adição final de 30 mL de solução de TPP em ambos os pH. Este ensaio teve por objetivo avaliar a influência do pH na formação das nanopartículas (BHUMKAR, POKHARKAR, 2006).

3.2.1.4. Efeito da condutividade na reticulação da QS com tripolifosfato de sódio

Os estudos de condutividade foram realizados para acompanhar a reação de reticulação da QS em solução de ácido acético a 0,1 M com TPP 0,1 % (*m/v*). A mudança na condutividade foi medida após a adição de TPP 0,1 % (*m/v*) pH 5,5 e 9,0 sob agitação magnética, empregando alíquotas de 1 mL até a adição final de 30 mL de solução de TPP. As mudanças na condutividade foram analisadas para avaliar as mudanças ocorridas durante a formação das nanopartículas (BHUMKAR, POKHARKAR, 2006).

3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas

3.2.2.1. Preparação das dispersões de quitosana

As dispersões de QS foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 % (*m/v*). A QS foi suspensa em solução de ácido acético glacial 0,75 % (*v/v*), a mistura foi realizada com agitação mecânica por 24 horas a temperatura ambiente (25 °C). Após a completa solubilização da QS, o pH foi ajustado para 4,8 com solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 M (CALVO *et al.*, 1997; CHEN; ZHANG;

HUANG, 2007). DisBa-01 na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi solubilizada na solução de QS.

3.2.2.2. Preparação da solução de tripolifosfato de sódio

As soluções de TPP foram preparadas com água purificada, nas concentrações de 0,1 e 0,5 % (m/v), as misturas foram realizadas com agitação por 1 hora a temperatura ambiente (25°C) para total solubilização do TPP. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,5 e 9,0 (CALVO *et al.*, 1997; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007). DisBa-01 na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi solubilizada na solução de TPP pH 5,5.

3.2.2.3. Diagrama dos sistemas formados

Nas dispersões de QS foram adicionadas várias concentrações de TPP, sob agitação mecânica, para construção de um diagrama de fases. Durante o processo de titulação, os sistemas formados foram analisados visualmente e classificados como solução, dispersão opalescente e agregados. Após a titulação, foram calculadas as concentrações de QS e TPP obtendo-se pontos os quais foram utilizados na delimitação das diferentes regiões no diagrama de fases (CALVO *et al.*, 1997; CHEN; ZHANG; HUANG, 2007). A região de dispersão opalescente formada foi escolhida para ser estudada neste trabalho.

3.2.2.4. Preparação de nanopartículas pela técnica de gotejamento manual e bomba peristáltica

As nanopartículas foram preparadas por gelificação ionotrópica das dispersões de QS com soluções de TPP, de acordo com metodologia desenvolvida por Calvo *et al.* 1997.

Diferentes volumes de solução de TPP (3, 6, 10, 15 e 30 mL) foram adicionados por gotejamento manual ou bomba peristáltica sobre a dispersão de QS no volume de 30 mL sob agitação mecânica a 390 rpm, temperatura ambiente (25°) e ao contrário, a dispersão de QS foi adicionada por gotejamento sobre a solução de TPP. Para o gotejamento por bomba peristáltica foi utilizada uma seringa com agulha 27.5g ½, acoplada a bomba.

3.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas

3.2.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersidade (Pdl) das nanopartículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas sem DisBa-01 em dispersão e liofilizadas e das nanopartículas com DisBa-01 em dispersão foram analisados. O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C em um ângulo de 90°. Todas as amostras foram diluídas com água purificada antes de cada medida. As medidas foram feitas em triplicata com 10 determinações do diâmetro para cada uma das amostras (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2010).

3.2.3.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta das nanopartículas em dispersão e liofilizadas e das nanopartículas com DisBa-01 em dispersão foram determinadas através da mobilidade eletroforética das amostras. As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator.

A medição efetuada por este equipamento é baseada no efeito de Doppler, ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. A contagem dos fótons permite a elaboração de um espectro de frequência a partir do qual o potencial zeta das partículas pode ser calculado.

Para a realização das medidas do potencial zeta, as amostras foram diluídas em água purificada, analisadas em triplicata e foram feitas 10 determinações de potencial zeta para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2010).

3.2.3.3. Determinação da morfologia das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises morfológicas foram realizadas por MEV em modo alto vácuo, a uma pressão parcial no interior da câmara de 1,33 mbar. As amostras foram depositadas sobre suporte para microscopia eletrônica de varredura. O estudo foi feito após secagem e formação dos filmes das nanopartículas com e sem DisBa-01. Após formação do filme de nanopartículas, essas amostras foram depositadas sobre pino de alumínio e fixadas em cola de carbono. Seguidamente, as amostras tornaram-se condutoras por deposição de uma camada de carbono e foram posteriormente analisadas. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se um feixe de elétrons de 2.0 kV (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2010).

3.2.3.4. Caracterização física da QS, TPP e nanopartículas sem e com DisBa-01 por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As amostras de QS, TPP, nanopartículas com e sem DisBa-01 foram analisadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr).

As amostras foram trituradas juntamente com KBr e os discos foram formados em prensa hidráulica. Os discos formados foram transferidos para o equipamento, e os espectros foram obtidos na região de 4000 – 400 cm^{-1} .

3.2.4. Caracterização da DisBa-01

3.2.4.1. Caracterização da DisBa-01 por espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados utilizando-se um espectropolarímetro, acoplado a um sistema de controle de temperatura no Laboratório de Biofísica Molecular, Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros foram obtidos a 25 °C, na faixa λ de 190 a 250 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em oito varreduras consecutivas por amostra. Foi empregada a velocidade de varredura de

50 nm.min⁻¹ e tempo de resposta de 4 s. A largura de banda foi de 1 nm e a leitura de elipticidade realizada a cada 0,5 nm.

As amostras analisadas foram a DisBa-01 em água purificada, DisBa-01 na solução de TPP e DisBa-01 nas nanopartículas.

3.2.4.2. Avaliação do potencial zeta da DisBa-01

O potencial zeta da DisBa-01 em água purificada (pH 6,8), tampão fosfato salino (pH 7,4), solução de TPP (pH 5,5) e dispersão de quitosana (pH 4,8) foram determinadas através da mobilidade eletroforética das amostras. As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator (CUN *et al.*, 2011).

Para a realização das medidas do potencial zeta as amostras foram analisadas em triplicata, com 10 determinações de potencial zeta para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

3.2.5. Avaliação da eficiência de encapsulação e capacidade de incorporação de DisBa-01 nas nanopartículas

A eficiência de encapsulação e a capacidade de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas foram determinadas pela separação da proteína livre no sobrenadante daquelas incorporadas nas nanopartículas, através da técnica de filtração-ultracentrifugação utilizando um filtro Amicon Ultra15 (Millipore) com tamanho de 30 kDa.

Foram utilizados 5 mL das amostras de nanopartículas com DisBa-01 que foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi liofilizado e ressuspendido em água purificada e transferido para placas contendo 16 poços, onde 2 mL de reagente BCA (ácido bicinchônico) foram adicionados sobre 200 µL do sobrenadante e analisados por espectrofotometria de ultravioleta-vísivel a 562 nm. O método BCA combina a redução do cobre (Cu⁺² em Cu⁺¹) pela proteína em um meio alcalino utilizando um reagente contendo ácido bicinchônico resultando na formação de uma coloração púrpura. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para determinação da eficiência de encapsulação foi construída uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) a partir da solução estoque de 1 mg.mL⁻¹. A BSA foi utilizada como proteína padrão para a determinação da DisBa-01 nas nanopartículas (DUDHANI, KOSARAJU, 2010).

A capacidade de incorporação (CI) e eficiência de encapsulação (EE) foram calculadas através das equações 4 e 5, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

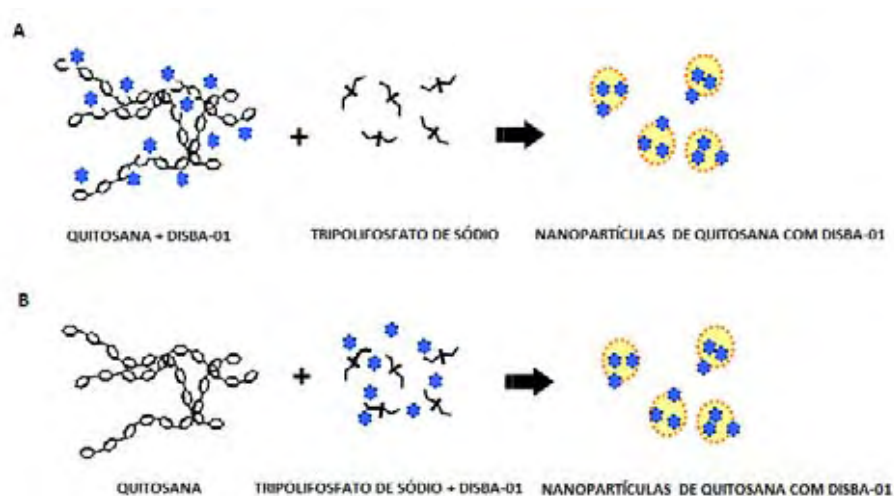
$$CI(\%) = \frac{\text{concentração total de proteína} - \text{concentração da proteína livre}}{\text{nanopartículas liofilizadas}} \times 100 \quad (4)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{concentração total de proteína} - \text{concentração da proteína livre}}{\text{concentração total de proteína}} \times 100 \quad (5)$$

3.2.5.1. Avaliação de métodos diferentes de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas

Para o preparo das nanopartículas contendo DisBa-01 foram avaliados dois métodos de incorporação. O método A, consistiu em incorporar 150 µg.mL⁻¹ na dispersão de QS em 0,1 M de ácido acético, em seguida, gotear o TPP sob agitação mecânica no volume de 5 mL. O método B consistiu na utilização das mesmas concentrações de QS e 150 µg.mL⁻¹ de DisBa-01 foram adicionados na solução de TPP e gotejados sobre as soluções de QS (figura 8). Estes métodos foram avaliados e calculados através da eficiência e capacidade de incorporação (Eq. 4 e 5).

Figura 8. Representação dos métodos de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas empregadas.



Adaptado de KIM; KANG, 2008.

3.2.6. Avaliação da mucoadesão das nanopartículas

A mucosa nasal suína foi obtida de porcos domésticos de matadouros locais. A metodologia utilizada para remoção foi adaptada de Fransén, Bjork, Edsman (2008), onde a cabeça foi separada do animal por uma incisão ao longo do septo nasal. O transporte até o laboratório foi realizado em caixa refrigerada. Antes do início do experimento, a mucosa nasal foi cuidadosamente removida das conchas nasais e durante todo o experimento foi mantida em solução salina resfriada.

A determinação da força mucoadesiva das nanopartículas foi realizada em um analisador de textura, que mede a força aplicada na remoção da formulação a partir de uma membrana modelo, para isso foi utilizada mucosa nasal suína (BRUSCHI *et al.*, 2007). As amostras foram fixadas a uma sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) com fita adesiva dupla face, enquanto que a mucosa nasal foi fixada a uma plataforma de acrílico em banho-maria a 32 °C, que é a temperatura da cavidade nasal. As nanopartículas foram comparadas com padrões mucoadesivos conhecidos na literatura que são carbopol 974 (C974), carbopol 971 (C971) e policarbofil (PP) (THIRAWONG *et al.*, 2007). A figura 9 demonstra o equipamento utilizado nas análises e a figura 10 demonstra o esquema do processo do teste mucoadesivo.

Figura 9. Analisador de textura: **1** – probe onde os polímeros compactados e em pó foram fixados, **2** – anel de mucoadesão, **3** – banho a 32 °C e **4** – aquecedor. **(b)** anel de mucoadesão usado para prender a mucosa nasal.

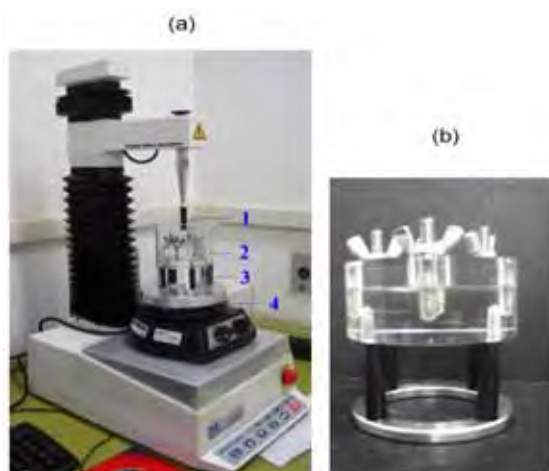
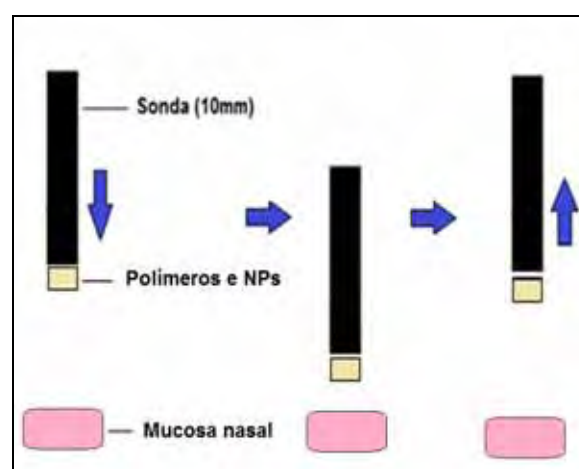


Figura 10. Esquema da metodologia para análise da mucoadesão das nanopartículas.



Adaptado de THIRAWONG *et al.*, 2007.

A mucosa nasal foi hidratada durante 30 s em fluido nasal simulado (pH 6.0-6.5) composto de 8 % (*p/v*) de mucina (Sigma-Aldrich) 7,45 mg.mL⁻¹ NaCl; 1,29 mg.mL⁻¹ KCl e 0,32 mg.mL⁻¹ CaCl₂.2H₂O (MELON, 1968 *apud* CALLENS *et al.*, 2003) antes do início do teste. A sonda foi movida para baixo a uma velocidade de 0,5 mm.s⁻¹ para entrar em contato com a mucosa nasal suína em que foi avaliada a força adesiva das nanopartículas e padrões mucoadesivos. O ensaio teve por objetivo simular a mucoadesão das nanopartículas sobre a mucosa nasal, os tempos de contato testados foram de 30 s, 60 s e 120 s.

A partir dos resultados obtidos, foi construída a curva força-distância utilizando o software Texture Exponent Lite, em que foram obtidos o trabalho de adesão (BRUSCHI *et al.*, 2007) e a força de destacamento (HÄGERSTRÖM, 2003). Todos os ensaios foram realizados em septuplicata.

3.2.7. Avaliação da viabilidade celular de células K-562 e HUVEC pela técnica de MTT

Os ensaios de viabilidade foram feitos utilizando as células K-562 (ATCC nº CCL-243; de leucemia mieloide crônica) e HUVEC (ATCC nº PCS-100-010 de células endoteliais de cordão umbilical), estes ensaios foram realizados no

Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano foram distribuídos 100 μ L por cavidade das suspensões de células K-562 ou HUVEC utilizando com “coating” fibronectina e vitronectina, as células foram ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL em meio de cultura IMEM-completo, denominado IMEM-C, composto de Meio Essencial Mínimo de Dubelcco Modificado por Iscove, contendo: 10% de soro fetal bovino, 50 U.mL⁻¹ de penicilina, 0,1 μ g.mL⁻¹ de estreptomicina e 0,25 μ g.mL⁻¹ de anfotericina. Nestas placas foram adicionados 100 μ L de DisBa-01 (DB), nanopartículas sem DisBa-01(NPQS) e nanopartículas com DisBa-01 (NPDB) nas concentrações de 200 nM, 500 nM, 1000 nM e 2000 nM, em diluição seriada, em meio IMEM-completo. O controle negativo foi apenas meio de cultura e o tampão fosfato salino (PBS) foi considerado como controle positivo visto que as células e amostras estavam diluídas nesse tampão, sendo consideradas 100% de viabilidade.

O experimento foi repetido três vezes em ocasiões diversas em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂. A seguir, foram adicionados 20 μ L de uma solução concentrada de MTT (5 mg.mL⁻¹ e meio IMEM-incompleto) em cada cavidade. Em seguida as placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C, com tensão de 5 % de CO₂. Após esse procedimento, as placas foram centrifugadas a 800 xg por 10 minutos a 10 °C em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio de uma micropipeta e descartados e as células foram tratadas com 100 μ L de isopropanol para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

A análise estatística foi realizada utilizando método de análise de variância

(ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Valores de $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2.7.1. Avaliação da inibição da adesão de células K-562 e HUVEC

Os ensaios de inibição da adesão foram feitos utilizando as células K-562 (ATCC nº CCL-243; de leucemia mieloide crônica) e HUVEC (ATCC nº PCS-100-010 de células endoteliais de cordão umbilical), estes ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

Para o ensaio de inibição da adesão celular foram utilizadas 5×10^5 células de linhagem celular de K-562 e HUVEC em placas de 96 poços previamente cobertos com fibronectina e vitronectina, respectivamente. As proteínas adesivas fibronectina e vitronectina foram selecionadas por serem proteínas adesivas que ajudam as células tumorais a aderirem a matriz extracelular. A fibronectina apresenta afinidade pelas integrinas $\alpha_5\beta_1$ expressas em células K-562 e a vitronectina apresenta afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$ expressa em células HUVEC.

Nestas placas foram adicionadas DisBa-01, DisBa-01 em nanopartículas e nanopartículas nas concentrações de 200 nM, 500 nM, 1000 nM e 2000 nM e incubadas por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão as células foram ressuspensas em 240 µL de meio de cultura para adesão e 100 µL das suspensões de células foram transferidas para placas em duplicata e centrifugadas a 410 xg por 2 minutos a 4° C e incubadas por 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Os poços recobertos por fibronectina e/ou vitronectina em tampão fosfato salina (PBS) que só receberam as células sem a DisBa-01 foram chamados de controle positivo de adesão, e como controle negativo, os poços que receberam somente PBS e 2% de BSA.

O conteúdo dos poços foi descartado e lavado com tampão de adesão e a capacidade de inibição da adesão foi avaliada pelo método colorimétrico cristal violeta em espectrofotômetro a 570 nm (KAUSKOT *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

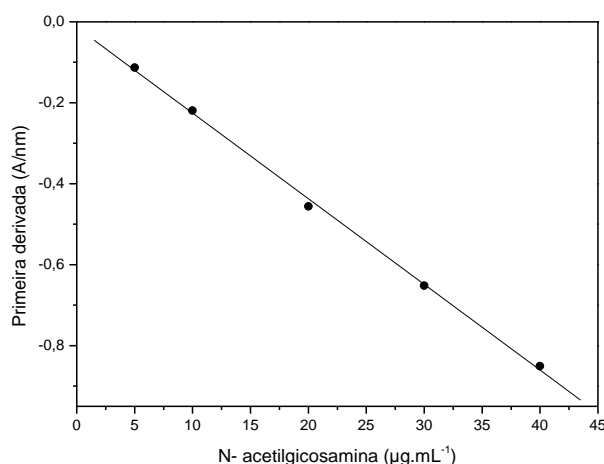
4.1. Caracterização da quitosana

4.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação (GD) é uma característica importante, pois determina a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica da QS. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solvatação em água, já que a QS é insolúvel em água e solúvel em ácidos orgânicos como o ácido acético resultando em soluções viscosas (MATHUR; NARANG, 1990). A presença dos grupos amino protonados permite que a QS interaja eletrostaticamente com TPP e proteínas, além de permitir interação eletrostática com a mucina presente no muco nasal, o que é importante para este trabalho. O método utilizado para determinação do GD da QS foi o de primeira derivada por espectroscopia na região do ultravioleta. Este método permite uma análise simples e rápida, pois não sofre influência de impurezas (TAN *et al.*, 1998).

A determinação do método de primeira derivada foi através da regressão linear da reta obtido pela curva analítica de NAG em solução de ácido acético a $0,01 \text{ mols.L}^{-1}$ (Figura 11):

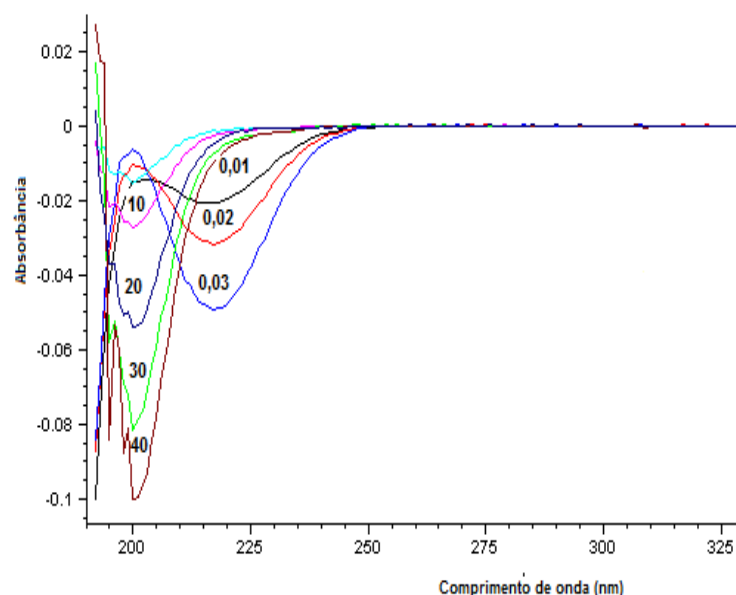
Figura 11. Curva analítica de primeira derivada de NAG a 204 nm.



Com a regressão linear da primeira derivada de NAG obteve-se um $r^2 = 0,9985$, indicando a linearidade da curva. Quando concentrações diferentes de ácido acético são analisadas (0,01; 0,02 e 0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando a água como branco, observa-se a convergência de todos os espectros para um ponto comum em 204 nm, chamado de ponto isobéptico, que corresponde ao comprimento máximo de absorção da NAG, tornando sua determinação independente da concentração de ácido acético.

Os espectros de primeira derivada de NAG e ácido acético estão na figura 12.

Figura 12. Espectro de primeira derivada de soluções de NAG em diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) em ácido acético a 0,01 mols.L^{-1} na região do UV em 204 nm.



O GD da QS foi calculado de acordo com a equação (1) e o valor do GD da QS empregada é de 78,5%, o que condiz com o descrito pelo fabricante para QS de baixo peso molecular. Este resultado demonstra que a QS utilizada no desenvolvimento das nanopartículas apresenta uma porcentagem elevada de grupos amino livres para interagir com TPP e a mucosa nasal.

4.1.2. Determinação da massa molar da QS por microviscosimetria

A determinação da massa molar da QS foi obtida pelo cálculo da viscosidade intrínseca, primeiramente calculada a viscosidade relativa, específica e reduzida. A

viscosidade relativa da solução representa a razão entre a viscosidade da solução e a do solvente, e a diferença entre elas fornece a viscosidade específica. A viscosidade aumenta com a concentração de soluto e a relação entre a viscosidade específica e a concentração é chamada viscosidade reduzida (RICHARDS, 1980).

A tabela 3 abaixo apresenta os valores de viscosidade relativa, específica e reduzida para soluções de QS.

Tabela 3. Valores de viscosidade relativa, específica e reduzida das soluções de QS.

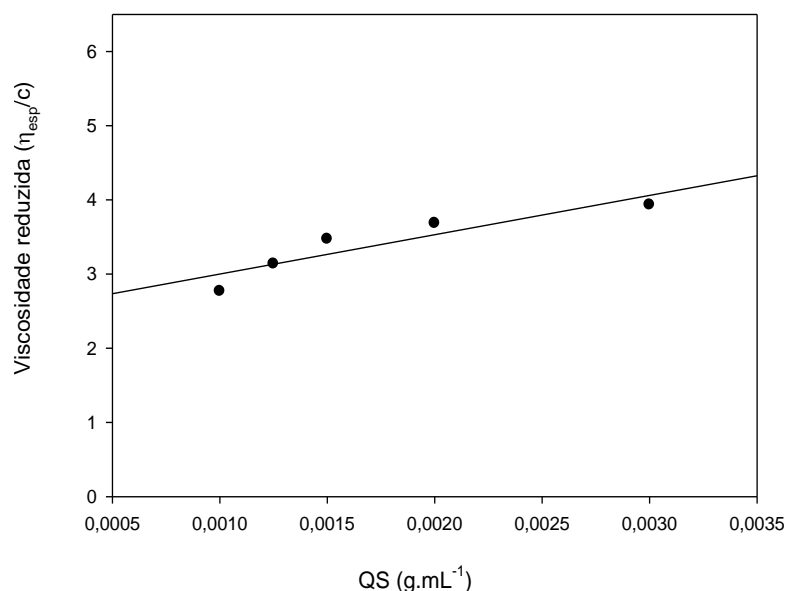
C (g.mL ⁻¹)	Tempo de escoamento (s)	η_{Rel}	η_{sp}	η_{red}
0,001	18,338	1,27670	0,276709	2,76708
0,00125	19,997	1,39210	0,392109	3,13686
0,0015	21,837	1,52045	0,520460	3,46973
0,002	24,950	1,73700	0,737008	3,68504
0,003	31,305	2,17966	1,179668	3,93222

A viscosidade intrínseca está relacionada as dimensões moleculares (volume hidrodinâmico) de cadeias poliméricas isoladas. A determinação da viscosidade intrínseca é um dos métodos simples para a verificação da massa molar dos polímeros, além de permitir a obtenção de informações referentes às interações polímero-solvente (TAGER, 1978).

Quando em dispersão os polímeros como a QS apresentam entrelaçamentos entre as cadeias poliméricas que tornam-se limitados com a adição de água devido a viscosidade da solução aumentar linearmente com o aumento da concentração do polímero, portanto, as sobreposições das cadeias tornam-se mais importantes e a viscosidade relativa da solução aumenta significativamente com a concentração, o que é possível observar na tabela 3.

A Figura 13 apresenta a relação entre a concentração (C) e viscosidade reduzida ($\frac{\eta_{sp}}{C}$), usada para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

Figura 13. Relação entre a concentração (C) e viscosidade reduzida ($\frac{\eta_{sp}}{C}$), usada para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$).



Foi obtido um coeficiente de ajuste, r^2 igual a 0,9150, demonstrando uma boa linearidade dos dados experimentais obtidos. A massa molar (MM) média da QS foi calculada pela equação de Mark-Houwink (Eq. 3), cujo valor da $[\eta]$ encontrado foi de 2,470 g.mL⁻¹. Os valores de K e α utilizados foram de $1,81 \cdot 10^{-3}$ g.mL⁻¹ e 0,93, respectivamente, para um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1 M e cloreto de sódio 0,2 M. O valor da MM média da QS encontrada foi de 235.000 g.mol⁻¹.

4.1.3. Efeito do pH e da condutividade na reticulação da QS com tripolifosfato de sódio

A QS tem $pK_a = 6,3$, é policatiônica quando dissolvida em meio ácido e apresenta grupos amino protonados (NH_3^+). O TPP ($Na_5P_3O_{10}$) dissolvido em água dissocia-se tanto em íons hidroxila quanto tripolifosfórico.

A reticulação da QS é dependente da disponibilidade dos sítios catiônicos e as espécies carregadas negativamente. Assim o pH da solução de TPP (0,1 % *m/v*)

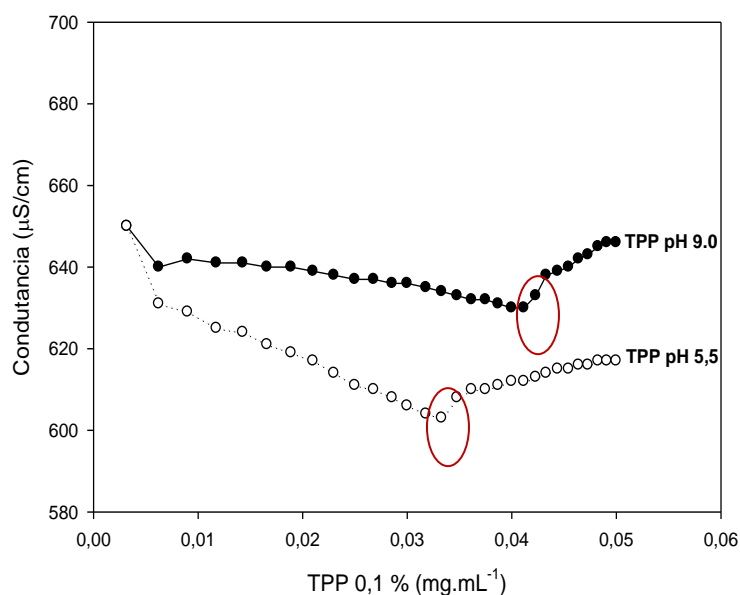
desempenha um papel significativo na reticulação da QS. Portanto, duas diferentes condições de pH 5,5 e 9,0 de TPP (0,1 % *m/v*) foram utilizados para obtenção de nanopartículas reticuladas com QS.

Quando o pH do TPP foi ajustado para 5,5, há predomínio de cargas negativas dos íons fosfórico. No entanto, em pH 9,0, ambos os íons hidroxila e fosfórico apresentam carga e podem competir uns com os outros para interagir com grupos amino da QS.

Os estudos de condutividade foram realizados para avaliar o efeito do pH em relação as mudanças relativas de espécies iônicas, refletindo a natureza da reticulação com a mudança no pH do TPP.

Inicialmente a QS foi solubilizada em solução de ácido acético 0,1 M (pH 3,10), em que grupos amino livre ficaram hidratados. A adição de TPP em pH 5,5 promoveu a interação dos íons fosfórico com os grupos amino da dispersão de QS levando a uma diminuição da condutividade que pode ser observado na figura 14.

Figura 14. Efeito do pH da solução de TPP sobre a condutividade durante a reticulação da QS (0,3 % *m/v*) com TPP.



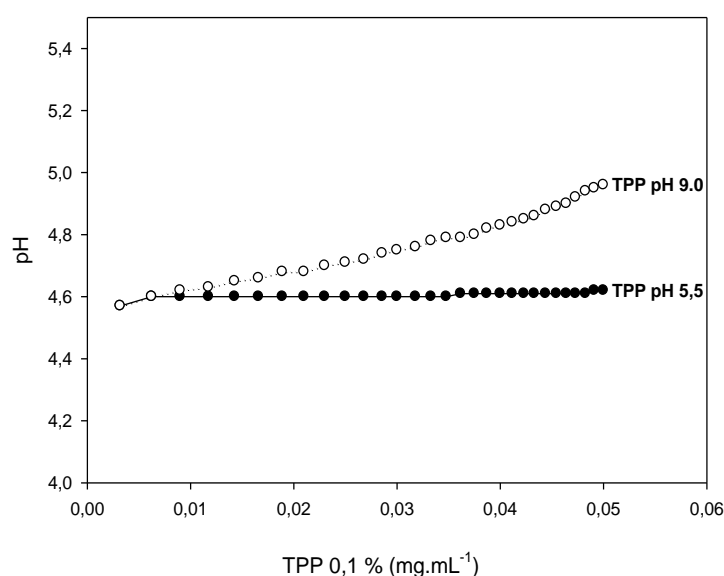
Com a adição em excesso de TPP, todos os grupos amino ficaram saturados com íons fosfóricos e o aumento da condutividade se deu após 0,034 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de

TPP (pH 5,5). Após o ponto de equivalência houve um aumento da condutividade devido ao aumento de íons H⁺. O processo é denominado de reticulação iônica.

Quando o pH da solução de TPP foi elevado para pH 9,0 e este adicionado a dispersão de QS, houve a diminuição da condutividade que foi observada até a adição de 0,042 mg.mL⁻¹ de TPP como pode ser observado na figura 14. Como dito acima, o TPP em pH 9,0, tanto os íons hidroxila quanto fosfórico estão presentes e competem entre si para interagir com os grupos amino da QS (DUDHANI; KOSARAJU, 2010), portanto os íons hidroxila estão ligados aos grupos amino desprotonados.

O pH do sistema nanoparticulado foi monitorado após a adição de TPP em diferentes pH (5,5 e 9,0). É possível notar que a adição de TPP em pH 9,0 promove alteração do pH do sistema, enquanto que o pH do sistema se manteve inalterado no caso da reticulação com TPP pH 5,5, observado na figura 15. Assim, a reticulação foi efetuada por desprotonação quando o pH do TPP é 9,0, enquanto o complexo QS - TPP em pH 5,5 foi formado pela interação iônica da QS, carregada positivamente com os íons fosfórico negativos. Portanto o mecanismo de reticulação da QS - TPP pode ser tanto por desprotonação ou interação iônica (LAM *et al.*, 2006).

Figura 15. Curva de titulação: efeito do pH do TPP.



Estudos mostram que a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH em função do tempo. A alteração do pH pode ser indicio de degradação do polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a) e podem levar ao aumento do tamanho médio das nanopartículas, isso pode ocorrer devido ao aumento da insolubilidade da QS com o aumento nos valores de pH. Com o aumento da insolubilidade, a QS começa a agregar-se na suspensão, promovendo o aumento nos valores de diâmetro das nanopartículas, por isso a importância do monitoramento do pH.

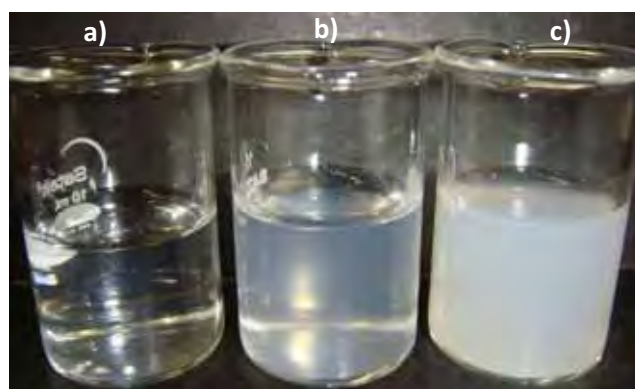
Portanto o pH da solução de TPP escolhido para o preparo das nanopartículas foi o pH 5,5, o qual não apresentou variações após adição de TPP sobre a dispersão de QS.

4.2. Desenvolvimento das nanopartículas

4.2.1. Diagrama dos sistemas formados

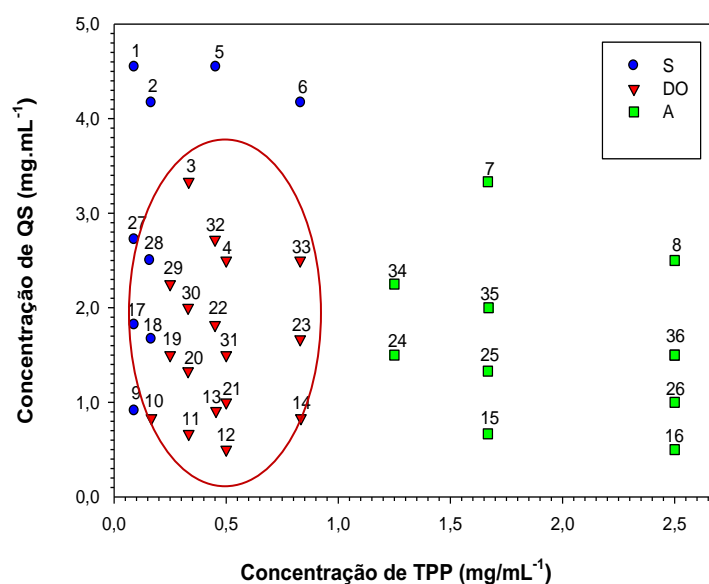
Estes estudos foram realizados a fim de identificar as melhores concentrações de QS e TPP mais adequadas para a formação das nanopartículas através da técnica de gelificação ionotrópica. As misturas resultantes foram classificadas visualmente como solução (S), região em que não há formação de nanopartículas, dispersão opalescente (DO), que é a região de interesse e com maior probabilidade de formação das nanopartículas, e agregado (A), região no qual se observa uma grande massa precipitada, como observado na figura 16.

Figura 16. Classificação visual das amostras em (a) solução, (b) dispersão opalescente e (c) agregados.



Após o cálculo das concentrações finais das dispersões, foi construído um diagrama de fases em função da concentração de cada componente como observadas na figura 17, e delimitadas as diferentes regiões formadas.

Figura 17. Diagrama de fase dos sistemas formados e determinação das regiões de solução (S), dispersão opalescente (DO) e agregados (A).



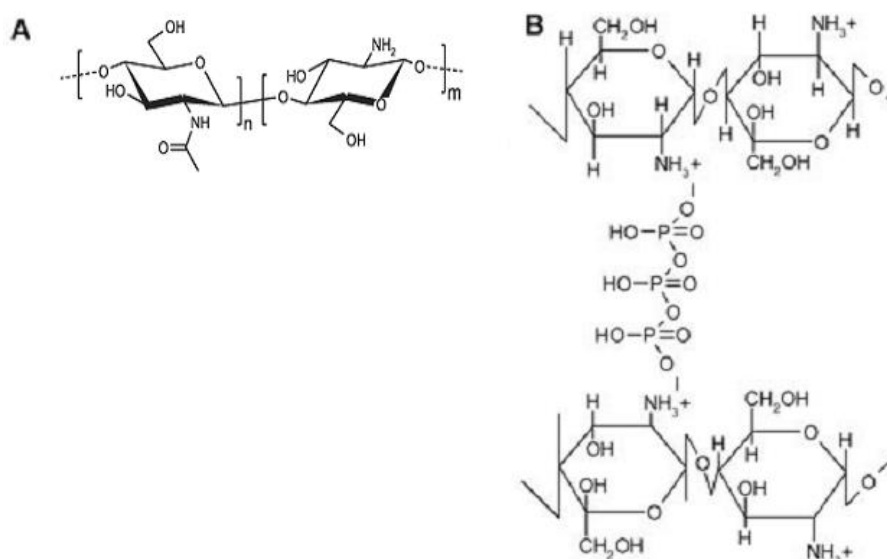
Na região classificada como agregados há grande quantidade de TPP e excesso de grupos fosfato. Em concentrações acima de $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ é possível observar formação de sistema opaco devido a formação de agregados, como os grupos amino estão ligados, o excesso de grupos fosfato livres levam a formação de agregados e também ao contrário, o excesso de grupos amino livre devido ao excesso de QS levam a formação de agregados devido à ausência de ligações de todos os grupos fosfato o que nos mostra concentrações inadequadas para formação das nanopartículas.

Na região de dispersão opalescente é possível observar as regiões de formação das nanopartículas (CALVO *et al.*, 1997), que só é possível com concentrações específicas de QS e TPP (WU *et al.*, 2005; XU; DU, 2003). A região classificada como DO obteve uma concentração entre $0,8 - 3,33 \text{ mg.mL}^{-1}$ de QS e $0,25 - 0,85 \text{ mg.mL}^{-1}$ de TPP em que houve formação de nanopartículas.

A região classificada como solução apresenta concentração de QS entre 0,9 e 4,5 mg.mL⁻¹ e 0,2 e 0,8 mg.mL⁻¹ de TPP, sendo assim, as concentrações entre QS e TPP não apresentam-se adequadas para formação de nanopartículas, pois apresenta uma alta concentração de QS e baixa concentração de TPP, com isso nem todos os grupos amino da QS ligam-se aos grupamentos fosfato, permanecendo muitos grupos amino livres não promovendo a reticulação e formação das nanopartículas.

Quando a concentração do TPP é muito baixa, ocorrem principalmente cadeias distendidas de QS (Figura 18A). Quando a quantidade de TPP é suficiente para promover o enovelamento das cadeias de QS, conseqüentemente ocorre a formação de nanopartículas (Figura 18B). Quando a quantidade de TPP é maior do que a quantidade estequiométrica para neutralização das cargas positivas da cadeia de QS, podendo formar micropartículas (SILVA, 2006).

Figura 18. (A) Estrutura química da QS, (B) reticulação da QS com TPP na formação das nanopartículas.



Adaptado de BHUMKAR; POKHARKAR, 2006.

A Tabela 4 representa as concentrações entre QS e TPP estudada para obtenção das nanopartículas.

Tabela 4. Estudo das concentrações finais adequadas de QS e TPP após formação das nanopartículas.

QS (mg.mL ⁻¹)	TPP 0,1 % (mg.mL ⁻¹)					TPP 0,5 % (mg.mL ⁻¹)				
	0,009	0,0016	0,0025	0,0033	0,005	0,022	0,041	0,0625	0,0833	0,125
0,01	S	S		DO	DO	DO	DO		A	A
0,04	S	S	DO	DO	DO	DO	DO	A	A	A
0,09	S	S	DO	DO	DO	DO	DO	A	A	
0,25	S	S		DO	DO	DO	DO		A	A

Na tabela acima é possível observar que a região de solução é formada em concentrações de QS de 0,01 a 0,25 mg.mL⁻¹ e TPP 0,009 e 0,0016 mg.mL⁻¹, nesta região a concentração de QS é maior que a de TPP, portanto este é solubilizado e não é suficiente para promover a reticulação de toda a QS para formar as nanopartículas.

Na região de DO foi identificada a formação de nanopartículas nas concentrações de 0,01 a 0,25 mg.mL⁻¹ de QS e concentrações de 0,0025 a 0,041 mg.mL⁻¹ de TPP, esta região apresenta quantidades de TPP e QS suficientes para a formação das nanopartículas.

A região de formação de agregados é observada somente com concentrações de TPP acima de 0,625 a 0,125 mg.mL⁻¹, sendo que o excesso de TPP pode promover a formação de agregados.

4.3. Caracterização físico-química das nanopartículas

4.3.1. Distribuição granulométrica das nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas e a distribuição do tamanho, medida pelo índice de polidispersão (Pdl), são parâmetros muito importantes na área de nanotecnologia farmacêutica.

O tamanho das nanopartículas depende de vários fatores como: método de preparação, natureza do material utilizado, peso molecular e concentração do polímero, características físico-químicas do fármaco encapsulado e a velocidade de agitação (LEGRAND *et al.*, 1999). Em relação à estabilidade, o tamanho das nanopartículas é importante, pois pode evidenciar a tendência destes sistemas à agregação ao longo do tempo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b).

O tamanho das partículas é de extrema importância quando se utiliza nanopartículas de QS como carreadores de proteínas que são absorvidos pela mucosa nasal. Se o tamanho das nanopartículas for muito grande, acima de 400 nm, a área superficial diminui e, a absorção também diminui. Se o tamanho da nanopartícula é muito pequeno, abaixo de 200 nm, as nanopartículas são facilmente removidas, porque torna-se impossível a fixação na mucosa nasal. Acredita-se que o tamanho apropriado para as nanopartículas seria entre 200-400 nm (KIM; KANG, 2008).

As nanopartículas de QS foram preparadas através de gelificação ionotrópica com solução de TPP com auxílio de bomba peristáltica e agitação mecânica. A tabela 5 apresenta a distribuição de diâmetro médio das nanopartículas obtidas no diagrama dos sistemas formados utilizando QS a 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 % (*m/v*) e TPP a 0,1 e 0,5 % (*m/v*).

Tabela 5. Diâmetro médio, Pdl e potencial zeta de todas as nanopartículas preparadas por bomba peristáltica.

(continua)

Amostra	[QS] _{final} (mg.mL ⁻¹)	[TPP] _{final} (mg.mL ⁻¹)	Razão QS:TPP	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
NPQS1_9	0,9091	0,0909	10:1	304 ± 62,6	0,702	34,8 ± 2,09
NPQS1_10	0,8333	0,1667	5:1	179 ± 19,4	0,372	35,0 ± 0,65
NPQS1_11	0,6667	0,333	2:1	216 ± 38,1	0,453	19,9 ± 1,04
NPQS1_12	0,5	0,5	1:1	1120 ± 220	0,886	18,1 ± 0,34
NPQS1_13	0,9091	0,4545	2:1	318 ± 14,7	0,391	21,5 ± 1,52

Tabela 5. Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de todas as nanopartículas preparadas por bomba peristáltica.

(continuação)

Amostra	[QS]_{final} (mg.mL⁻¹)	[TPP]_{final} (mg.mL⁻¹)	Razão QS:TPP	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
NPQS1_14	0,8333	0,8333	1:1	2390 ± 509	0,695	17,8 ± 1,35
NPQS1_15	0,6667	1,667	0,4:1	1740 ± 801	0,760	1,64 ± 0,73
NPQS1_16	0,5	2,5	0,2:1	4030 ± 860	0,730	-5,15 ± 1,35
NPQS2_17	1,818	0,090	20:1	1130 ± 605	0,664	28,0 ± 0,98
NPQS2_18	1,667	0,1667	10:1	1250 ± 199	0,726	15,2 ± 1,71
NPQS2_19	1,5	0,25	6:1	303 ± 1,70	0,35	30 ± 0,70
NPQS2_20	1,33	0,33	4:1	455 ± 20,4	0,410	29,1 ± 1,79
NPQS2_21	1	0,5	2:1	763 ± 337	0,641	3,76 ± 1,03
NPQS2_22	1,818	0,45	4:1	354 ± 81,8	0,390	17,3 ± 2,59
NPQS2_23	1,667	0,83	2:1	802 ± 472	0,656	4,79 ± 0,81
NPQS2_24	1,5	1,25	1,2:1	1740 ± 1280	0,826	-15,6 ± 1,03
NPQS2_25	1,33	1,667	0,8:1	3010 ± 1750	0,978	-13,4 ± 5,60
NPQS2_26	1	2,5	0,4:1	1040 ± 323	0,746	-15,3 ± 4,12
NPQS3_27	2,72	0,090	30:1	696 ± 569	0,628	28,8 ± 1,77
NPQS3_28	2,5	0,16	15:1	286 ± 20,7	0,371	31,8 ± 2,40
NPQS3_29	2,25	0,25	9:1	4873 ± 8,7	0,412	31,4 ± 3,21
NPQS3_30	2	0,33	6:1	312 ± 2,87	0,39	38,6 ± 0,76
NPQS3_31	1,5	0,5	5:1	891 ± 953	0,660	30,4 ± 2,76
NPQS3_32	2,72	0,45	6:1	1840 ± 2200	0,746	26,5 ± 1,83
NPQS3_33	2,5	0,83	3:1	1040 ± 706	0,732	1,28 ± 0,29
NPQS3_34	2,25	1,25	1,8:1	1500 ± 366	0,868	-8,54 ± 3,02
NPQS3_35	2	1,67	1,2:1	650 ± 439	0,594	-19,3 ± 8,14

Tabela 5. Diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de todas as nanopartículas preparadas por bomba peristáltica.

(conclusão)

Amostra	[QS] _{final} (mg.mL ⁻¹)	[TPP] _{final} (mg.mL ⁻¹)	Razão QS:TPP	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
NPQS5_1	4,545	0,0909	50:1	353 ± 91	0,529	45,43 ± 4,56
NPQS5_2	4,1667	0,1667	25:1	270 ± 20,3	0,423	44,4 ± 1,42
NPQS5_3	3,333	0,333	10:1	280 ± 2,86	0,247	44,6 ± 0,25
NPQS5_4	2,5	0,5	5:1	295 ± 6,96	0,29	39,5 ± 0,50
NPQS5_5	4,545	0,4545	10:1	365 ± 3,22	0,332	47,9 ± 1,73
NPQS5_6	4,1667	0,8333	5:1	896 ± 160	0,583	39,6 ± 0,44
NPQS5_7	3,333	1,667	2:1	751 ± 145	0,761	16,7 ± 5,71
NPQS5_8	2,5	2,5	1:1	815 ± 162	0,655	3,09 ± 0,50

Para a continuação dos estudos foram selecionadas as nanopartículas NPQS2_19, NPQS3_30 e NPQS5_3, encontradas na região de DO. Todas as nanopartículas selecionadas apresentaram diâmetro médio entre 200 e 400 nm e índice de polidispersidade menor que 0,4, o que garante a homogeneidade do sistema formado. Além disso, foram escolhidas nanopartículas com diferentes concentrações de QS, sendo possível avaliar a influência da concentração de QS. As nanopartículas selecionadas para posteriores caracterizações e incorporação da DisBa-01 serão nomeadas de NPQS2, NPQS3 e NPQS5, sendo que os números representam a concentração de QS. Quando DisBa-01 for incorporada serão nomeadas de NPQS2-DB, NPQS3-DB e NPQS5-DB.

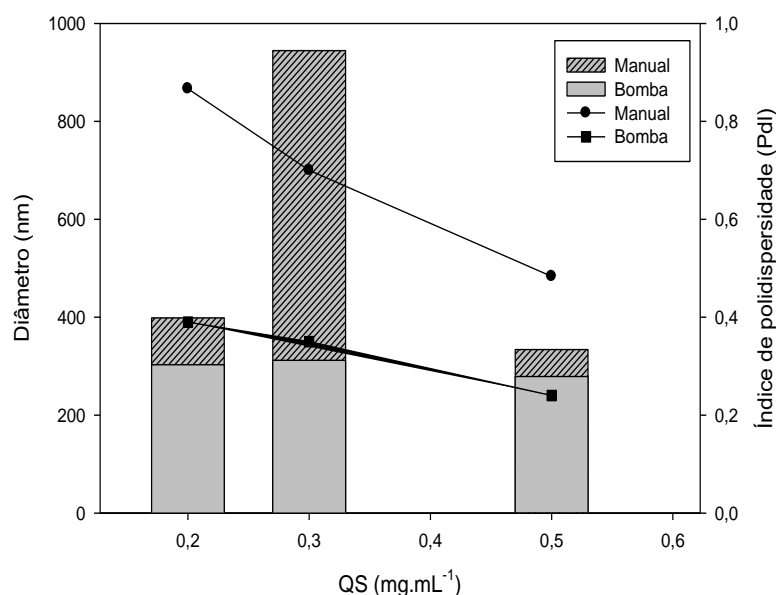
4.3.2. Comparação dos métodos de preparo das nanopartículas por determinação do diâmetro médio e Pdl

Em ambos os métodos de obtenção das nanopartículas, tanto por gotejamento por bomba peristáltica quanto por gotejamento manual, foram utilizadas

as mesmas quantidades de TPP 0,1 % (m/v) e QS nas concentrações de 0,2 % (NPQS2); 0,3 % (NPQS3) e 0,5 % (NPQS5) (m/v).

Ao fazermos a adição lenta do TPP com auxílio da bomba peristáltica há uma redução no diâmetro médio das partículas, promovendo a diminuição do índice de polidispersidade, indicando a formação de um sistema mais homogêneo, o que pode ser visualizado na figura 19.

Figura 19. Comparação dos diâmetros médios (colunas) e índice de polidispersidade (linhas) das nanopartículas obtidas pelo processo de gelificação ionotrópica.



Quando TPP é adicionado lentamente, o meio reacional dispõe de tempo maior para o arranjo ordenado das cadeias poliméricas de QS e este arranjo mais ordenado, possibilita a obtenção de nanopartículas menores. A adição lenta do TPP favoreceu sua difusão no interior das cadeias de QS, favorecendo a interação entre o TPP e a QS tornando as nanopartículas menores.

Por outro lado, a adição rápida do TPP dificultou sua difusão, o que ocorre com gotejamento manual. A adição rápida promoveu a reticulação da superfície da nanopartícula dificultando a interiorização do TPP, conseqüentemente, com o interior menos reticulado, às cadeias de QS permanecem mais estendidas e as nanopartículas obtidas são maiores (SILVA, 2006).

Foi possível observar que as nanopartículas preparadas com auxílio da bomba peristáltica apresentaram índice de polidispersidade entre 0,3 e 0,4, que aumenta significativamente ($p < 0,05$) quando as nanopartículas são preparadas com adição manual de TPP ($Pdl > 0,6$), evidenciando a formação de sistemas heterogêneos. Portanto, a utilização da bomba peristáltica e agitação mecânica permitiram a obtenção de sistemas mais homogêneos. Em razão disso, optou-se por realizar todos os ensaios com as nanopartículas preparadas somente com auxílio da bomba peristáltica garantindo assim que o sistema formado seja homogêneo para a incorporação da DisBa-01.

A nanopartícula NPQS2, apresentou diâmetro médio de $303 \text{ nm} \pm 1,70 \text{ nm}$ e índice de polidispersidade de 0,39. A nanopartícula NPQS3, o diâmetro médio ficou entre $312 \text{ nm} \pm 2,87 \text{ nm}$, e o índice de polidispersidade foi de 0,35. Por fim, a nanopartícula NPQS5, o diâmetro médio desta amostra foi de $280 \text{ nm} \pm 2,16 \text{ nm}$ e o índice de polidispersidade foi de 0,24, o que indica que todas as amostras são monodispersas e a distribuição de tamanho é homogênea (Tabela 6).

Tabela 6. Diâmetro médio e Pdl das nanopartículas pelo processo de gelificação ionotrópica.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm) das nanopartículas sem DisBa-01	Pdl
NPQS2	$303 \pm 1,70$	0,39
NPQS3	$312 \pm 2,87$	0,35
NPQS5	$280 \pm 2,16$	0,24

O baixo peso molecular da QS influencia o diâmetro médio das nanopartículas, isso pode ser explicado pela diminuição da viscosidade e simultaneamente pela habilidade da QS de baixo peso molecular de formar estruturas menores, estes resultados estão de acordo com resultados anteriores de nanopartículas de QS preparadas por gelificação ionotrópica (JANES; ALONSO; 2003).

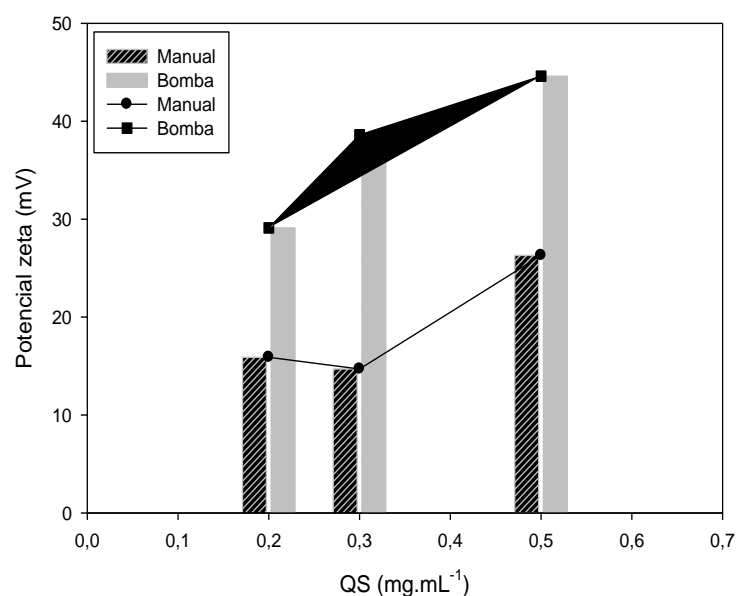
4.3.3. Determinação do potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta das nanopartículas também foi avaliado, uma vez que ele influencia na estabilidade das dispersões coloidais. Um valor em módulo de potencial zeta entre $|30 - 60 \text{ mV}|$ é considerado importante para a estabilidade das nanopartículas, uma vez que as forças repulsivas evitam agregações entre as nanopartículas em dispersão (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a).

As nanopartículas NPQS2, NPQS3 e NPQS5 obtidas tanto por gotejamento com bomba peristáltica quanto por gotejamento manual foram analisadas quanto ao potencial zeta.

Observamos na figura 20 que quando as nanopartículas foram preparadas por gotejamento manual, há uma diminuição significativa do potencial zeta ($p < 0,05$) quando comparado com as nanopartículas preparadas com a bomba peristáltica. Para nanopartículas preparadas por gotejamento manual, os valores de potencial zeta estão abaixo de $+30 \text{ mV}$, sendo assim as nanopartículas formadas não apresentam forças repulsivas superficiais suficientes para evitar que elas se agreguem o que pode levar a desestabilização do sistema formado.

Figura 20. Comparação das técnicas de obtenção das nanopartículas através do potencial zeta.



Assim a técnica de gotejamento através da bomba peristáltica se mostrou eficiente na obtenção das nanopartículas, pois os valores de potencial zeta apresentaram-se acima de +30 mV em todas as concentrações de QS utilizadas, indicando que as nanopartículas formadas são estáveis.

Os resultados obtidos do potencial zeta das nanopartículas, com valores elevados e positivos pode favorecer a interação das nanopartículas com a mucosa nasal. É interessante que as nanopartículas apresentem essa carga de superfície positiva, uma vez que a mucina, glicoproteína do muco, possui grupos siálicos de carga negativa e através das interações eletrostáticas entre eles é possível fazer com que a formulação permaneça mais tempo na mucosa nasal o que pode melhorar a absorção da DisBa-01.

Podemos então concluir que o potencial zeta das nanopartículas apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$), o que nos permite dizer que o aumento da concentração de QS afeta a carga de superfície das nanopartículas, na medida em que aumentamos a concentração de QS o potencial zeta das nanopartículas aumenta.

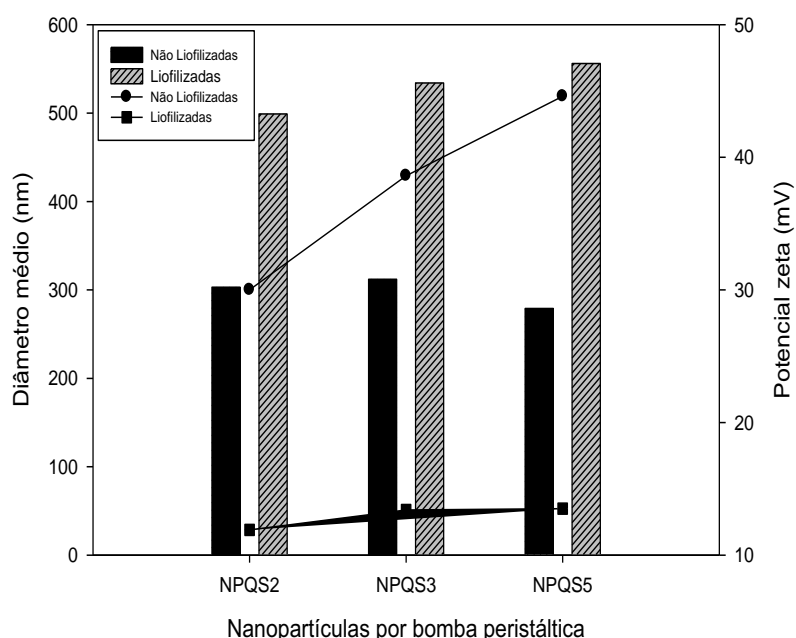
4.3.4. Efeito da liofilização sobre as nanopartículas

A liofilização é uma das técnicas mais utilizadas para produção de pós secos a partir de suspensões de nanopartículas a fim de aumentar a estabilidade química da amostra. Estudos relatam que a maior dificuldade em se produzir as nanopartículas é sua instabilidade em meio aquoso (CHACON *et al.*, 1999), podendo ocorrer agregação e fusão das nanopartículas após um longo período de estocagem (AUVILLAIN *et al.*, 1989). Diante disso, várias metodologias têm sido utilizadas para atenuar ou eliminar água que pode promover a instabilidade destes sistemas nanoparticulados por *spray-drying* (POHLMANN *et al.*, 2002) e liofilização (AUVILLAIN *et al.*, 1989; BOZDAG *et al.*, 2005; HIRJARVI; PELTONEN; HIRVONEN, 2009; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b). No processo de liofilização o sistema é submetido a dois estresses importantes que podem afetar sua estabilidade física, o congelamento e a sublimação (MENDOZA *et al.*, 2009).

A fim de verificar a influência da liofilização sobre as nanopartículas escolhidas para incorporação da DisBa-01, o diâmetro médio e potencial zeta foram avaliados antes e após o processo de liofilização das nanopartículas.

Ao analisar a figura 21, é possível observar que as nanopartículas não liofilizadas apresentam diâmetro médio entre 200 e 400 nm, com valores de potencial zeta entre +30 mV e +50 mV, indicando a estabilidade das suspensões de nanopartículas.

Figura 21. Efeito da liofilização sobre o diâmetro médio (colunas) e potencial zeta (linhas) das nanopartículas.



Quando as nanopartículas são submetidas ao processo de liofilização apresentam aumento no diâmetro médio, indicando a formação de sistemas heterogêneos, com diâmetros acima de 500 nm as quais não são interessantes para administração por via nasal, pois partículas grandes podem ser facilmente removidas da circulação sistêmica por células do sistema fagocitário mononuclear (KIM; KANG, 2008).

O potencial zeta de todas as nanopartículas liofilizadas diminuiu significativamente ($p < 0,05$), o que indica que a liofilização pode ter promovido a

agregação das nanopartículas, isso se deve ao maior contato destas nanopartículas durante o congelamento (estado sólido) levando a diminuição da densidade das cargas superficiais que permitem que as nanopartículas mantenham-se estáveis.

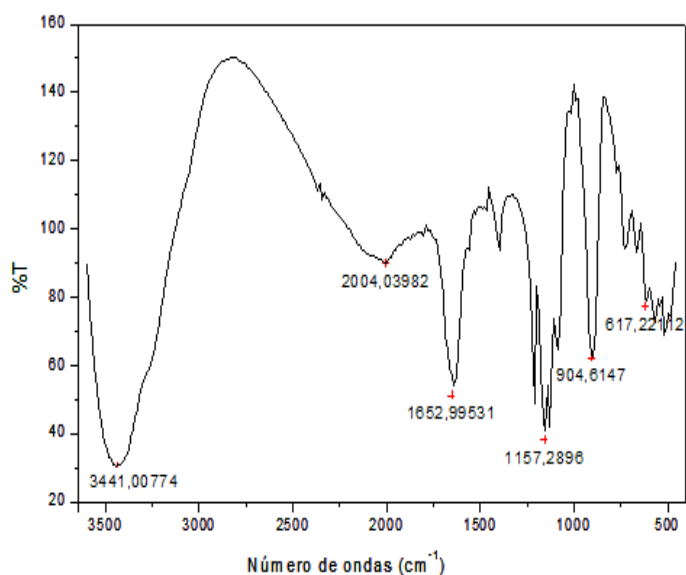
Uma alternativa muito utilizada para garantir que as nanopartículas possam ser liofilizadas permitindo assim que a estabilidade do sistema e da proteína incorporada seja mantida é a utilização de crioprotetores. Dentre os crioprotetores mais comuns na literatura estão os açúcares tais como a trealose, sacarose, glicose, manitol (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006). O efeito protetor destes constituintes pode ser atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as redispersíveis e estáveis (SAEZ *et al.*, 2000).

Este ensaio demonstrou que a liofilização das nanopartículas de quitosana sem o uso de crioprotetores promove o aumento do diâmetro médio e a diminuição do potencial zeta, portanto a liofilização das nanopartículas deve ser realizada com o uso de crioprotetores que evitam a agregação e fusão das nanopartículas permitindo que sejam redispersíveis e continuem a ter o mesmo diâmetro obtido antes do processo de liofilização.

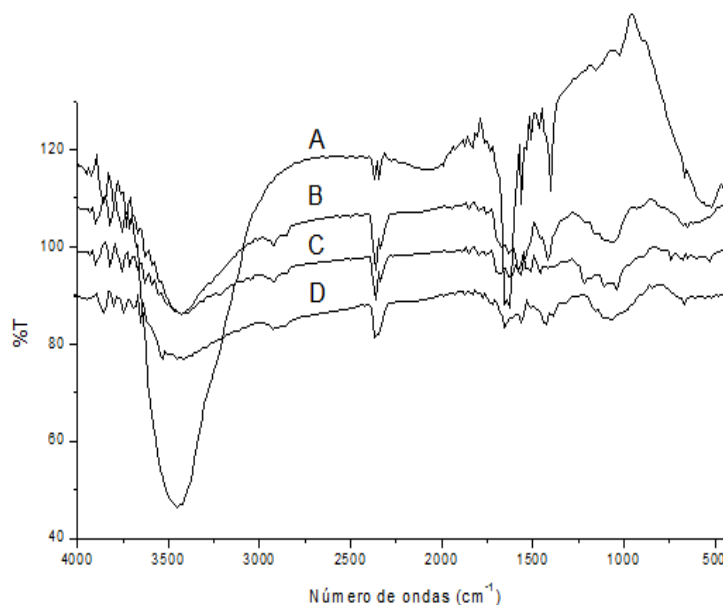
4.3.5. Caracterização física da QS, TPP e nanopartículas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As amostras de QS, TPP e nanopartículas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

O TPP apresentou suas bandas características na região de 1157 cm^{-1} relacionado ao grupamento fosfato P=O e 904 cm^{-1} ao grupamento P-O-P (WU *et al.*, 2005) e em 617 cm^{-1} aparecem as vibrações de deformação, como pode ser observado na figura 22.

Figura 22. Espectro de infravermelho do TPP.

O espectro da QS apresenta banda em 3446 cm^{-1} do estiramento O-H sobreposta a de N-H que aumenta e desloca-se no espectro das nanopartículas de QS e passa a apresentar valores de 3427 cm^{-1} , o que pode indicar a reticulação da QS com TPP através de ligações de hidrogênio que pode ser observado na figura 23.

Figura 23. Espectros de infravermelho de QS (A), NPQS2 (B), NPQS3 (C) e NPQS5 (D).

Nos espectros das nanopartículas apresentados na figura 23 acima, as bandas em 1652 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} do espectro da QS é modificada, e duas novas bandas surgem em 1635 cm^{-1} - 1560 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} - 1560 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} - 1517 cm^{-1} para NPQS2, NPQS3 e NPQS5, respectivamente. As bandas 1652 - 1553 cm^{-1} correspondente a C=O e N-H e pode caracterizar a QS pura, enquanto que o alargamento dessas bandas pode caracterizar a formação das nanopartículas, indicando a interação entre a QS e o TPP (LAMEIRO *et al.*, 2006). O aumento e deslocamento das bandas de amida II da NPQS5 de 1553 cm^{-1} para 1517 cm^{-1} pode indicar que a QS pode estar envolvida em ligações cruzadas com grupos fosfato do TPP.

As bandas de absorção em 1064 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} , e das nanopartículas NPQS2, NPQS3 e NPQS5, respectivamente, apresentam vibrações envolvendo o estiramento C-O que é característico da estrutura sacarídica da QS.

As pequenas bandas em 894 cm^{-1} e 1210 cm^{-1} presente na NPQS5 e as bandas em 894 cm^{-1} e 1151 cm^{-1} presentes na NPQS3 são característicos da estrutura do TPP podendo indicar a presença dele nas nanopartículas formadas.

Os espectros de infravermelho foram importantes, pois permitiram a caracterização química dos materiais utilizados neste trabalho, assim como elucidar os tipos de ligações químicas presentes nas nanopartículas.

4.4. Caracterização da DisBa-01

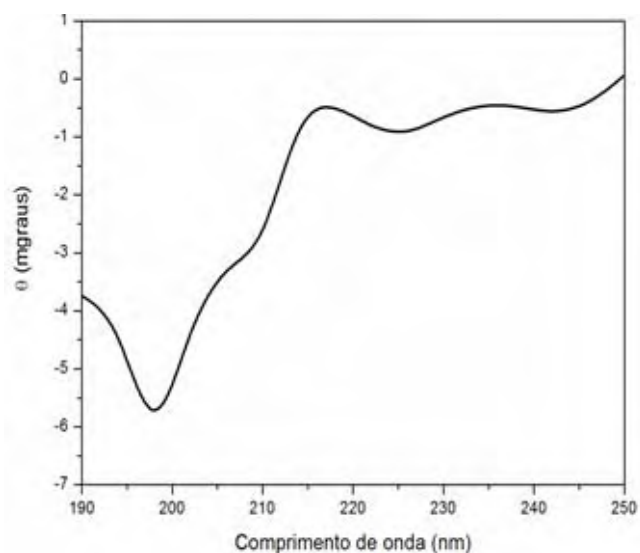
4.4.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular obtidos serviram para auxiliar na identificação da estrutura da DisBa-01 após a sua incorporação nas nanopartículas. Se não houver diferenças significativas, pode-se afirmar que a incorporação da DisBa-01 na solução de TPP 0,1% (*m/v*) e nas nanopartículas não altera a conformação da proteína (SREERAMA; VENYAMINOV; WOODY, 2001; SREERAMA; WOODY, 2000).

As amostras DisBa-01 solubilizada em água purificada e solubilizada em solução de TPP 0,1 % (*m/v*), e incorporadas assim como no desenvolvimento das

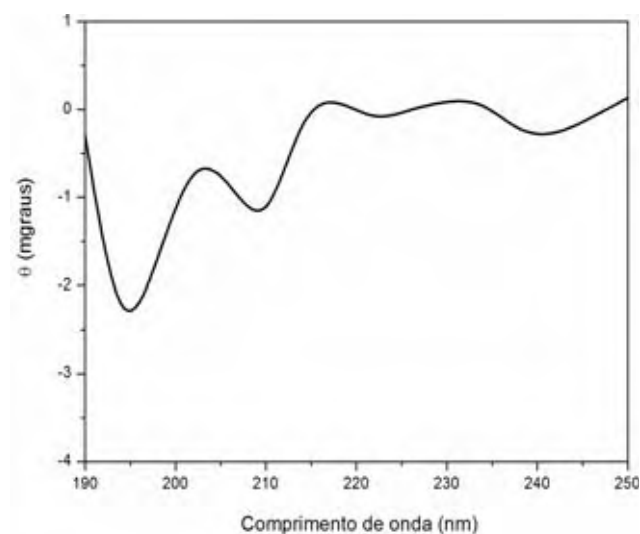
nanopartículas. O espectro de dicroísmo circular da DisBa-01 em água mostra uma banda negativa intensa em 200 nm, semelhante aos espectros de proteínas desordenadas (LUCCA; HANSEN; OLIVA, 2006), (Figura 24).

Figura 24. Espectroscopia de dicroísmo circular de DisBa-01 em água.



A incorporação da DisBa-01 na solução de TPP 0,1 % (*m/v*), não alterou a estrutura desordenada da DisBa-01 e o espectro de dicroísmo permaneceu com o mesmo pico negativo próximo de 200 nm, como observado na figura 25.

Figura 25. Espectroscopia de dicroísmo circular de DisBa-01 em solução de TPP.



A análise dos espectros de dicroísmo da DisBa-01 nas nanopartículas não foi possível devido à presença de bandas de amida presentes na estrutura da QS que são cromóforos e podem ser detectadas pelo espectro de dicroísmo circular na região de absorção da DisBa-01, sendo assim a presença dessas bandas nas nanopartículas interfere no espectro de dicroísmo não sendo possível identificar a presença de DisBa-01.

4.4.2. Avaliação do potencial zeta da DisBa-01

A avaliação do potencial zeta foi realizado com o objetivo de verificar a estabilidade da DisBa-01 em água purificada, tampão fosfato salino (PBS), TPP 0,1% e QS 0,3% com diferentes valores de pH.

O ponto isoelétrico da DisBa-01 é 6,3 (PONTES, 2006; RAMOS, 2005) e o pH das nanopartículas está entre 4,8 e 5,5 devido ao pH de QS e TPP ser entre estes valores. Portanto quando o pH está abaixo do pI, a proteína apresenta-se com carga superficial positiva e valores de potencial zeta elevados, o que determina a estabilidade de DisBa-01 tanto em QS quanto em TPP, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7. Potencial zeta de DisBa-01.

Amostras	Potencial Zeta (mV)
DisBa-01 em água pH 6,8	-17,5 ± 2,10
DisBa-01 em PBS pH 7,4	- 9,45 ± 0,39
DisBa-01 em TPP 0,1% pH 5,5	+20,7 ± 2,08
DisBa-01 em QS 0,3% pH 4,8	+ 37,0 ± 3,64

Quando solubilizamos DisBa-01 em água ou PBS, estes meios apresentam valores de pH acima do pI da proteína, portanto as cargas negativas estão na superfície e podem ser evidenciadas pelo potencial zeta negativo, mostrado na tabela 7.

4.5. Caracterização físico-química das nanopartículas com DisBa-01

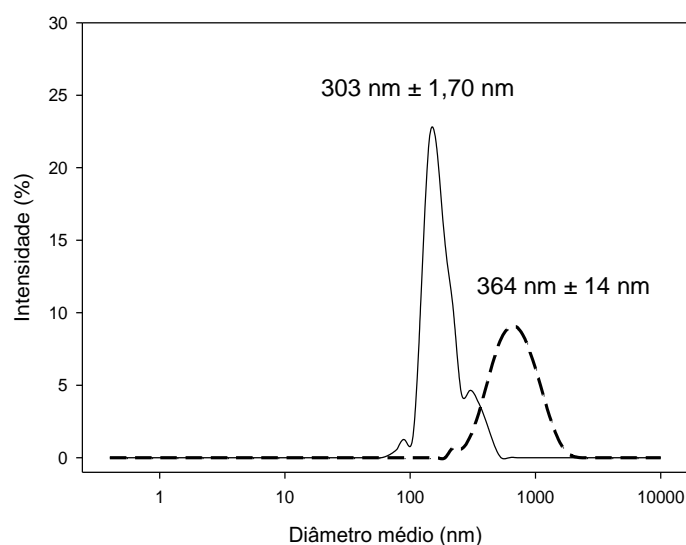
4.5.1. Determinação do diâmetro médio e Pdl das nanopartículas com DisBa-01

A tabela 8 apresenta o diâmetro médio e Pdl das nanopartículas após incorporação da DisBa-01.

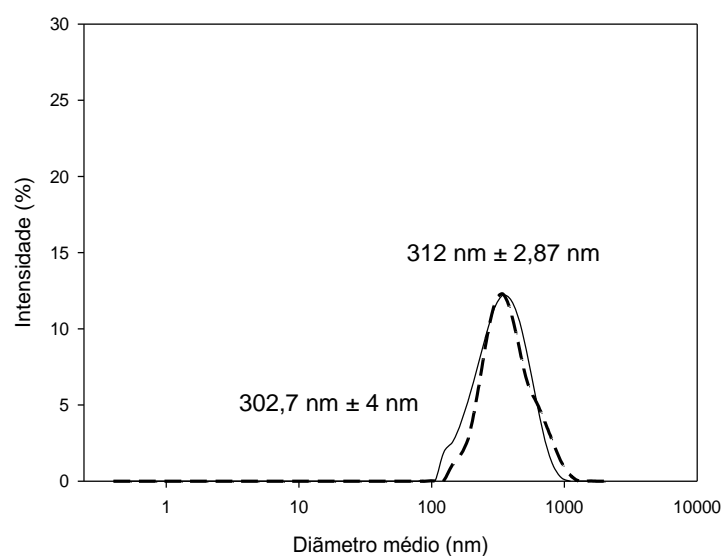
Tabela 8. Diâmetro médio e Pdl das nanopartículas com DisBa-01.

Nanopartículas com DisBa-01	Diâmetro médio (nm)	Pdl
NPQS2	364,5 ± 14	0,40
NPQS3	302,7 ± 4	0,41
NPQS5	644 ± 12	0,54

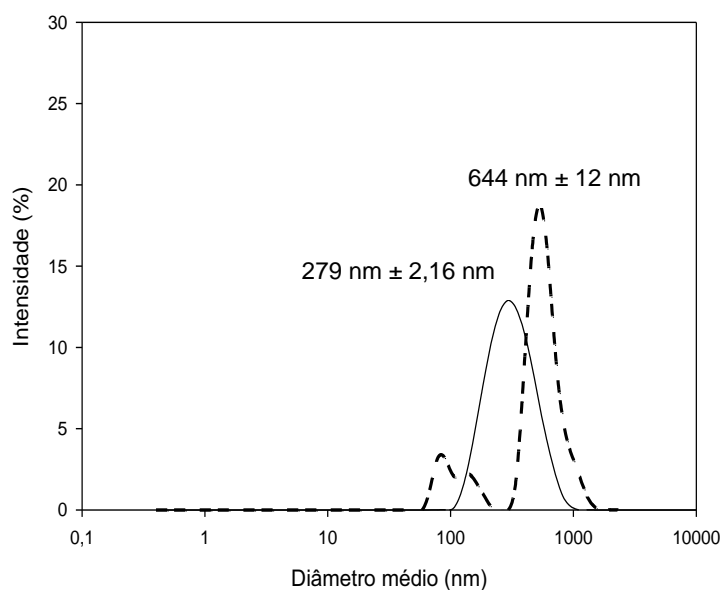
Na nanopartícula NPQS2, observamos que antes da incorporação de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DisBa-01 as nanopartículas apresentaram-se com diâmetro médio de 303 nm \pm 1,70 nm e índice de polidispersidade de 0,39 sendo caracterizado como sistema unimodal (figura 26). Após a incorporação da DisBa-01, o diâmetro médio passou para 364,5 nm \pm 14 nm e o índice de polidispersidade aumentou para 0,40, porém o aumento do diâmetro e do índice de polidispersidade não alterou a homogeneidade do sistema formado após a incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas.

Figura 26. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS2 (—) e NPQS2-DisBa 01(---).

A nanopartícula NPQS3, apresentou um índice de polidispersidade de 0,35 e diâmetro médio de 312 nm ± 2,87 nm indicando que a distribuição granulométrica é homogênea (Figura 27), após a incorporação da DisBa-01 o sistema apresentou um pequeno aumento no índice de polidispersão que passou para 0,41 e o diâmetro médio passou a ser de 302,7 nm ± 4 nm, observamos então que a incorporação da DisBa-01 não afetou a homogeneidade da nanopartícula formada. Ao comparar os diâmetros da NPQS3 com a NPQS3-DisBa-01 nota-se uma pequena diminuição no diâmetro médio que não é significativo.

Figura 27. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS3 (—) e NPQS3-DisBa-01 (---).

A nanopartícula NPQS5 apresentou um diâmetro médio de 279 nm \pm 2,16 nm e índice de polidispersidade de 0,24 (Figura 28) indicando a formação de um sistema unimodal. Após a incorporação da DisBa-01, foi possível observar que o diâmetro médio aumenta significativamente ($p < 0,05$) para 644 nm \pm 12 nm e o índice de polidispersidade passa a ser de 0,54 promovendo a formação de um sistema heterogêneo.

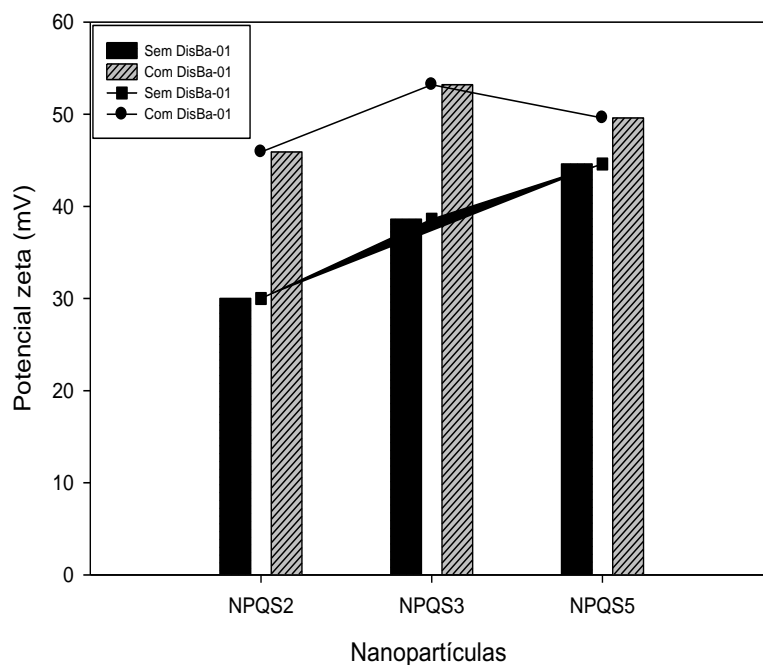
Figura 28. Diâmetro médio das nanopartículas NPQS5 (—) e NPQS5-DisBa-01 (---).

A NPQS5, com maior concentração de QS, foi a que apresentou a formação de um sistema heterogêneo, caracterizado pelo aumento significativo do índice de polidispersidade ($p < 0,05$), não apresentado-se satisfatória para a administração nasal devido ao aumento significativo no diâmetro médio, porém os demais testes serão realizados para caracterizá-la melhor.

As nanopartículas NPQS2 e NPQS3 não apresentaram diferenças no índice de polidispersidade ($p > 0,05$), o que evidencia que a incorporação da DisBa-01 nessas nanopartículas não influenciou na distribuição granulométrica, determinando que as nanopartículas NPQS2 e NPQS3 podem ser potenciais sistemas para a administração nasal da DisBa-01.

4.5.2. Determinação do potencial zeta das nanopartículas com DisBa-01

Após a incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas houve um aumento significativo no potencial zeta de todas as nanopartículas de QS, o que pode indicar que há uma carga adicional de DisBa-01 na superfície das nanopartículas formadas (Figura 29).

Figura 29. Potencial zeta das nanopartículas com e sem DisBa-01.

O potencial zeta da nanopartícula NPQS2 aumentou significativamente de +30 mV para +45.9 mV, assim como a NPQS3 que passou de +38.6 mV para +53.2 mV, por fim, NPQS5 passou de +44.6 para +49.6.

Neste sentido, é desejável que um sistema nanoestruturado apresente uma carga de superfície elevada, já que as forças repulsivas tendem a evitar agregação em função das colisões das nanopartículas. Outro fator importante para as nanopartículas apresentarem cargas superficiais positivas é a interação com a superfície mucosal através das interações eletrostáticas com grupos siálicos presentes no muco, podendo facilitar a absorção da DisBa-01 através da promoção da reorganização estrutural das proteínas associadas às junções intercelulares (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007).

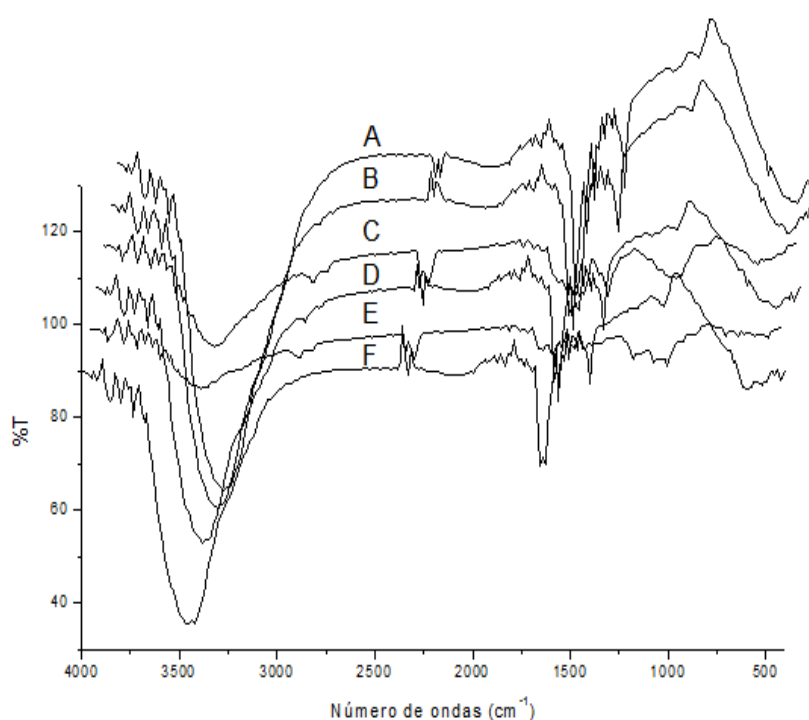
Como o ponto isoelétrico da DisBa-01 é 6,3 (PONTES, 2006; RAMOS, 2005) e o pH do sistema nanoparticulado formado está entre 4,8 e 5,5, abaixo do ponto isoelétrico (pI), a proteína apresenta-se com carga superficial positiva, o que pode contribuir para o aumento do potencial zeta, isso também pode sugerir que há

DisBa-01 não incorporada ou na superfície das nanopartículas de QS, que será confirmado através da eficiência de incorporação da proteína.

4.5.3. Caracterização física das nanopartículas com DisBa-01 por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

O espectro de infravermelho das nanopartículas NPQS2, NPQS3 e NPQS5 sem DisBa-01 apresentam bandas em 3427 cm^{-1} do estiramento O-H sobreposta a de N-H e alargado no espectro das nanopartículas NPQS3-DisBa-01 e NPQS5-DisBa-01 que passa a apresentar valores de 3446 cm^{-1} , o que pode indicar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da QS com a DisBa-01, possivelmente devido a presença de aminoácidos como a arginina, glicina e ácido aspartático presentes na estrutura da DisBa-01 ou devido a presença de grupamentos N-H e OH na estrutura desses aminoácidos contribuindo para um aumento do estiramento de O-H e N-H, observado na figura 30.

Figura 30. Espectros de infravermelho da NPQS2 (A), NPQS2-DisBa-01 (B), NPQS3 (C), NPQS3-DisBa-01 (D), NPQS5 (E) e NPQS5-DisBa-01 (F).



Quando a DisBa-01 é incorporada nas nanopartículas há um alargamento nas bandas de amida I e II que passam a ser 1635 cm^{-1} - 1563 cm^{-1} para NPQS2-DisBa-01 e 1637 cm^{-1} - 1553 cm^{-1} para NPQS3-DisBa-01 e NPQS5-DisBa-01. As bandas de amida I na região de 1620 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} após a incorporação da DisBa-01 pode indicar a presença de aminoácidos presentes na desintegrina como a arginina que apresenta bandas entre 1633 cm^{-1} - 1636 cm^{-1} , como observado na figura 30.

Através dos espectros de infravermelho foi possível identificar as bandas presentes nas nanopartículas com DisBa-01 e constatar que mesmo após sua incorporação, as nanopartículas apresentaram-se com espectros semelhantes as nanopartículas sem DisBa-01, isso pode sugerir que a desintegrina incorporada não afetou na formação das nanopartículas de QS.

4.5.4. Determinação da morfologia das nanopartículas com e sem DisBa-01 por MEV

A MEV foi realizada a fim de verificar a morfologia das nanopartículas. As figuras 31 - 33 representam as fotomicrografias das nanopartículas sem e com DisBa-01, respectivamente.

Figura 31. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS2 (A) e NPQS2-DisBa-01 (B) no aumento de 50.000x.

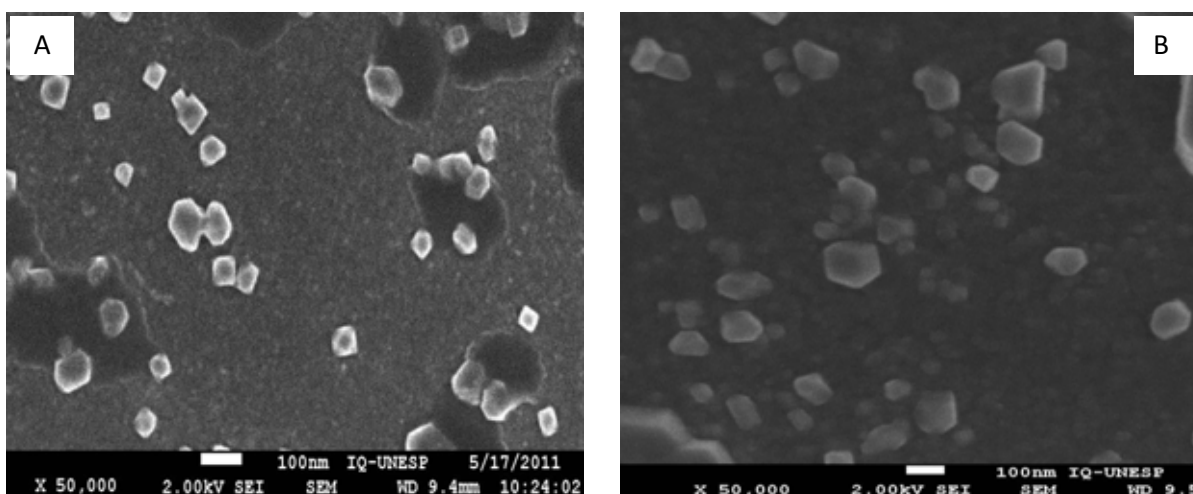


Figura 32. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS3 (A) e NPQS3-DisBa-01(B) no aumento de 50.000x.

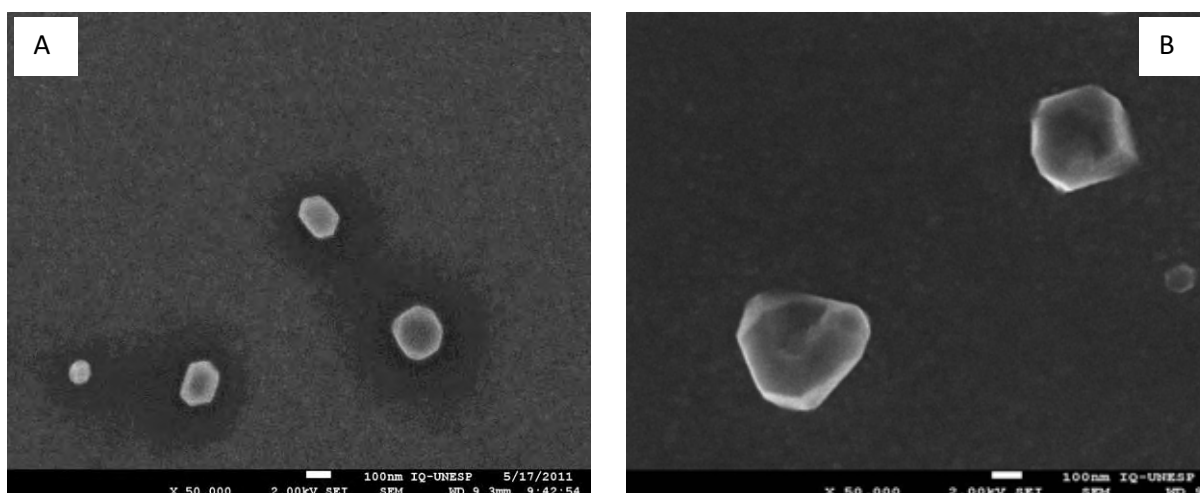
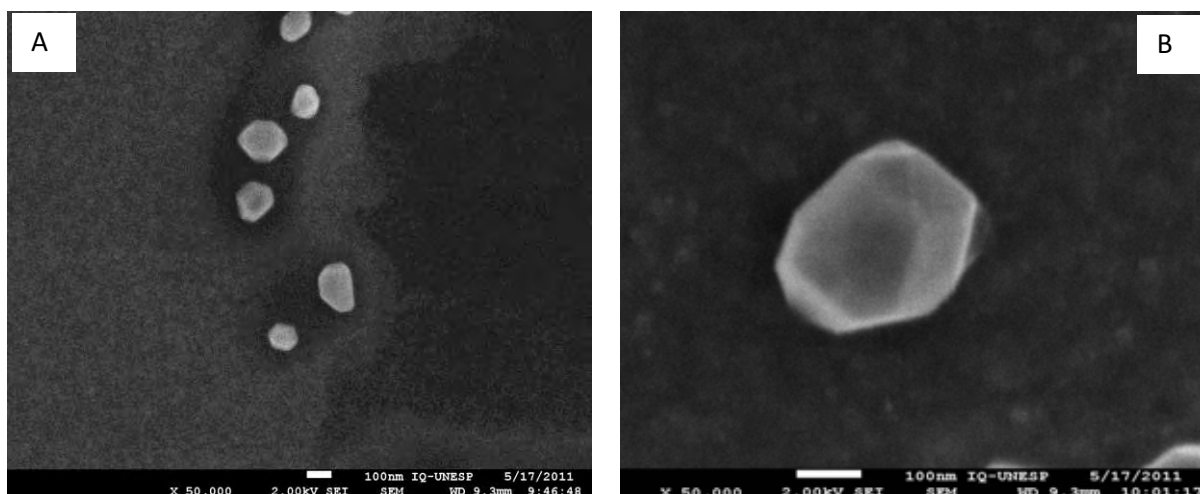


Figura 33. Fotomicrografia da nanopartícula NPQS5 (A) e NPQS5-DisBa-01 (B) no aumento de 50.000x.



É possível observar que nas nanopartículas NPQS2 e NPQS5 após a incorporação de DisBa-01 houve um aumento no diâmetro médio, o que é corroborado com os dados obtidos por espalhamento dinâmico de luz.

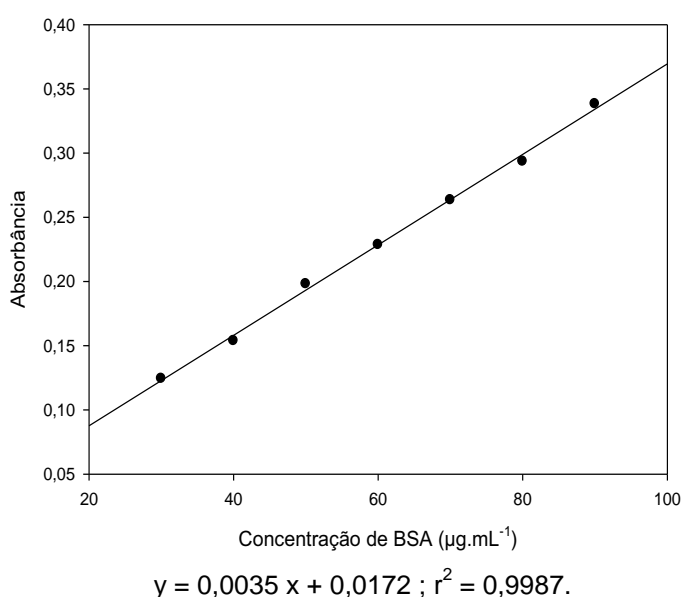
Todas as nanopartículas formadas apresentam-se com forma quase esférica, o que pode evidenciar que a DisBa-01 não interfere na formato das nanopartículas.

4.6. Avaliação dos métodos de incorporação da DisBa-01 nas nanopartículas por meio da eficiência e capacidade de incorporação

Os dois métodos de incorporação testados diferem quanto a adição de DisBa-01 na dispersão de QS (método A) ou solução de TPP (método B), como descrito no item 3.2.5. A fim de avaliar a eficiência de incorporação da DisBa-01 pelos dos dois métodos, a NPQS2 foi selecionada e preparada pelo método A e B e utilizada para comparação com as demais nanopartículas preparadas pelo método B de incorporação. A determinação da quantidade de DisBa-01 associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, o que dificulta a separação da fração de DisBa-01 livre da fração incorporada.

Para determinação da eficiência de encapsulação e da capacidade de carga das nanopartículas foi construída uma curva padrão a partir de uma solução estoque de 1 mg.mL^{-1} de solução de BSA, utilizada como proteína padrão para determinação de outras proteínas. Através da curva padrão construída nas concentrações de $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ – $90 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BSA (Figura 34), e a partir da equação da regressão linear obtida, foi possível determinar a concentração de DisBa-01 livre em 5 mL de sobrenadante, que foi determinado pelo ensaio de proteína BCA a 562 nm (CHEN; ZHANG; HUANG, 2007).

Figura 34. Curva padrão de BSA, obtida por espectroscopia do UV-visível a 562 nm.



Ao fim da determinação da concentração de DisBa-01 livre, foi possível determinar a eficiência e capacidade de incorporação da desintegrina nas nanopartículas. A eficiência de encapsulação e capacidade de incorporação foram calculadas através das equações 4 e 5.

A tabela 9 mostra os valores da eficiência de encapsulação e capacidade de incorporação obtida para cada um dos experimentos propostos. Os valores de eficiência de encapsulação encontrados na literatura, utilizando o mesmo método da gelificação ionotrópica, apresentam uma faixa ampla de valores, semelhantes aos apresentados neste trabalho (CSABA; KÖPING-HÖGGÅRD; XU, DU, 2003).

Tabela 9. Avaliação da eficiência de incorporação (EI) e capacidade de incorporação (CI) das nanopartículas com DisBa-01 em relação ao volume final de sobrenadante (5 mL).

Amostras	[DisBa-01] _{livre} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[DisBa-01] _{incorporada} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	EI (%)	CI (%)
NPQS2-DisBa-01 (Método A)	8,42	21,6	71,94	20,75
NPQS2-DisBa-01 (Método B)	10,22	19,8	65,96	29,08
NPQS3-DisBa-01 (Método B)	8,23	21,8	71,58	15,34
NQS5-DisBa-01 (Método B)	19,8	10,2	34	6,38

Os resultados obtidos para eficiência de incorporação neste trabalho variaram de 34 % a 71,9 %, que são considerados altos. Chen e colaboradores (2007) também verificaram os mesmos valores de eficiência de incorporação de proteínas pelo método de gelificação ionotrópica.

Quando comparamos os métodos A e B para NPQS2 e NPQS2-DisBa-01 notamos que a DisBa-01 solubilizada na solução de QS favoreceu a eficiência de incorporação quando comparado a DisBa-01 solubilizada em solução de TPP, que pode ter ocorrido devido as maiores interações eletrostáticas entre grupos amino livres da QS com a desintegrina.

Quando comparamos o método B com nanopartículas formadas por diferentes concentrações de QS, é possível observar que a maior concentração de QS (0,5 % *m/v*), foi a que obteve menor eficiência de incorporação. Vanderberg e

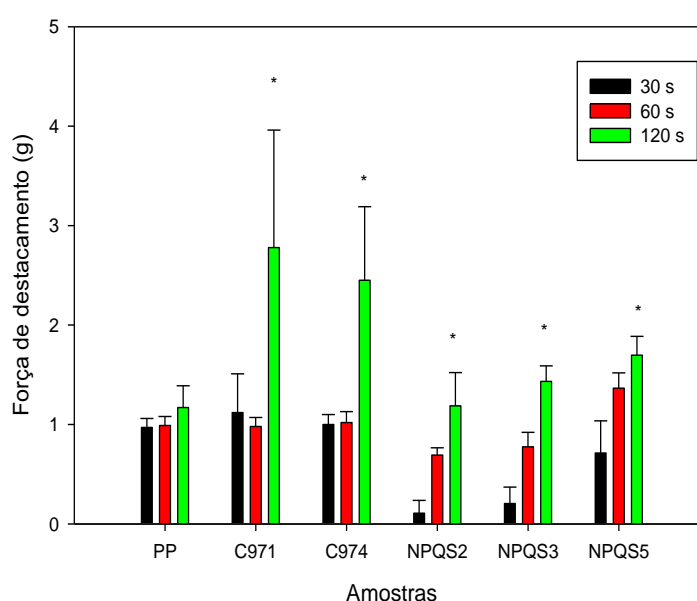
colaboradores (2001) relataram que a natureza altamente viscosa do meio de gelificação dificulta a encapsulação de proteínas.

4.7. Avaliação da mucoadesão das nanopartículas

A utilização de QS como polímero mucoadesivo tem sido muito explorada na preparação de nanopartículas como sistema de liberação nasal devido às interações eletrostáticas deste polímero com os grupos siálicos da mucina que compõe a camada do muco na cavidade nasal. Portanto, devido as propriedades de mucoadesão da QS, os ensaios de mucoadesão foram realizados com as nanopartículas de QS e comparados com polímeros mucoadesivos, este ensaio tem por finalidade avaliar a mucoadesão das nanopartículas em mucosa nasal suína.

As amostras de nanopartículas NPQS2, NPQS3 e NPQS5 exibiram um comportamento distinto. Os valores de força máxima de destacamento (F_{MD}) foram dependentes do tempo usando a mucosa nasal suína, enquanto para os polímeros mucoadesivos este comportamento só foi observado após 120 s. Os resultados da F_{MD} das nanopartículas e polímeros padrões são mostrados na figura 35.

Figura 35. Força máxima de destacamento das nanopartículas sobre a mucosa nasal suína. *Diferenças estatisticamente significativa entre todas as amostras nos mesmos tempos testados ($p < 0,05$).

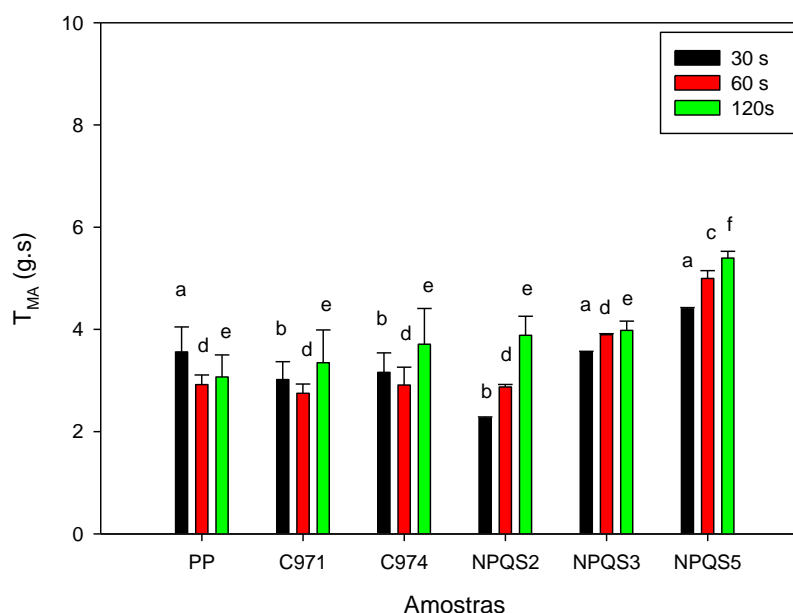


Os resultados na figura 35 demonstram que não há diferenças significativas na F_{MD} em relação aos tempos de contatos de 30 s e 60 s ($p > 0,05$) entre polímeros e nanopartículas, enquanto que para os tempos de 30 s e 60 s diferem significativamente de 120 s ($p < 0,05$). O maior tempo de contato (120 s) entre as amostras e a mucosa foi suficiente para estabelecer um contato íntimo entre polímeros, nanopartículas e a superfície da mucosa nasal permitindo a interpenetração das cadeias poliméricas por meio de ligações intermoleculares, sendo assim, o tempo foi suficiente para promover o intumescimento e a mucoadesão (THIRAWONG *et al.*, 2007).

Ao observarmos a figura 36, notamos que a presença de QS sobre a superfície das nanopartículas aumentou significativamente ($p < 0,05$) o comportamento mucoadesivo da NPQS3 e NPQS5 nos tempos de 60 s e 120s. Esses resultados são condizentes com os obtidos por Tobyn (1995) e Wong (1999), no qual diferentes tipos de polímeros (QS, PP, hidropilmetilcelulose de sódio) e modelos de mucosas foram utilizados.

Neste caso, os resultados sugerem que o aumento do trabalho de mucoadesão (T_{MA}) é devido ao grau de hidratação e o intumescimento do polímero que é suficiente para expandir a rede polimérica mucoadesiva. Além do aumento do tempo de contato, a concentração de QS nas nanopartículas pode promover a interdifusão e o entrelaçamento entre QS e as cadeias de mucina na mucosa nasal suína.

Figura 36. Trabalho de mucoadesão (T_{MA}) das nanopartículas sobre a mucosa nasal suína. (Letras diferentes indicam diferenças significativas $p < 0,05$ para o mesmo tempo e diferentes amostras).



Um tempo de contato cada vez maior entre a QS e o muco, poderia, portanto, aumentar a mucoadesão e melhorar a absorção de proteínas, como a DisBa-01 (SOANE *et al.*, 2001). Isto também pode ser explicado pela teoria da adsorção, em que a QS presente nas nanopartículas exibe fortes propriedades mucoadesivas devido à formação de ligações de hidrogênio entre cargas positivas dos grupos amino da QS e cargas carregadas negativamente de resíduos de ácido siálico da mucina (JANES, 2001; CARVALHO, 2010), prolongando assim o tempo de contato entre as nanopartículas e a camada de muco (SOANE *et al.*, 2001).

Ao avaliar as nanopartículas em concentrações acima de 3 mg.mL^{-1} de QS, observa-se que houve um aumento da mucoadesão, proporcionando fortes propriedades mucoadesivas devido ao aumento dos grupos amino da QS que podem interagir com mais mucina carregada negativamente. Os resultados sobre as nanopartículas com DisBa-01 foram semelhantes ao das nanopartículas sem DisBa-01, concluindo que o encapsulamento da proteína não alterou as propriedades mucoadesivas das nanopartículas.

4.8. Avaliação viabilidade celular de células K-562 e HUVEC pela técnica de MTT

Inicialmente, foi realizado um teste para verificar o potencial citotóxico das amostras em estudo, a fim de medir a viabilidade celular da linhagem K-562 e HUVEC, empregando o método colorimétrico quantitativo com MTT, como descrito por Mosmann (1983). Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução do anel tetrazólio. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida da função mitocondrial (Mosmann 1983). As células utilizadas foram células de leucemia mieloide crônica (K-562) e células endoteliais (HUVEC).

A citotoxicidade das nanopartículas sem DisBa-01 e com DisBa-01 foram avaliadas pela adição das mesmas à cultura celular de K-562 e HUVEC. Foram realizadas diluições seriadas com diferentes concentrações de DisBa-01, nanopartículas com e sem DisBa-01. Os resultados do ensaio de citotoxicidade na figura 37 e 38 indicaram que DisBa-01, nanopartículas com e sem DisBa-01 nas concentrações testadas não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a viabilidade celular, portanto podem ser utilizadas para os demais ensaios.

Figura 37. Viabilidade celular das células K-562 durante 24 horas de ensaio.

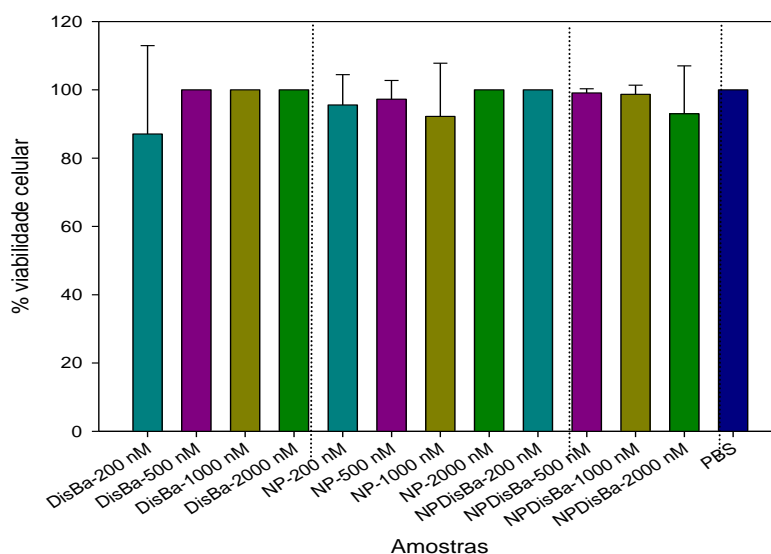
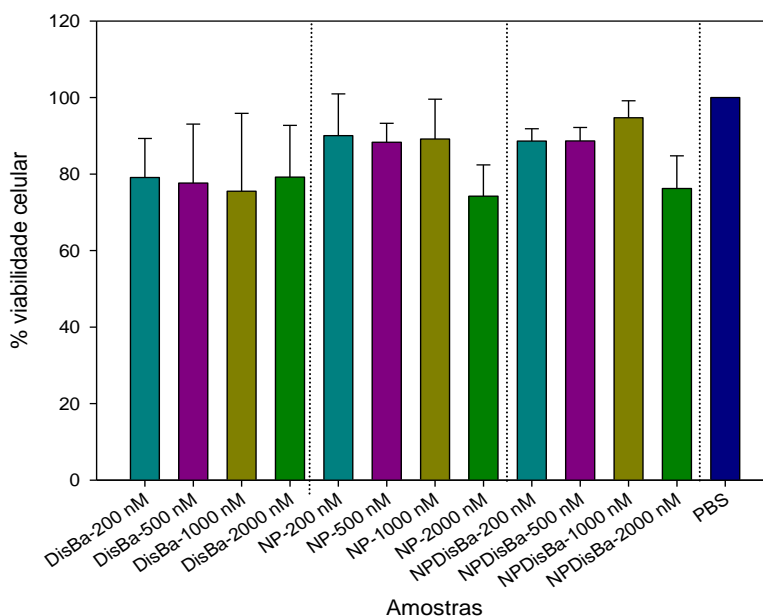


Figura 38. Viabilidade celular das células HUVEC durante 24 horas de ensaio.

4.9. Avaliação da inibição da adesão de células K-562

A figura 39 apresenta os resultados do ensaio de inibição da adesão de células K-562, os resultados estão expressos em porcentagem de células aderidas a fibronectina (FN), tendo como controle positivo as células incubadas com FN em PBS considerados como 100 % de adesão.

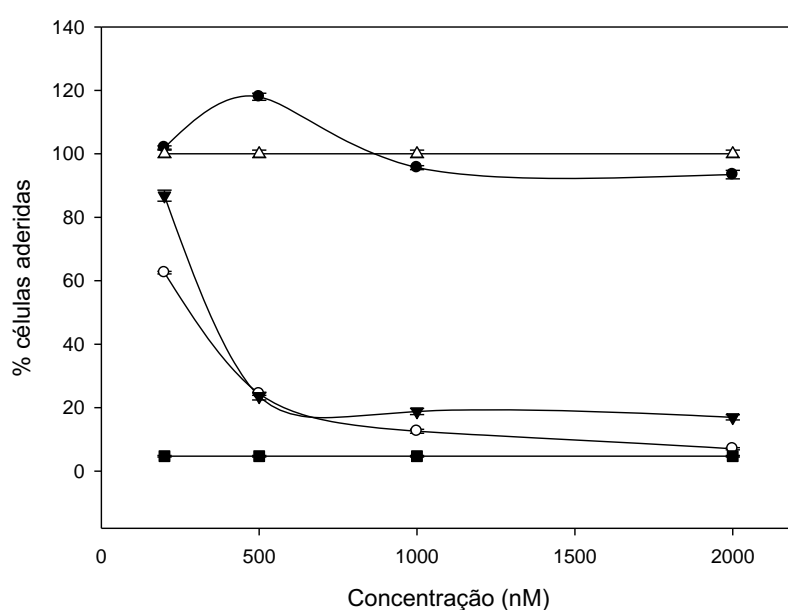
Os resultados mostram que DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão celular mediada por fibronectina em baixas concentrações (200 nM e 500 nM), uma vez que previamente incubadas com células K-562 não foi capaz de impedir que as mesmas se aderissem a fibronectina (COMINETTI, 2004).

O efeito inibitório na adesão das células a fibronectina é desempenhado pelo motivo RGD presente na DisBa-01 que é capaz de inibir a integrina $\alpha_5\beta_1$ (RAMOS, 2005; RAMOS et al., 2008).

As células K-562 expressam em suas membranas grandes quantidades da integrina $\alpha_5\beta_1$ (NATH *et al.*, 1999), quando analisamos DisBa-01 nas concentrações de 1000 nM e 2000 nM a inibição da adesão é 4 a 6% de inibição. DisBa-01 apresentou uma curva dose-resposta em forma de sino, exercendo um efeito

estimulador na adesão das células K-562 em baixas concentrações e em elevadas concentrações este efeito foi diminuído, apresentando um efeito inibitório, porém este efeito foi fraco, o que pode indicar uma fraca especificidade de DisBa-01 com a integrina $\alpha_5\beta_1$ para inibir a adesão celular de K-562 a fibronectina (REYNOLDS, 2010).

Figura 39. Porcentagem de células K-562 aderidas a placas recobertas com fibronectina - ($p < 0,001$ * são estatisticamente significativos para DB, NPDB 500 nM, 1000 nM e 2000 nM).



Legenda: (● DisBa-01; ○ NP; ▼ NPDB (nanopartícula com DisBa-01); ▲ FN e ■ BSA)

Quando analisamos as nanopartículas com e sem DisBa-01, observamos que em relação a inibição de K-562 por DisBa-01 estas amostras apresentam diferenças significativas nas concentrações acima de 500 nM, chegando a 92% de inibição da adesão para NP-2000 nM e 83% de inibição para NPDB-2000 nM, o que evidencia que as nanopartículas têm um efeito sobre a inibição da adesão, porém não está relacionado com a inibição das integrinas.

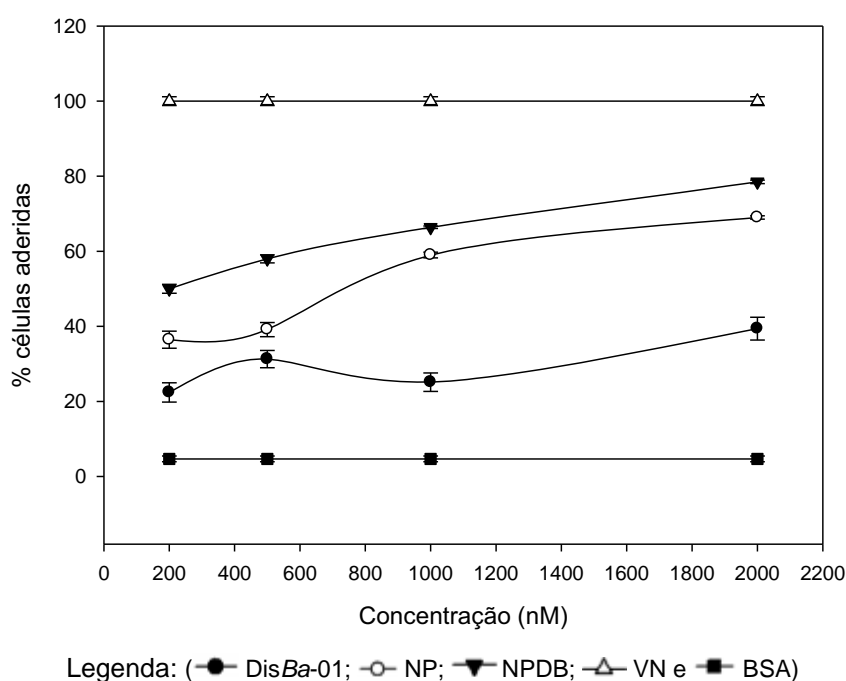
A possível explicação para a inibição da adesão das células K-562 pelas nanopartículas pode estar relacionada a alta afinidade que as nanopartículas de quitosana apresentam pelas células tumorais devido a fortes interações eletrostáticas entre as cargas negativas das células tumorais e as cargas positivas

das nanopartículas de quitosana, assim as células de K-562 estariam ligadas as nanopartículas, o que sugere que haja um impedimento das células se ligarem a fibronectina, este mecanismo seria importante pois inibiria a adesão destas células tumorais a matriz extracelular (DONG, FENG, 2004; LEE, LIM, KIM, 2002; WILHELM *et al.*, 2003).

4.10. Avaliação da inibição da adesão de células HUVEC

A figura 40 apresenta os resultados do ensaio de inibição da adesão de células HUVEC, os resultados estão expressos em porcentagem de células aderidas a vitronectina (VN), tendo como controle positivo células incubadas com VN em PBS considerados como 100% de adesão.

Figura 40. Porcentagem de células HUVEC aderidas a placas recobertas com vitronectina - ($p < 0,05^*$ para valores estatisticamente significativos).



Os resultados demonstram que DisBa-01 foi capaz de inibir a adesão celular de HUVEC mediada por vitronectina em todas as concentrações testadas, entretanto, a concentração de 200 nM e 1000 nM apresentaram maior inibição da

adesão chegando a 77,6% e 74,85%, respectivamente (COMINETTI, 2004; PONTES, 2006).

O efeito inibitório na adesão das células a vitronectina é desempenhado pelo motivo RGD presente na DisBa-01 que é capaz de inibir as integrina $\alpha_v\beta_3$ (RAMOS et al., 2008), portanto, DisBa-01 foi capaz de impedir que células HUVEC se aderissem a vitronectina (PONTES, 2006).

Quando analisamos os resultados de nanopartículas com DisBa-01, observa-se que todas as concentrações apresentaram inibição da adesão, porém, com o aumento da concentração há também o aumento de células aderidas, o que promove a diminuição da inibição da adesão de células HUVEC à vitronectina. Estes resultados podem evidenciar que quando DisBa-01 está nas nanopartículas a curva dose-resposta apresenta formato de J, em que a inibição celular é maior em baixas concentrações e quando há uma aumento das concentrações este efeito inibitório é perdido, portanto a inibição da adesão é menor (REYNOLDS, 2010).

CONCLUSÕES

As nanopartículas de quitosana com diferentes razões de quitosana e TPP foram obtidas com êxito pela técnica de gelificação ionotrópica, tanto na presença quanto na ausência de DisBa-01. Essa técnica permitiu encapsular a DisBa-01 com adequada eficiência, pois é um método eficaz para a encapsulação de proteínas.

As análises físico-químicas mostraram que as nanopartículas obtidas apresentaram forma praticamente esférica e diâmetro entre 280 e 312 nm e após incorporação de DisBa-01 o diâmetro ficou entre 300 e 644 nm, em que as melhores características granulométricas mais adequadas entre as nanopartículas de quitosana foram obtidas com as concentrações de 0,2 % (m/v) e 0,3 % (m/v). As medidas de potencial zeta sugerem que o quitosana encontra-se disposta na superfície das nanopartículas e após incorporação de DisBa-01 sugere que a desintegrina também esteja na superfície das nanopartículas.

Os estudos de mucoadesão das nanopartículas mostraram que a mucoadesão das nanopartículas aumenta com o aumento da concentração de quitosana e o tempo de contato com a mucosa nasal suína, o que evidencia que quanto maior o tempo de contato maior é a ligação com a mucina e assim, maior a mucoadesão.

Os ensaios de viabilidade celular em células K-562 e HUVEC sugere que todas as amostras e concentrações testadas não promoveram alterações na viabilidade celular após 24 horas de ensaio.

Nos ensaios de inibição da adesão de células K-562, os resultados mostram que DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão celular mediada por fibronectina em baixas concentrações, quando analisamos DisBa-01 nas concentrações de 1000 nM e 2000 nM a inibição da adesão é 4 a 6% de inibição, o que pode indicar uma fraca especificidade de DisBa-01 com a integrina $\alpha_5\beta_1$.

Nos ensaios de inibição da adesão para células HUVEC, demonstram que DisBa-01 foi capaz de inibir a adesão celular de HUVEC mediada por vitronectina em todas as concentrações testadas, entretanto, a concentração de 200 nM e 1000

nM apresentaram maior inibição da adesão chegando a 77,6% e 74,85%, respectivamente.

Dessa maneira, o trabalho demonstra que as nanopartículas de quitosana podem apresentar um potencial sistema de liberação desta proteína. As nanopartículas contendo DisBa-01 são potenciais sistemas de liberação controlada para aplicação no tratamento de doenças como o câncer. Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliação deste potencial.

PERPECTIVAS FUTURAS

Moléculas catiônicas como a quitosana têm sido muito utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de proteínas que podem ser administradas por via nasal. As nanopartículas de quitosana podem interagir com a superfície de absorção da mucosa, a qual é carregada negativamente em pH fisiológico, devido à natureza química das membranas celulares e das moléculas de mucina. Essa observação é base do mecanismo proposto para polímeros catiônicos, como a quitosana, cuja mucoadesão é estabelecida pelas interações eletrostáticas com os grupos siálicos da mucina presente no muco, além de promover a absorção de moléculas hidrofílicas pela promoção da reorganização estrutural das proteínas associadas às junções intercelulares. A via nasal tem gerado grande interesse como rota alternativa para administração de proteínas e os sistemas mucoadesivos tem sido empregados para diminuir a remoção da formulação pelos mecanismos de depuração mucociliar, permitindo maior contato entre a formulação e o local de absorção na cavidade nasal além de favorecer a passagem de fármacos através da barreira hematoencefálica atingindo o SNC. Os glioblastomas multiformes (GBMs) são os tumores mais invasivos do sistema nervoso central, sua invasividade está relacionada com a interação com glicoproteínas da matriz extracelular, como a vitronectina e fibronectina. Estas glicoproteínas interagem com integrinas presentes nas células tumorais facilitando a adesão e migração destas células no tecido cerebral. As integrinas, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, e $\alpha_v\beta_3$ são fortemente expressas em GBMs, e podem ser utilizadas como moléculas alvo na terapia contra o câncer no sistema nervoso central. Os inibidores de integrinas conhecidos como desintegrinas, vêm sendo consideradas potentes inibidores da adesão celular e utilizadas no combate de diversas patologias, entre elas, o câncer. A desintegrina cilengitide têm sido estudada contra GBMs, pois inibe as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_5\beta_1$. Outra desintegrina é a DisBa-01, que interage especificamente com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ exibindo potentes propriedades anti-tumorais. Entretanto a aplicação de proteínas terapêuticas é limitada freqüentemente pela baixa estabilidade em fluidos fisiológicos, potencial imunogênico e alergênico, assim como a baixa biodisponibilidade. Para contornar estes problemas, tem-se buscado

novos sistemas de liberação de fármacos e rotas alternativas de administração, como por exemplo, a via nasal. Assim, para a continuação desta pesquisa será avaliado o efeito das nanopartículas de quitosana administradas por via nasal como carreadores de desintegrinas para o cérebro e promover a liberação no sítio tumoral por inibição das integrinas específicas presentes nos glioblastomas, podendo ser uma alternativa para a terapia anti-tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 63, p. 87-94, 2006.

AGNIHOTRI, S. A.; NADAGOUDA, N. M.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release**, v. 100, p. 5-28, 2004.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILLI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. **Carbohydr. Polym.**, v. 75, n. 4, p. 566-574, 2009.

ALSARRA, I. A.; BETIGERI, S. S.; ZHANG, H.; EVANS, B. A.; NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, p. 3637-3644, 2002.

AMIDI, M.; ROMEIJN, S. G.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E.; HENNINK, W. E.; JISKOOT, W. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. **J. Control. Release**, v. 111, p. 107–116, 2006.

AMIDI, M.; ROMEIJN, S. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E.; BUNGENER, L.; HUCKRIEDE, A.; CROMMELIN, D. J. A.; JISKOOT, W. *N*-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. **Vaccine**, v. 25, p. 144–153, 2007.

AUVILLAIN, M.; CAVE, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, P. J. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **STP Pharma. Sci.**, v. 5, p. 738-744, 1989.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604-617, 2008.

BARNABAS, W.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, K. P. S.; MUTHU, R. M.; BHOJRAJ, S. Chitosan nanoparticles as new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomed-Nanotechnol.**, v. 6, p. 144-152, 2010.

BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 7-20, 1995.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E1-E6, 2006.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. **Method Enzymol.**, v. 248, p. 345–368, 1995.

BOZDAG, S.; DILLEN, K.; VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 6, p. 699-707, 2005.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, p. 2233-2243, 2007.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

BYUN, Y.; HWANG, J. B.; BANG, S. H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P. L.; PARK, H. J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol and loaded poly- ϵ -copolactone (PCL) nanoparticles. **Food Sci. Technol.**, v. 44, p. 24-28, 2011.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, p. 323-328, 2003.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.

CALVO, P.; REMUÑAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, C. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 63, p. 125-132, 1997.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989. 425 p.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIÃO, M. P. D. Surfactant systems for nasal AZT delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 62, p. 430-439, 2010. DOI: 10.1211/jpp/62.04,0004.

- CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1903-1912, 1998.
- CERCHIARA, T.; LUPPI, B.; CHIDICHIMO, G.; BIGUCCI, F.; ZECCHI, V. Chitosan and poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) microparticles as nasal sustained delivery systems. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 61, p. 195–200, 2005.
- CHACON, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (D,L lactide-glycolide) carriers. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.
- CHALASANI, K. B.; RUSSELL-JONES, G. J.; YANDRAPU, S. K.; DIWAN, P. V.; JAIN, S. K. A novel vitamin B₁₂-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. **J. Control. Release**, v. 117, p. 421-429, 2007.
- CHEN, F.; ZHANG, Z.-R.; HUANG, Y. Evaluation and modification of *N*-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p. 166-173, 2007.
- COMINETTI, M. R. **Estudo dos efeitos de metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica.** 2004. 199f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M. Les perspectives d'utilisation des formes microdispersées comme vecteurs intracellulaires. **Pharmaceutic. Acta Helvechia**, v. 53, n. 12, p. 341-347, 1978.
- COUVREUR, P.; VRANCKY, H. BRASSEUR, F.; ROLAND, M. Toxicité des nanospheres a base de polycyanoacrylates d'alkyle. **STP Pharma. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 31-37, 1989.
- CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 382, p. 205–214, 2009.
- CUN, D.; JENSEN, D. K.; MALTESEN, M. J.; BUNKER, M.; WHITESIDE, P.; SCURR, D.; FOGED, C.; NIELSEN, H. M. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 26-35, 2011.
- DAMGÉ, C.; VRANCKX, H.; BALSCHMID, T. P.; COUVREUR, P. Poly (alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, n. 12, p. 1403-1409, 1997.

DANEN, E. H.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M.; VAN KRAATS, A. A.; PACHTER, J. A.; RUITER, D. J.; NIEWIAROWSKI, S.; VAN MUIJEN, G. N. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, v. 238, p. 188-196, 1998.

DAVIS, S. S. Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 2, n. 11, p. 450-456, 1999.

DENNIS, M. S.; HENZE, L. W. J.; PITTI, R. M. Platelet glycoprotein lib-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 2471-2475, 1990.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 10, p. 9-22, 2010.

DEV, A.; BINULAL, N. S.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydr. Polym.**, v. 80, p. 833-838, 2010.

DONG, Y.; FENG, S.S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 25, n.14, p. 2843-2849, 2004.

DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydr. Polym.**, v. 8, p. 243-251, 2010.

DYER, A. M.; HINCHCLIFFE, M.; WATTS, P.; CASTILE, J.; JABBAL-GILL, I.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; ILLUM, L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. **Pharm. Res.**, v. 19, p. 998-1008, 2002.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; AYNIE, I.; NAKADA, Y.; LAMBERT, G.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. **J. Control. Release**, v. 53, p. 137-143, 1998.

FERDUS, A.; STEMBRIDGE, N. Y.; SINGH, M. Role of monensin PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins in vitro. **J. Control. Release**, v. 50, p. 71-78, 1998.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS. J.**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FRANSE, N.; BJORCK, E.; EDSMAN, K. Changes in the Mucoadhesion of Powder Formulations after Drug Application Investigated with a Simplified Method, **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 9, 2008, DOI 10.1002/jps

FUNDUEANU, G.; CONSTANTIN, M.; DALPIAZ, A.; BORTOLOTTI, F.; CORTESI, R.; ASCENZIC, P.; MENEGATTI, E. Preparation and characterization of starch cyclodextrin bioadhesive microspheres as platform for nasal administration of Gabexate Mesylate (Foy[®]) in allergic rhinitis treatment. **Biomaterials**, v. 25, p. 159-170, 2004.

GAVINI, E.; HEGGE, A. B.; RASSU, G.; SANNA, V.; TESTA, C.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 9-15, 2006.

GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 245–252, 2008.

GENTILUCCI, L.; CARDILLO, G.; SPAMPINATO, S.; TOLOMELLI, A.; SQUASSABIA, F.; MARCO, R.; BEDINI, A.; BAIULA, M.; BELVISI, L.; CIVERA, M. Antiangiogenic Effect of Dual/Selective $\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 3$ Integrin Antagonists Designed on Partially Modified Retro-Inverso Cyclotetrapeptide Mimetics. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 106-118, 2010.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, n. 5430, p.1028-1032, 1999.

GOOD, D. J.; POLVERINI, P. J.; RASTINEJAD, F.; BEAU, M. M. L.; LEMONS, R. S.; FRAZIER, W. A.; BOUCK, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 6624-6628, 1990.

GUIMARÃES, T. F. **Nanopartículas de quitosana como carreadoras de etoposide**. 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

HÄGERSTRÖM, H. Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery. **Acta Univ. U.**, n. 293, p. 76, 2003.

HEIN, S.; WANG, K.; STEVENS, W. F.; KJEMS, J. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. **Mater. Sci. Technol.**, v. 24, p. 1053-1061, 2008.

HIRSJARVI, S.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. **AAPS Pharmscitech**, v. 10, n. 2, p. 488-494, 2009.

HRKACH, J. et al. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. **Sci. Transl. Med.**, v.4, n. 128ra39, p. 1-11, 2012.

HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol. Life Sci.**, v. 54, p. 527-540, 1998.

HUANG, T. F.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: the naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptor. **J. Toxicol.**, v. 13, n. 3, p. 253-273, 1994.

ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **J. Control. Release**, v. 87, p. 187-198, 2003.

JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 47, p. 83-97, 2001.

JANES, K.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization, **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 12, p. 2769–2776, 2003.

JENSEN, D. M. K.; CUN, D.; MALTESEN, M. J.; FROKJAER, S.; NIELSEN, H. M.; FOGED, C. Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. **J. Control. Release**, v. 142, p. 138-145, 2010.

JUNGINGER, H. E.; VERHOEF, J. C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs - a fiction? **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 1, n. 9, p. 370-376, 1998.

KANG, I. C.; CHUNG, K. H.; LEE, S. J.; YUN, Y.; MOON, H. M.; KIM, D. S. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. **Thromb. Res.**, v. 91, p. 65–73, 1998.

KANG, M. L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 857–886, 2009.

KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; RAMOS, O.H.; BECHYNE, I.; RENARD, J.-M.; HOYLAERTS, M. F.; CREPIN, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BONNEFOY, A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 6604-6616, 2008.

- KIM, B. G.; KANG, I. J. Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using AFM, SEM, and TEM. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1168-1173, 2008.
- KONSTANTOPOULOS, K.; THOMAS, S. N. Cancer Cells in Transit: The Vascular Interactions of Tumor Cells. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 11, p. 177- 202, 2009.
- KRAULAND, A. H.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated chitosan microparticles: A vehicle for nasal peptide drug delivery. **Int. J. Pharm.** v. 307, p. 270–277, 2006.
- KREUTER, J.; SPEISER, P. P. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. **Infect. Immun.**, v. 13, p. 204-210, 1976.
- KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M. Nanotechnology on duty in medical application, **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 6, p.17–33, 2005.
- LAM, T. D.; HOANG, V. D.; LIEN, L. N.; THINH, N. N.; DIEN, P. G. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles used as drug carrier. **J. Chemistr.**, v. 44, n. 1, p. 105-109, 2006.
- LAMEIRO, M. H.; LOPES, A.; MARTINS, L. O.; ALVES, P. M. Incorporation of a model protein into chitosan–bile salt microparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 312, p. 119-130, 2006.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FAVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LAUS R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (iii) e manganês (ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.
- LEE, J.K.; LIM, H.S.; KIM, J.H. Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives. **Bioorg. Medicinal Chem. Lett.**, v.12, n.20, p. 2949-2951, 2002.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. **Pharm. Sci.**, v. 9, p. 411-418, 1999.
- LESTINI, B. J.; SAGNELLA, S. M.; XU, Z.; SHIVE, M. S.; RICHTER, N. J.; JAYASEHARAN, J.; CASE, A. J.; KOTTKE-MARCHANT, K.; ANDERSON, J. M.; MARCHANT, R. E. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery. **J. Control. Release**, v. 78, p. 235-247, 2002.

LUCCA, R. S.; HANSEN, D.; OLIVA, M. L. V. Estudos espectroscópicos de inibidores de serinoproteinases isolados de sementes de *Bauhinia bauhinioides*: estimativa de estrutura secundária e estudos de pH. **Varia Scientia**, v. 05, n. 10, p. 97-112, 2006.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.

MATHUR, N. K.; NARANG, K. C. Versatile polysaccharides from marine animals. **J. Chem. Educ.**, v. 67, p. 938, 1990.

McLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 219, p. 109-119, 1998.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; GUZMAN, M. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. **J. Microencapsulation**, v. 17, n. 5, p. 599-614, 2000.

MONTENEGRO, C. F.; SALLA-PONTES, C. L.; RIBEIRO, J. U.; MACHADO, A. Z.; RAMOS, R.F.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochemie**, In Press, p. 1-9, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 53, p. 131-140, 1997.

NATH, D.; SLOCOMBE, P.M.; STEPHENS, P. E.; WARN, A.; HUTCHINSON, G. R.; YAMADA, K. M.; DOCHERTY, A. J.; MURPHY, G. Interaction of metargidina (ADAM 15) with $\alpha\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins on different haemopoietic cells. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 579-587, 1999.

NIEWIAROWSKI, S.; McLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.**, v. 31, p. 289-300, 1994.

OLIVA, I. B.; COELHO, R. M.; BARCELLOS, G. G.; SALDANHA-GAMA, R.; WERMELINGER, L. S.; MARCINKIEWICZ, C.; BENEDETA ZINGALI, R.; BARJA-FIDALGO, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: Involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicon**, v. 50, p. 1053-1063, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, C. R. **Estudo dos efeitos biológicos de uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, DisBa-01, sobre a musculatura da parede abdominal após a indução de hérnia incisional em ratos**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; PENICHE, H.; ACOSTA, N. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. **Macromol. Biosci.**, v. 3, n. 10, p. 511-520, 2003.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, P. N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres development, stability evaluation and nanostructure models. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 16, p. 305-312, 2002.

PONTES, C. L. S. **Otimização da purificação e caracterização adicional de uma desintegrina- RGD recombinante de *Bothrops alternatus* e seu efeito em células endoteliais humanas (HUVEC)**. 2006. 121f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

RAMOS, O. H. P. **Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: Biologia molecular, estudos *in vitro*, *in vivo* e bioinformática estrutural**. 2005. 152f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

RAMOS, O. H.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; BECHYNE, I.; PONTES, C. L. S.; CHAREYRE, F. A novel alpha(v)beta(3)-blocking disintegrin containing RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, p. 53-64, 2008.

RIBEIRO, J. U. **Efeitos das desintegrinas alternagina-C e DisBa-01 de *Bothrops alternatus* em fibroblastos, células endoteliais e tumorais**. 2009. 177f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

RICHARDS, E. G. Polyelectrolytes. In: **An introduction to the physical properties of large molecules in solution**. New York: Cambridge University Press, 1980, p. 235.

REYNOLDS, A. R. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. *Dose-response*, v.8, p. 253-284, 2010.

ROBERTS, A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol.*, v.4, p.374-77, 1982.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: SOERENSEN, B. (Ed). **Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 138p.

SADEGHI, A. M. M.; DORKOOSH, F. A.; AVADI, M. R.; SAADAT, P.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H. E. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *Int. J. Pharm.*, v. 355, p. 299–306, 2008.

SAEZ, A.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003b.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; PONTES, C. L. S.; MONTENEGRO, C. F.; MARTIN, A. C. B. M. Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins*, v. 2, p. 2606-2621, 2010.

SHEU, J. R.; YEN, M. H.; PENG, H. C.; CHANG, M. C.; HUANG, T. F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, prevents platelet plug formation in *in vivo* experiments. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 294, n. 1, p. 231-238, 1995.

SINHA, V. R.; SINGLA, S. W.; WADHAWAN, R. K.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *Int. J. Pharm.*, v. 274, p. 1-33, 2004.

SILVA, C. F. **Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos**. 2006. 237f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1059-1063, 1998.

SOANE, R. J.; HINCHCLIFFE, M.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. **Int. J. Pharm.**, v. 217, p. 183-191, 2001.

SOUZA, D. H. F.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, V. R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 341-350, 2000.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, Y. S.; WOODY, R. W. Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra Based on the Tertiary Structure Classification. **Anal. Biochem.**, v. 299, p. 271-274, 2001.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Anal. Biochem.**, v. 287, p. 252-260, 2000.

STEVENSON, C. L.; BENNETT, D. B.; LEGHUGA-BALLESTEROS, D. Pharmaceutical Liquid Crystals: The relevance of Partially Ordered Systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 1861-1880, 2005.

STUPP, R.; GOLDBRUNNER, R.; NEYNS, B.; SCHLEGEL, U.; CLEMENT, P.; GRABENBAUER, G. G.; HEGI, M. E.; NIPPGEN, J.; PICARD, M.; WELLER, M. Phase I/IIa trial of cilengitide (EMD121974) and temozolomide with concomitant radiotherapy, followed by temozolomide and cilengitide maintenance therapy in patients (pts) with newly diagnosed glioblastoma (GBM). **J. Clin. Oncol.**, Annual Meeting Proceedings, v. 25, n. 18S, 2007.

TAGER, A. **Physical chemistry of polymers**. 2. ed. Moscou: Mir Publishers, 1978.

TAN, C. S.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713-719, 1998.

TARIN, D. Clinical and experimental studies on the biology of metastasis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 780, p. 227-235, 1985.

THIRAWONG, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SRIAMORNSAK, P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. **J. Pharm. Biopharm.**, v. 67, n. 1, p. 132-140, 2007.

TOBÍO, M.; GREF, R.; SÁNCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, A. J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. **Pharm. Res.**, v. 15, n. 2, p. 270-275, 1998.

TOBYN, M. J.; JOHNSON, J.R.; DETTMAR, P.W. Factors affecting *in vitro* gastric mucoadhesion: I. Test conditions and instrumental parameters. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 41, p. 235-241, 1995.

VANDENBERG, G. W.; DROLET, C.; SCOTT, S. L.; NOUE, J. D. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **J. Control. Release**, v. 77, p. 297-307, 2001.

VERENA, M. L.; DAVIDE, G.; KRAULAND, A. H.; BERNKOP-SCHNQRCH, A. Nasal delivery of human growth hormone: *in vitro* and *in vivo* evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system. **J. Control. Release**, v. 100, p. 87-95, 2004.

WARGAFTIG, T. N. **Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose**. 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2000.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J.N.; BACRI, J.C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v.24, n.6, p. 1001-1011, 2003.

WONG, C. F.; KAH, H. Y.; KOK, K. P. An *in-vitro* method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. **Int. J. Pharm.**, v. 180, p. 47-57, 1999.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet.**, v. 40, n. 2, p. 77-84, 2001.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammoniumglycyrrhizinate. **Int. J. Pharm.**, v. 295, n. 1-2, p. 235-245, 2005.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 250, p. 215-226, 2003.

YANG, R. S.; TANG, C. H.; CHUANG, W. J.; HUANG, T. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F.; FU, W. M. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v. 45, p. 661-669, 2005.

YOO, S. H.; OH, J. E.; LEE, K. H.; PARK, T. G. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. **Pharm. Res.**, v. 16, n. 7, p. 1114-1118, 1999.