

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

GABRIEL JOSÉ SILVEIRA LACERDA

**MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
COLÔNICA DE MESALAZINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA  
INTESTINAL**

ALFENAS/MG

2018

GABRIEL JOSÉ SILVEIRA LACERDA

**MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
COLÔNICA DE MESALAZINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA  
INTESTINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Co-orientadora: Dra. Liliane Neves Pedreiro

ALFENAS/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Alfenas

Lacerda, Gabriel José Silveira.

L131m Micropartículas de quitosana como sistema de liberação colônica de mesalazina no tratamento da doença inflamatória intestinal / Gabriel José Silveira Lacerda. – Alfenas/MG, 2018.

80 f.: il. –

Orientadora: Flávia Chiva Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Enteropatias Inflamatórias. 2. Mesalamina 3. Quitosana
- I. Carvalho, Flávia Chiva. II. Título.

CDD-615

**GABRIEL JOSÉ SILVEIRA LACERDA**

**“MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
COLÔNICA DE MESALAZINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA  
INFLAMATÓRIA INTESTINAL”**


A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 17 / 04 / 2018

Prof<sup>a</sup> Dra. Flávia Chiva Carvalho  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dra. Charlene Priscila Kill  
Instituição: UNESP

Assinatura: 

Prof<sup>a</sup> Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por me guiar nas horas de dúvida,

À minha família e amigos, pelo suporte e apoio,

Ao meu grande e querido parceiro e amigo Diego Morais, pela tolerância e generosidade para com os meus momentos de maior dificuldade,

Aos professores, por cada ensinamento transmitido,

À funcionária Fabiana, pela amizade e por todo o esclarecimento nos processos discentes,

Ao professor Mateus Leite, por ter aceitado compartilhar seu tempo e conhecimento excepcional em meu estágio docente,

À professora Gislaine Ribeiro Pereira, pela liberdade de acesso cedida para a realização das pesquisas no laboratório de sua responsabilidade e coordenação,

À minha co-orientadora Lilliane Pedreiro e aos demais amigos da Universidade Estadual Paulista, pelo incentivo e pela ajuda na realização de parte dos experimentos,

À minha orientadora, professora Flávia Chiva Carvalho, pelo carinho, pela paciência, pela força e pela fé que sempre depositou,

Às minhas grandes parceiras de bancada Valéria Leite e Beatriz Piantino, que sempre me ajudaram de peito aberto,

Às técnicas do laboratório de pesquisa em sistemas de liberação, Andréa Marques Roberto Passos e Neila Sena Ribeiro, com quem sempre pude contar nas horas de necessidade,

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e apoio financeiro concedido para a realização da pesquisa,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por ceder cada canto de suas salas de aula e laboratórios para meu desenvolvimento pessoal e profissional, e

À Universidade Federal de Alfenas por ter me proporcionado a sensação de estar em casa, além das inesquecíveis lições de aprendizado e lembranças únicas.

## RESUMO

A doença inflamatória intestinal consiste em um grupo de doenças crônicas e idiopáticas que afetam o trato gastrointestinal (TGI), no qual se incluem a colite ulcerativa e a Doença de Crohn. Sua primeira linha de tratamento inclui o uso de anti-inflamatórios, dos quais se destaca a mesalazina, tanto por via oral quanto retal. A grande limitação do tratamento é o sistema de liberação alcançar a região terminal do TGI sem promover a liberação anterior da mesalazina. Sua baixa solubilidade também é um fator limitante no delineamento de sistemas de liberação para ação local no cólon. Micropartículas podem permitir a vetorização da liberação na mucosa inflamada, pois podem ser capturadas por células do sistema imunológico e serem direcionadas ao local inflamado. Com o objetivo de obter um sistema de liberação colônica, foram desenvolvidas micropartículas de quitosana para incorporação de mesalazina por diferentes métodos e em diferentes condições. Foram empregadas três diferentes técnicas: a complexação polieletrólítica (PEC) com o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP), a reticulação química com o genipin e a emulsificação seguida por reticulação química com o genipin. As partículas foram analisadas quanto ao diâmetro médio, potencial zeta, difração de raios-X por pó e espectroscopia de infravermelho. Também foram analisados o perfil de liberação em meio gástrico e colônico simulados. A complexação polieletrólítica produziu nanopartículas não carregadas com características adequadas de tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta (491 nm, Pdl=0.26 e  $\zeta= 23.2$ ); contudo, não foi possível produzir partículas estáveis contendo o fármaco. As micropartículas produzidas por reticulação química sofreram degradação. Partículas de tamanho sub-mícron e micrométricas (2692 nm, Pdl=0.6 e  $\zeta= 46$ ) foram produzidas utilizando a técnica da emulsificação com posterior reticulação por genipin. Agitação branda à velocidade de 800 rpm pelo tempo de 3 horas produziu partículas de formato mais esférico e de tamanho superior às partículas produzidas por agitação vigorosa à velocidade de 8.000 rpm pelo tempo de 5 minutos. O rendimento constatado, em torno de 50%, foi considerado satisfatório, tendo em vista a impossibilidade de incorporação do fármaco na matriz polimérica a partir de outras técnicas. Por meio da difração de raios-X por pó foi possível constatar a natureza cristalina das amostras, enquanto a espectroscopia de infravermelho demonstrou a presença da interação covalente existente entre a quitosana e o genipin, dando indícios consistentes da reticulação entre o polímero e o agente reticulante. Foi obtido um perfil de liberação sigmoidal a, que apresentou um perfil de liberação mais lento em sua fase inicial, seguido por uma rápida liberação, que pode garantir que o fármaco tenha sua liberação direcionada ao cólon.

**Palavras-chave:** Doenças inflamatórias intestinais. Mesalazina. Micropartículas. Quitosana. Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose. Complexação polieletrólítica. Reticulação covalente.

## ABSTRACT

In IBD, gastrointestinal tract is partially or completely affected by two main conditions, Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, chronic and idiopathic diseases. First line treatment includes anti-inflammatory drugs as mesalazine by oral or rectal administration. Main treatment limitation is related to drug delivery system, since it should reach colonic tissue and afford an optimum level of mesalazine in that area of TGI, without contributing to previous drug delivery. Low drug solubility is also a complicating factor at local delivery in colon. Microparticles can allow drug delivery vectorization, because they can be captured by immune system cells and targeted to inflammation site. In this study, chitosan microparticles were produced using different methods and conditions. Three techniques were applied: polyelectrolyte complexation with hydroxypropylmethylcellulose phthalate; chemical crosslinking with genipin; and emulsification combined with chemical crosslinking with genipin. Samples with microparticles were analyzed for size, zeta potential, powder x-ray diffraction and infrared spectroscopy, and then, drug release profiles were analyzed at colonic and gastric pH. Nanoparticles without drug could be made using first method (491 nm, Pdl=0.26 and  $\zeta= 23.2$ ), but we could not produce stable particles with mesalazine. Microparticles produced by second method showed degradation. Sub-micron and microparticles could be produced by emulsification and chemical crosslinking with genipin method (2692 nm, Pdl=0.6 and  $\zeta= 46$ ). Mild agitation at 800 rpm for 3 hours has been produced bigger particles and with more spherical shape than using more strong agitation at 8,000 rpm for 5 minutes. Yield found was about 50%, and it was considered satisfactory, since faced difficulties to prepare a polymeric matrix containing the drug applying other techniques. Samples crystalline structure has been checked by powder ray-x diffraction, while covalent bound between chitosan and genipin could be showed by infrared spectroscopy. It was obtained a sigmoidal drug release profile from microparticles produced by third method, what it means that a slower drug delivery in the beginning, followed by a fast release, and it could represent a colon targeted release.

**Keywords:** Inflammatory bowel disease. Mesalazine. Microparticles. Chitosan. Hydroxypropylmethylcellulose phthalate. Polyelectrolytic crosslinking. Covalent crosslinking.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	–	ácido 5-aminossalicílico ou mesalazina
A/O	–	água em óleo
AIDS	–	síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C <sub>18</sub>	–	sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CCDC CODE	–	código relacionado ao cadastro de depósito de estruturas químicas no Cambridge Crystallographic Data Centre ou Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CHEM-MAG	–	Partículas produzidas sob técnica de reticulação química, a partir do emprego de agitação magnética
CHEM-UT	–	Partículas produzidas sob técnica de reticulação química, a partir do emprego de agitação por ultra-turrax
CU	–	colite ulcerativa
DC	–	doença de Crohn
DII	–	doenças inflamatórias intestinais
DMF	–	dimetilformamida
DMSO	–	dimetilsulfóxido
DS	–	sulfato de dextrano
EMUL-MAG	–	partículas produzidas sob técnica de emulsificação seguida de reticulação covalente, a partir do emprego de agitação magnética
EMUL-UT	–	partículas produzidas sob técnica de emulsificação seguida de reticulação covalente, a partir do emprego de agitação por ultra-turrax
FTIR-ATR	–	espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com dispositivo de refletância total atenuada
GNP	–	genipin
HPMCP	–	ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
HTCC	–	quitosana quartenizada
IV	–	infravermelho
LD	–	limite de detecção
LQ	–	limite de quantificação

MP	– micropartícula
mV	– milivolts
$\bar{\text{N}}\text{H}_2$	– grupamento químico amina
NP	– nanopartícula
$\bar{\text{O}}\text{H}$	– grupamento químico hidroxila
PdI	– índice de polidispersidade
PEC	– complexos polieletrólíticos
pH	– potencial hidrogeniônico
PLGA	– ácido láctico co-ácido glicólico
QS	– quitosana
RC	– reticulação covalente
RPE	– complexação polieletrólítica
rpm	– rotações por minuto
TGI	– trato gastrointestinal
v/v	– volume por volume

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estruturas químicas da (a) mesalazina (5-ASA), (b) quitosana, (c) genipin e (d) ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP).....	27
Figura 2	- Reação de formação da base de Schiff entre quitosana e genipin, formando composto identificado pela coloração azul .....	35
Figura 3	- Procedimento para preparo de amostras por emulsificação A/O e reticulação química. ....	44
Figura 4	- Solução de mesalazina preparada em diferentes condições .....	49
Figura 5	- Degradação oxidativa do 5-ASA. ....	50
Figura 6	- Formação das NPs de quitosana em tampão fosfato pH 5,5 .....	51
Figura 7	- Formação de NPs de quitosana em ácido clorídrico 0,1 M.....	52
Figura 8	- Suspensões de nanopartículas produzidas por reticulação polieletrólítica .....	53
Figura 9	- Curva de Calibração da análise de 5-ASA em pH = 5,5 por CLAE, em mistura de tampão fosfato e metanol, na proporção 90:10 .....	56
Figura 10	- Curva de Calibração da análise de 5-ASA em pH 6,6 por CLAE, em mistura de tampão fosfato e metanol, na proporção 90:10 .....	57
Figura 11	- Representação do processo de ionização do 5-ASA .....	59
Figura 12	- Imagem de microscopia ótica das partículas de quitosana produzidas por emulsificação água em óleo seguida por reticulação química da quitosana com genipin.....	60
Figura 13	- Difratoograma experimental gerado para as amostras Emul-Mag e Emul-UT não carregadas .....	62
Figura 14	- Difratoogramas experimentais das amostras carregadas e não carregadas Emul-Mag (a) e Emul-UT (b) comparados ao difratoograma calculado do fármaco 5-ASA livre .....	63
Figura 15	- Difratoogramas experimentais para Emul-Mag e Emul-UT carregadas com 5-ASA comparados com os difratoogramas experimental e calculado de 5-ASA livre, cloridrato de mesalazina e cloridrato monoidratado de mesalazina .....	65

Figura 16 - Esquema dos mecanismos propostos para a reticulação entre quitosana e genipin.....	66
Figura 17 - Espectros de IV da quitosana, Emul-UT e Emul-Mag.....	67
Figura 18 - Espectros de IV das amostras Emul-Mag e Emul-UT não carregadas e carregadas com 5-ASA.....	68
Figura 19 - Espectros FTIR das amostras Emul-Mag e Emul-UT, não carregadas e carregadas.....	69
Figura 20 - Perfil de liberação de micropartículas Emul-Mag, Emul-UT e 5-ASA livre: (a) fluido gástrico simulado; (b) fluido entérico simulado.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação para preparo das amostras de partículas em relação ao volume de quitosana e HPMCP a serem utilizados e sua razão polimérica em massa.....	41
Tabela 2 - Classificação visual em dispersões transparentes (DT), opalescentes (DO) ou agregados (A) das amostras de partículas produzidas .....	53
Tabela 3 - Concentração e proporção dos polímeros empregados, tamanho, PDI e potencial zeta das suspensões de nanopartículas sem fármaco .....	54
Tabela 4 - Dados de área do pico cromatográfico, desvio padrão e coeficiente de variação das amostras das soluções de trabalho em tampão fosfato quantificadas em CLAE no pH 5,5 .....	55
Tabela 5 - Dados de área do pico cromatográfico, desvio padrão e coeficiente de variação das amostras das soluções de trabalho preparadas em tampão fosfato quantificadas por CLAE no pH 6,6 .....	56
Tabela 6 - Ensaio de precisão intra-dia e inter-dia no pH 5,5 (n=3).....	57
Tabela 7 - Ensaio de precisão intra-dia e inter-dia no pH 6,6 (n=3) 57 .....	58
Tabela 8 - Dados de tamanho, Pdl, potencial zeta e rendimento para as partículas preparadas.....	61
Tabela 9 - Cálculos das intensidades relativas das bandas em torno de 2852, 2924 e 2932 $\text{cm}^{-1}$ das amostras Emul-UT e Emul-Mag não carregadas e carregadas com 5-ASA .....	70
Tabela 10 - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido dos modelos matemáticos de liberação de fármacos e o parâmetro de forma (b) calculado.....	72

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>O trato gastrointestinal: características e estrutura</b> .....	17
2.1.1	<i>Funções do trato gastrointestinal</i> .....	17
2.1.2	<i>Muco: suas características e importância</i> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Doenças inflamatórias intestinais</b> .....	18
2.2.1	<i>Epidemiologia das DII</i> .....	19
2.2.2	<i>Sinais e sintomas característicos</i> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Estratégias atuais de tratamento</b> .....	20
2.3.1	<i>Farmacologia da mesalazina</i> .....	21
2.3.2	<i>Desafios da terapêutica atualmente empregada</i> .....	22
<b>2.4</b>	<b>Desenvolvimento de novos sistemas de liberação</b> .....	23
2.4.1	<i>Vantagens sobre os tratamentos convencionais</i> .....	24
2.4.2	<i>Características dos novos sistemas de liberação de fármacos</i> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos</b> .....	26
2.5.1	<i>Quitosana</i> .....	27
2.5.2	<i>Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP)</i> .....	28
2.5.3	<i>Genipin</i> .....	28
<b>2.6</b>	<b>Técnicas de produção de sistemas micro e nanoparticulados</b> .....	29
2.6.1	<i>Spray-drying</i> .....	29
2.6.2	<i>Emulsificação</i> .....	30
2.6.3	<i>Coacervação/precipitação</i> .....	30
2.6.4	<i>Geleificação iônica ou ionotrópica</i> .....	31
2.6.5	<i>Reticulação covalente ou reticulação química</i> .....	31
<b>2.7</b>	<b>Micro e nanopartículas baseadas em polissacarídeos</b> .....	31
<b>2.8</b>	<b>Nanopartículas obtidas por complexação polieletrólítica</b> .....	32
<b>2.9</b>	<b>Nanopartículas obtidas por reticulação covalente</b> .....	34
<b>2.10</b>	<b>Nanopartículas contendo mesalazina</b> .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	38

<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais e equipamentos</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Etapas de pré-formulação para reação de complexação polieletrólítica</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Método da complexação polieletrólítica</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Método de reticulação química da quitosana com genipin</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Método de emulsificação água/óleo pela reticulação da quitosana com genipin</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Caracterização das partículas obtidas</b> .....	<b>44</b>
4.6.1	<i>Determinação de tamanho, Pdl e análise de potencial zeta</i> .....	44
4.6.2	<i>Morfologia das partículas</i> .....	45
4.6.3	<i>Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier</i> .....	45
4.6.4	<i>Análise de difração de raios-X por pó</i> .....	45
4.6.5	<i>Análise do rendimento de partículas</i> .....	46
<b>4.7</b>	<b>Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-ASA nas partículas</b> .....	<b>46</b>
<b>4.8</b>	<b>Estudos de liberação <i>in vitro</i> do 5-ASA</b> .....	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção das micropartículas de quitosana</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Metodologia analítica para análise de 5-ASA por CLAE</b> .....	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise de eficiência de incorporação das NPs produzidas por complexação polieletrólítica</b> .....	<b>58</b>
<b>5.4</b>	<b>Método da reticulação química da quitosana com genipin</b> .....	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Método da emulsificação A/O seguida por reticulação da quitosana com genipin</b> .....	<b>60</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise de rendimento das partículas</b> .....	<b>61</b>
<b>5.7</b>	<b>Difração de raios-X por pó (DRXP)</b> .....	<b>62</b>
<b>5.8</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier</b> .....	<b>65</b>
<b>5.9</b>	<b>Liberação <i>in vitro</i> do fármaco</b> .....	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doença inflamatória intestinal (DII) é um termo generalizado para um grupo de doenças crônicas que afetam o sistema gastrointestinal, na qual se incluem a colite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn (DC) (HUA et al., 2015).

A mesalazina, também denominada ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), tem sido utilizada para tratamento da DII por mais de 70 anos com eficácia comprovada. Estimou-se que o valor total de mercado esperado alcance a marca dos 6,2 bilhões de dólares em 2017, o que enfatiza a importância da pesquisa nesse setor (TALAEI et al., 2013). O princípio geral da farmacoterapia nas doenças inflamatórias intestinais tem o objetivo de induzir à atenuação dos eventos clínicos e à prevenção de novos episódios (PERTUIT et al., 2007).

O tratamento da CU e da DC depende de fatores como a severidade e subtipo da doença, bem como das doenças pré-existentes e da tolerância do paciente à farmacoterapia (LAUTENSCHLÄGER et al., 2014), sendo as classes de fármacos mais comuns utilizadas os agentes anti-inflamatórios como a mesalazina, empregada principalmente em quadros leves a moderados, e os agentes corticosteroides e imunossupressores, mais efetivos no tratamento das formas mais severas da DII. A classificação das DII em estágio suave, moderado ou severo, baseia-se nos parâmetros pré-clínicos e clínicos, além dos sintomas constatados (TALAEI et al., 2013).

A eficácia de muitos fármacos geralmente é limitada pela baixa solubilidade, baixa estabilidade, necessidade de maior potência, e em muitos casos, somente uma fração da dose administrada realmente alcança o sítio de ação, enquanto a maioria do fármaco se difunde pelo organismo (MOURA; MARTINS; DUARTE, 2015). O principal obstáculo enfrentado pelo tratamento com mesalazina nas formas farmacêuticas convencionais está em alcançar os níveis locais do fármaco na mucosa inflamada, além de não ser possível a redução da administração das doses diárias e o uso de formas farmacêuticas menos aceitáveis pelos pacientes, como os enemas, o que pode resultar em hospitalizações e falha na adesão ao tratamento (VISCIDO et al., 2014).

Quando administrado por via oral, o 5-ASA, que é rapidamente e completamente absorvido pela porção superior do intestino, dificilmente alcança e permanece no tecido do cólon. Além disso, dependendo da concentração e pH local

na porção proximal do intestino, o 5-ASA sofre absorção sistêmica rápida e praticamente completa, seguida de um extenso metabolismo. Sendo assim, é de extrema importância promover a liberação local do fármaco para um maior sucesso terapêutico, com menos efeitos adversos e menor perda do fármaco (PERTUIT et al., 2007).

Neste sentido, os sistemas de liberação gastrorresistentes podem retardar a liberação precoce do fármaco e permitir sua liberação entérica ou colônica. Especificamente no tratamento de doenças que afetam o cólon, como as DII. O alcance do fármaco enfrenta várias barreiras, além da absorção precoce nas porções anteriores do TGI, como a espessa e abundante camada de muco presente nesta via, que pode impedir a penetração do ativo, além do mesmo poder ser eliminado pelos movimentos peristálticos, juntamente com o bolo alimentar (DATE; HANES; ENSIGN, 2016).

Sistemas micro e nanoparticulados podem ser projetados para além de alcançarem o cólon, com emprego de polímeros gastrorresistentes, romperem esta barreira de muco e permanecer por mais tempo na via, a fim de alcançar o epitélio e as células da mucosa inflamada. Devido ao seu tamanho reduzido, as micro e nanopartículas, por difusão passiva, podem alcançar as camadas mais internas e fortemente aderidas do muco, não sendo eliminadas juntamente com os movimentos peristálticos (LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2001; MOULARI et al., 2008).

Além disso, partículas de tamanho mais reduzido (< 300 nm) podem ter sua captura favorecida por células do sistema imunológico, células que estão altamente proliferadas na mucosa colônica inflamada, sendo uma estratégia de direcionamento da liberação do fármaco no local de ação (LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2001; MOULARI et al., 2008).

O emprego de polímeros hidrofílicos, especialmente com carga positiva, podem favorecer a penetração de micro e nanopartículas hidrofílicas e sua interação com as glicoproteínas do muco, as quais são negativamente carregadas, aumentando sua retenção, fenômeno conhecido como mucoadesão (CARVALHO et al., 2012; ENSIGN; CONE; HANES, 2012).

Desta maneira, micro e nanopartículas podem ser promissores sistemas de liberação colônica de fármacos, devido à liberação controlada de fármacos no TGI, capacidade de direcionamento, mucoadesão e conseqüente aumento da sua biodisponibilidade (DUDHANI; KOSARAJU, 2010). Todas estas propriedades podem

contribuir para a redução das doses administradas, além da diminuição da toxicidade e ocorrência de efeitos adversos.

Dentre os materiais gastrorresistentes, muitos polissacarídeos naturais que sofrem hidrólise das ligações glicosídicas no cólon, como a quitosana, a pectina, a goma guar, as dextranas e outras, constituem um recurso promissor na liberação colônica (MURA et al., 2012). A quitosana é um polissacarídeo com características catiônicas, obtido a partir da desacetilação da quitina (KOUCHAK, 2015). Tem recebido cada vez mais atenção no tratamento direcionado ao cólon, devido à sua biodegradabilidade pela flora bacteriana intestinal, além da bem documentada biocompatibilidade, baixa toxicidade e propriedades mucoadesivas (AGUZZI et al., 2011; KUMAR et al., 2004), com sua solubilidade variando de acordo com as condições de pH do meio (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004). A propriedade mucoadesiva da quitosana é devido à presença de cargas elétricas positivas que interagem com a mucina, principal proteína que compõe o muco, que possui carga negativa.

Moléculas pequenas, proteínas e peptídeos podem ser encapsulados e protegidos do hostil ambiente gástrico por nanopartículas compostas por polímeros gastrorresistentes. Inclusive, o uso de certos polímeros como o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) pode oferecer, além da proteção gástrica, possibilidade de redução da liberação prematura de fármaco (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012). Assim como os metacrilatos, o HPMCP é um polímero pH dependente, e sua dissolução depende do pH do meio (NIDHI et al., 2016).

Outra estratégia para prolongar a liberação no TGI são as micro e nanopartículas baseadas em polissacarídeos obtidas por reticulação covalente da quitosana com agentes reticulantes como o glutaraldeído ou genipin (KUMAR; SU; VELUSAMY, 2016; MUZZARELLI et al., 2016), que podem retardar a desintegração prematura em ambientes ácidos, como o estômago.

Neste estudo, o objetivo consiste em avaliar e comparar diferentes técnicas de baixo custo para a produção de partículas micrométricas carregadas com 5-ASA, considerando a limitada solubilidade do fármaco tanto em solventes aquosos como orgânicos, que limitam o uso de muitos processos físicos que necessitam solubilização do fármaco antes da produção da partícula.

Foram testadas três técnicas empregando a quitosana como biopolímero: complexação polieletrólítica da quitosana com o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

(HPMCP), a reticulação química da quitosana com o genipin e um método no qual são associadas as técnicas de emulsificação água em óleo (A/O) e a reticulação química entre a quitosana e o genipin. Foram realizadas as caracterizações físico-químicas dos sistemas e o perfil de liberação do fármaco variando o pH.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O trato gastrointestinal: características e estrutura

O trato gastrointestinal é um tubo viscoso, com cerca de 5 a 10 metros de comprimento, com característica viscosa (URBANSKA et al., 2016), que se dispõe sequencialmente em boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus (COSTANZO, 2007).

Sua estrutura apresenta duas superfícies: mucosa e serosa, na qual a mucosa está direcionada para o lúmen, enquanto a serosa está voltada para o sangue. A mucosa consiste de uma camada de células epiteliais, na qual ocorre o processo de secreção e absorção, além de um misto de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e linfáticos, denominado lâmina própria e em uma camada muscular, promotora do peristaltismo, sendo que abaixo da mucosa encontra-se a camada submucosa (COSTANZO, 2007).

O TGI apresenta ambientes bastante variáveis e dinâmicos. O trânsito intestinal varia tanto em indivíduos saudáveis quanto naqueles que sofrem de DII. Além do trânsito intestinal, fatores como os gradientes de pH, as diversas enzimas digestivas e a flora bacteriana são verdadeiros desafios no que se refere a fármacos administrados por via oral (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017).

Na doença inflamatória intestinal, a fisiologia do TGI é afetada e pode estar alterada. Em condições normais, o pH do TGI varia de 1 a 2,5 na região estomacal, rapidamente se elevando de 5 para 7 no duodeno e gradualmente aumenta para 7 a 8 no íleo terminal, reduzindo próximo a 7 na região do colón até o reto. Estudos têm demonstrado que o pH colônico em pacientes com DII pode ser significativamente mais ácido (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017)

#### 2.1.1 Funções do trato gastrointestinal

Apesar da principal função fisiológica do TGI ser a digestão e absorção dos alimentos e seus constituintes, o TGI também representa uma barreira eficiente contra agentes externos, como peptídeos, vírus e bactérias (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016; URBANSKA et al., 2016).

Em toda sua extensão, existem diversas barreiras como as vilosidades e microvilosidades do tecido intestinal, a barreira de muco, as junções que bloqueiam a passagem entre as células, as próprias células do TGI e o tecido subepitelial (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016). Dessa forma, a estrutura do tecido intestinal afeta a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral (URBANSKA et al., 2016), tanto em forma de solução quanto em formulações contendo partículas (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

### *2.1.2 Muco: suas características e importância*

O muco é composto basicamente por 90 a 98% de água (FANG et al., 2017). Em sua estrutura há grande quantidade de glicoproteínas, em sua maioria pertencente à família mucina (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016) excretadas pelas células caliciformes e submucosas. Devido a sua composição, o muco representa um obstáculo altamente viscoso, com características elásticas e adesivas (FANG et al., 2017).

Dessa forma, a primeira barreira física à absorção no TGI é a barreira de muco, que pode ter sua espessura variando de 10 a 200  $\mu\text{m}$  e divide-se estruturalmente em duas camadas distintas, sendo a mais externa a camada mais frouxa, e a mais interna e fina, a camada mais fortemente aderente (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

Além da mucina e da água presentes em sua composição, é possível encontrar bactérias, sais minerais, proteínas, lipídeos, macromoléculas e restos celulares, que favorecem a conexão e colaboram para a organização de um ambiente microscopicamente heterogêneo para a liberação de partículas (FANG et al., 2017).

O papel da camada de muco é lubrificar a passagem do quimo para proteger o epitélio dos danos mecânicos e da ligação de patógenos, bem como dificultar a sua chegada as células epiteliais (LUNDQUIST, 2016), o que ocorre por interações hidrofóbicas, eletrostáticas e impedimento estérico, além de ligações de hidrogênio (FANG et al., 2017).

## **2.2 Doenças inflamatórias intestinais**

As DII são consideradas doenças do século XXI (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016). Compreendem doenças inflamatórias recidivantes (COCO et al., 2013; HELMY et al., 2017) de característica crônica e idiopática, que podem afetar o TGI em qualquer região da sua extensão (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017), sendo os intestinos delgado e grosso, além do cólon, as principais regiões envolvidas (NIDHI et al., 2016).

Duas formas clinicamente definidas e mais comuns caracterizam as DII: a Colite Ulcerativa e a Doença de Crohn (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016; COCO et al., 2013; HELMY et al., 2017; NIDHI et al., 2016; ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017). Ambas as formas da DII são condições de sério comprometimento na qualidade de vida do paciente e que geralmente requerem atenção médica em longo prazo (FRICIU et al., 2013). Inclusive, as DII estão associadas ao risco elevado de câncer colo retal (ZHANG, 2017).

Apesar da natureza desconhecida da etiologia da doença, existe evidência experimental que a flora bacteriana residente no lúmen intestinal contribui para o início e progressão da doença por criar um desequilíbrio entre patógenos e probióticos, em razão da diminuição natural da flora bacteriana residente com o avanço da idade (URBANSKA et al., 2016). Contudo, a genética individual, a hereditariedade, o estresse e as influências imunológicas parecem desempenhar papel importante (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016), além de fatores relacionados ao microambiente intestinal como interações entre o epitélio e células imunes, infecções bacterianas e as funções de barreiras epiteliais e de fatores epidemiológicos como dieta, o hábito de fumar, a ingestão de drogas, o status hormonal, variações no clima e as circunstâncias de contato social, no desenvolvimento das DII (NIDHI et al., 2016).

### *2.2.1 Epidemiologia das DII*

As DII afetam milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que mais de 1 milhão de pessoas somente nos Estados Unidos, das quais 100 mil são crianças (NIDHI et al., 2016), e seu custo anual estimado ultrapassa os 6 bilhões de dólares (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017).

Estima-se que cerca de 3,5 milhões de americanos busquem tratamento relacionado às DII anualmente, havendo de 15 a 30 mil casos sendo diagnosticados ao ano (URBANSKA et al., 2016).

Na Europa ocidental, Ásia e na América do Norte, a colite ulcerativa tem incidência anual de aproximadamente 24,3 a cada 100 mil pessoas ao ano, 6,3 a cada 100 mil pessoas ao ano, 19,2 a cada 100 mil pessoas ao ano, respectivamente, sendo mais incidente que a Doença de Crohn, cuja incidência aproximada é de 12,7 a cada 100 mil pessoas na Europa, 5 a cada 100 mil na Ásia, e 20,2 a cada 100 mil na América do Norte (NIDHI et al., 2016), mas a incidência das DII parece ter aumentado rapidamente nas últimas décadas na Ásia (DUAN et al., 2016).

### *2.2.2 Sinais e sintomas característicos*

Cerca de 30 a 40% dos pacientes tem envolvimento colônico significativo (FRIEND, 2005). Sintomas clínicos como diarreia, fezes sanguinolentas, dor abdominal, cólicas, febre, fadiga, e perda de peso são comuns a ambas as enfermidades (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

Enquanto condições consideradas distintas, a CU e a DC compartilham além de muitas das características clínicas, o fato de ambas serem caracterizadas por ciclos de inflamação recorrente. Os quadros de inflamação e ulceração surgem em decorrência da infiltração de mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016).

Para a CU, a inflamação está confinada no cólon, estendendo-se de modo contínuo a partir da região do reto, o que pode, em alguns casos, envolver o cólon em toda a sua extensão, quadro denominado pancolite. Já na DC, a inflamação, geralmente descontínua, pode afetar qualquer região do TGI, com o íleo terminal e o cólon comumente afetados (HUA et al., 2015).

Além disso, sintomas severos que podem ocorrer incluem perda de peso, taquicardia, anemia, sangramento retal e distensão abdominal (NIDHI et al., 2016).

## **2.3 Estratégias atuais de tratamento**

O tratamento é sintomático e tem como alvo o controle e prevenção de recidivas dos processos inflamatórios, podendo ser utilizadas abordagens terapêuticas de uso oral ou retal, como os enemas e supositórios (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016). No tratamento usual é empregado o ácido 5-aminossalicílico, mas em caso de inflamação severa são empregados corticosteroides como a prednisona, metilprednisona e hidrocortisona, e em quadros de resistência ao tratamento padrão são geralmente empregados imunossupressores como o azatioprina, o 6-mercaptopurina e o metotrexato, além de agentes biológicos, dos quais podem ser citados o infliximabe, o adalimumabe e o certolizumabe (ALI; HANAFY; EL ACHY, 2016; URBANSKA et al., 2016).

Com o objetivo clínico de maximizar a liberação do fármaco na mucosa entérica afetada, o fármaco pode ser administrado diretamente no reto ou cólon distal por meio do uso de espumas, enemas e supositórios, bem como através de administração oral a partir dos mais variados diferentes sistemas capazes de garantir a liberação entérica do fármaco. De fato, quando administrado na forma livre, o 5-ASA é absorvido no intestino delgado proximal tornando-se, por fim, não efetivo. Para obter melhores resultados terapêuticos, contudo, não é importante o aumento da dose por via oral, mas certificar-se da disponibilidade local do fármaco na mucosa inflamada. Inclusive, já foi demonstrado que aumentar as doses orais de mesalazina não resultou em maiores índices de remissão na colite ulcerativa (CAPRILLI et al., 2009).

Dentre as formulações atuais empregados no tratamento das DII, o mecanismo de liberação do fármaco é variado, podendo ser dependente de redução enzimática, pH responsivo, tempo dependente ou até mesmo da combinação de dois mecanismos distintos (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017).

Assim sendo, as formulações disponíveis no mercado são baseadas em compostos associados ao 5-ASA por ligação diazo, quebradas somente por bactérias colônicas (Olsalazina e Balsalazida), e sistemas de liberação controlada como o Asacol com formulação revestida com Eudragit S, um polímero gastrorresistente, e o Pentasa, baseado em microesferas de etilcelulose que prolongam a liberação do fármaco até chegar ao cólon (CAPRILLI et al., 2009).

### *2.3.1 Farmacologia da mesalazina*

A mesalazina é a fração ativa da molécula da sulfassalazina (P.R. Vademécum de medicamentos, 2015). A mesalazina é um fármaco sólido, apresentado na forma de pó de coloração rosa acastanhada, sem odor, cujo pH situa-se entre 3,5 e 4,5. O ponto de fusão é de 260 a 280°C. É solúvel em ácido clorídrico e hidróxidos alcalinos diluídos, mas pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em metanol, álcool desidratado e acetona e praticamente insolúvel em álcool n-butílico, clorofórmio, éter, acetato de etila, cloreto de metileno, n-hexano e álcool n-propílico. Possui coeficiente de partição n-octanol/água: -0,16 (VALDEQUÍMICA PRODUTOS QUÍMICOS LTDA, 2015).

Muitos parecem ser os mecanismos de ação do 5-ASA e ainda permanecem não completamente esclarecidos. O fármaco possui um potente efeito inibitório sobre os mediadores pró-inflamatórios liberados na mucosa gastrointestinal (CAPRILLI et al., 2009). Parece ajudar na redução de leucotrienos e na inibição da liberação de IL-1 e IL-2, além de atuar na atividade de transcrição do NF-κB (NIDHI et al., 2016). A ação da mesalazina parece ser predominantemente local na região da inflamação. O efeito anti-inflamatório do 5-ASA foi fortemente correlacionado à sua concentração local na mucosa (CAPRILLI et al., 2009).

O fármaco pode ser administrado por via oral ou retal, sendo que dessa forma, há recomendação de retenção do supositório por 1 a 3 horas, e do enema por 8 horas, para maximização do efeito terapêutico. Cerca de 30% do fármaco administrado é absorvido após administração oral, e sua absorção não é afetada pela presença de alimentos. A absorção por via retal é variável e dependente do pH retal, podendo variar entre os 10 e 20%. O fármaco liga-se altamente às proteínas plasmáticas (cerca de 80%) e sua metabolização ocorre pelas vias do trato gastrointestinal e hepática, dando origem ao metabólito acetil-5-salicílico. Seu metabólito tem tempo de meia-vida de 5 a 10 horas, sofrendo excreção por via renal (SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013).

Contudo, efeitos adversos comuns incluem cefaleia, dor abdominal, diarreia, eructação, faringite, dor torácica, edema periférico, febre, calafrios, mal-estar, fraqueza, prurido, acne, dispepsia, flatulência, náuseas, vômitos, mialgias, artralgias, entre outros (SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013).

### *2.3.2 Desafios da terapêutica atualmente empregada*

Dentre as maiores limitações do tratamento atual está a grande dificuldade de alcance e manutenção dos níveis de concentração adequados do 5-ASA no intestino. Quando administrado por via oral, parte do 5-ASA administrado é absorvido no intestino delgado, o que resulta em uma redução do efeito terapêutico na região colônica (XU et al., 2017).

Inclusive, com os severos episódios de diarreia tornam ainda mais difícil alcançar níveis suficientemente altos da concentração de fármaco por um período suficientemente longo, particularmente no cólon ascendente, onde o volume de fluidos é maior, e a elaboração de um sistema mucoadesivo pode ser uma estratégia efetiva. Contudo, a liberação e adesão na mucosa colônica ainda representa grande desafio (PREISIG et al., 2016).

Além disso, o pH no trato gastrintestinal é um fator crítico. No lúmen, o pH local pode afetar diretamente os sistemas de liberação, bem como aqueles submetidos a revestimento entérico, e indiretamente pela atividade enzimática local alterada, o que torna consideravelmente importante compreender as variações de gradiente na saúde e na doença. Na maioria dos pacientes, o pH do cólon varia de 5,0 a 7,0, podendo alcançar até níveis extremamente ácidos (FRIEND, 2005). De modo complementar, o trânsito intestinal, a microflora e as enzimas locais, também impactam a liberação de fármacos.

## **2.4 Desenvolvimento de novos sistemas de liberação**

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação para o tratamento das DII tem se demonstrado bastante atraente, em vista da sua capacidade de direcionamento do fármaco especificamente para o local da inflamação, ao contrário dos sistemas convencionais de liberação, no qual todo o cólon recebe parte do fármaco administrado. O grande objetivo consiste em induzir e manter por longos períodos a fase de remissão dos sintomas (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017).

Sendo o principal desafio atual a promoção de uma liberação especificamente na região colônica, várias estratégias têm sido empregadas, dentre elas, o uso de revestimentos gastrorresistentes, o uso de pró-fármacos, o desenvolvimento de sistemas pH dependentes, sistemas tempo-dependentes e ativados pela microflora, sistemas multiparticulados e sistemas micro e nanoparticulados (BAUTZOVÁ et al., 2012; DUAN et al., 2016).

Em particular, os sistemas micro e nanoparticulados parecem ser a melhor estratégia, por facilitarem a interpenetração das partículas no tecido alvo. Partículas em escala micrométrica tendem a permanecer por menor tempo no sítio de ação, o que pode ser melhorado pelo uso de polímeros com propriedades bioadesivas ou mucoadesivas (DUAN et al., 2016), favorecendo o acúmulo e a permanência dessas partículas na mucosa inflamada.

O muco é um hidrogel complexo composto por proteínas, carboidratos, lipídeos, sais, anticorpos, bactérias e detritos celulares, cuja principal proteína presente é a mucina, que pode ser secretada ou não. A mucosa gástrica sustenta um gradiente que vai de pH 1-2 a pH 7,0 (ENSIGN; CONE; HANES, 2012). As nanopartículas se ligam ao muco via interações hidrofóbicas. Grupos carregados de proteínas de mucina também podem interagir com partículas carregadas e imobilizá-las no muco. A densidade de carga no muco dependerá da força iônica local e do pH, além de serem influenciadas pela presença de quimo (LUNDQUIST, 2016.)

A mucoadesão tem sido comumente aplicada na tentativa de melhorar o tempo de permanência das partículas no TGI (ENSIGN; CONE; HANES, 2012). É uma condição na qual ocorre uma maior atração entre o sistema de liberação de fármaco e as glicoproteínas da mucina, presentes no muco. Polímeros catiônicos como a quitosana interagem com a superfície eletronegativamente carregada do muco e formando fortes ligações eletrostáticas (LAUTENSCHLÄGER et al., 2014).

A mucoadesão apresenta inúmeras vantagens, como por exemplo, o tempo de permanência prolongado da formulação, o que resulta na potencialização do efeito terapêutico do fármaco. Também pode contribuir para uma melhora da disponibilidade do fármaco, por evitar o metabolismo de primeira passagem, atuando na proteção do fármaco frente à degradação devido ao trato gastrintestinal, favorecendo a adesão do paciente, pela facilidade de administração do fármaco e início de ação mais rápido devido à fixação e infiltração na superfície mucosa (MANSURI et al., 2016).

#### *2.4.1 Vantagens sobre os tratamentos convencionais*

Os sistemas micro e nanoparticulados podem transitar diretamente pelo tecido do TGI, bem como aderir à mucosa, pré-requisito para o processo de translocação das partículas (DUDHANI; KOSARAJU, 2010). Estudos demonstram

que um menor diâmetro médio permite com que atravessem mais facilmente a camada fortemente aderida de muco, em comparação a partículas maiores. Sistemas convencionais se aderem mais à camada frouxa de muco, e assim, acabam sendo eliminadas pela ação dos movimentos peristálticos. Micropartículas menores e nanopartículas conseguem, por difusão passiva, alcançar a camada fortemente aderida de muco, entrando em contato com o epitélio onde o fármaco deve ser liberado e exercendo sua função (ENSIGN; CONE; HANES, 2012).

Outra estratégia terapêutica explorada no desenvolvimento de micro e nanopartículas é baseada na resposta de células imunológicas que ocorre em tecidos inflamados, em geral, um aumento de neutrófilos, células natural killer, mastócitos e células T. Além disso, hipoteticamente, a recaptção da partícula para o interior dessas células imunológicas ou sua passagem pela barreira intestinal nas regiões ulceradas poderiam permitir um acúmulo seletivo dos sistemas carreadores vesiculares ou particulados à área desejada (MEISSNER; LAMPRECHT, 2008).

A liberação direcionada pode oferecer uma abordagem eficaz e segura de tratamento, por prover altos níveis de fármaco no local da doença, devido ao prolongamento das atividades farmacológicas e da maximização da eficácia. Além disso, o direcionamento da liberação de fármacos pode evitar ou reduzir a degradação do fármaco e a perda de eficácia por não alcançar o local afetado. Por outro lado, a liberação direcionada poderia reduzir a frequência das doses e minimizar os efeitos colaterais (NIDHI et al., 2016; PREISIG et al., 2016; ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017), contribuindo para a adesão ao tratamento e para a ampliação da qualidade de vida do paciente (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Compostos contendo ligações diazo, como a sulfassalazina, o pró-fármaco da mesalazina, são frequentemente associados a diarreia e o problema dos sistemas de liberação são ainda as doses frequentes que requer a ingestão diária de vários comprimidos, o que reduz a adesão do paciente à terapia. Além disso, o custo destes produtos de formulação oral convencional são extremamente elevados (CAPRILLI et al., 2009).

#### *2.4.2 Características dos novos sistemas de liberação de fármacos*

Os sistemas micro e nanoparticulados são preparados a partir do emprego de constituintes biocompatíveis, que demonstram alta seletividade sobre os tecidos com células doentes (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

A partir do uso de sistemas micro e nanoparticulados, fármacos com baixa biodisponibilidade ou com efeitos nocivos podem ser distribuídos de forma eficiente e segura, podendo ser muito promissores na liberação oral de fármacos pouco solúveis em água (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

O tamanho, formato e características químicas da superfície das partículas contribuem para a interação entre as partículas e o sistema fagocitário mononuclear, incluindo a internalização e biodistribuição das partículas (ZHANG; LANGER; TRAVERSO, 2017).

Além disso, sua estrutura pode garantir proteção ao fármaco, além de modular a liberação permitindo um perfil sustentado ou prolongado. Os sistemas de liberação que empregam nanocarreadores tem, devido ao seu tamanho reduzido, área de contato suficientemente grande para interação com as superfícies epiteliais (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

## **2.5 Polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos**

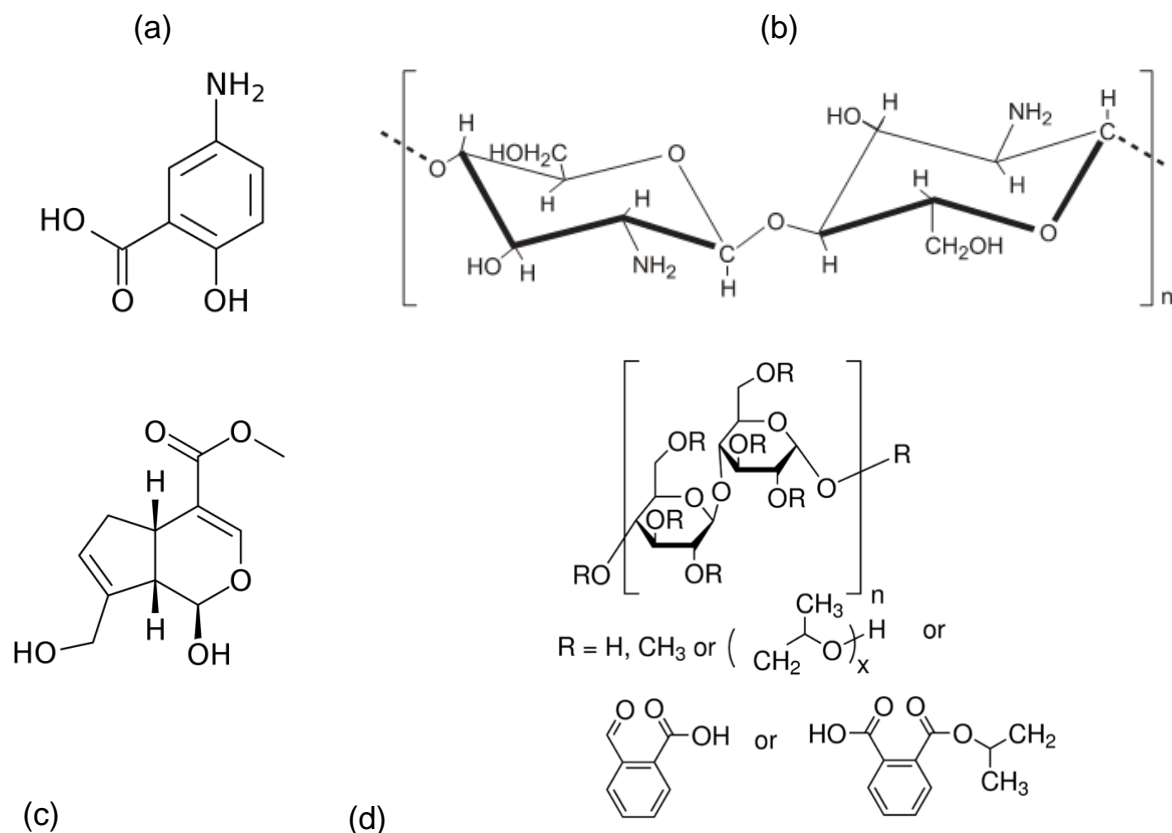
Muitos sistemas aumentam a possibilidade de penetração mais profunda dos fármacos nos tecidos através de finos capilares e ter alta eficácia (MALVIYA et al., 2018). Podem ser empregados polímeros naturais e sintéticos para o desenvolvimento de micro e nanopartículas poliméricas.. Dentre os polímeros mais frequentemente aplicados em formulações podemos citar o alginato de sódio, a albumina, a quitosana e a gelatina (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

Inclusive, podemos citar o sulfato de condroitina, a amilopectina, a heparina, o ácido hialurônico e o alginato (MALVIYA et al., 2018)

Além dos polímeros naturais, inúmeros polímeros de origem sintética podem ser usados com segurança. Policianoacrilatos, policaprolactona, ácido poliglutâmico, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol e ácido poliacrílico são alguns exemplos.

Abaixo, a Figura 1 destaca as fórmulas estruturais do fármaco e polímeros empregados neste trabalho.

Figura 1 - Estruturas químicas da (a) mesalazina (5-ASA), (b) quitosana, (c) genipin e (d) ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP)



Fonte: Sigma-Aldrich, 2018.

### 2.5.1 Quitosana

A quitosana é um polímero natural biodegradável, obtido principalmente da desacetilação alcalina da quitina, o segundo mais abundante polissacarídeo depois da celulose, encontrado principalmente em carapaças e exoesqueletos de crustáceos, e possui grande potencial para as aplicações farmacêuticas (GAUDIO et al., 2017; GONSALVES et al., 2011; TU et al., 2016).

A quitosana é um pó de coloração branca a levemente amarelado, com grau de desacetilação variando entre 40 a 98%. Tem peso molecular situado entre 50KDa e 2000KDa, sua viscosidade está entre 20 a 300cP (FONSÊCA, 2015).

É insolúvel em pH alcalino e valores de pH neutros, mas em ambientes ácidos, uma vez que seu pKa situa-se em 6,3, os grupamentos amino são protonados e sua solubilidade é melhorada (RASSU et al., 2016). Ácidos acético, láctico e fórmico diluídos são capazes de solubilizar o polímero (AHMAD et al., 2017),

mas dispersões de quitosana também podem ser preparadas por dissolução em ácidos inorgânicos diluídos, como os ácidos clorídrico, nítrico, fosfórico e perclórico (GONSALVES et al., 2011).

Dentre as suas bem documentadas propriedades encontram-se a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade, incluindo-se a atividade antiviral, antimicrobiana, anticâncer e anti-inflamatória (AHMAD et al., 2017; TU et al., 2016), além de possuir baixo custo de produção e a capacidade de melhorar o transporte paracelular e transcelular no epitélio da mucosa (URBANSKA et al., 2016).

A quitosana pode ser obtida com diferentes massas moleculares, graus de desacetilação e viscosidades. Algumas características como solubilidade, mucoadesão e penetração celular podem ser melhoradas com o uso de um sal derivado de quitosana (RASSU et al., 2016). A cristalinidade e a massa molecular exercem efeito sobre as propriedades mecânicas da estrutura da quitosana (AHMAD et al., 2017).

Contudo, a quitosana é um polímero instável em ambiente aquoso, limitação que pode prejudicar sua eficácia. Nesse contexto, a reticulação pode representar uma solução (GAUDIO et al., 2017).

### *2.5.2 Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP)*

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose é um agente de revestimento entérico utilizado na proteção de fármacos à degradação pelo ácido gástrico. O HPCMP é o meio éster ftálico da hidroxipropilmetilcelulose. A faixa de pH limite para a sua rápida desintegração pode ser controlada pela variação de seu conteúdo ftálico. Tem densidade aparente de 0,20-0,40g/cm<sup>3</sup>. Seu peso molecular médio varia de acordo com seu tipo, sendo que o grau 55 possui entre 27 e 35% de grupos ftálicos, viscosidade entre 32-48cst e pH 5,5 em solução tampão de McIlvaine.

É solúvel em cloreto de metileno, metanol e isopropanol, parcialmente solúvel em acetona e dioxano, assim como em misturas (p/p) acetona-água (95:5), acetona-etanol (1:1), cloreto de metileno-etanol (1:1) e etanol-água (8:2), sendo insolúvel em éter e etanol desidratado (SHIN-ETSU, 2002).

### *2.5.3 Genipin*

O genipin é um produto da hidrólise do genoposídeo. O genoposídeo é um iridóide natural, o principal componente da *Genipa americana* Linnaeus, mais conhecida como jenipapo. O jenipapo é uma fruta amplamente encontrada na região da América Central e do norte do Brasil. O genoposídeo é encontrado no endo e mesocarpo dos frutos do jenipapo, podendo ser encontrado também nos frutos de *Gardenia jasminoides*, *Castilleja tenuiflora*, *Bellardia trixago* e *Eucommia ulmoides*, além das folhas e caules de *Tocoyena formosa* e *Randia spinosa*. A enzima que catalisa a reação na qual a molécula de açúcar do genoposídeo é liberada dá origem ao genipin (BELLÉ et al., 2018).

Seu peso molecular é de 226,228g/mol, é solúvel em DMSO (50mg.mL<sup>-1</sup>), DMF ( $\geq 25$  mg.mL<sup>-1</sup>), etanol a 100% (5 mg.mL<sup>-1</sup>), e metanol. Insolúvel em água. Seu ponto de fusão está situado entre 121-125°C e ponto de ebulição em cerca de 416°C a 760mmHg. Possui densidade de 1,4g/cm<sup>3</sup> e pKa 12,07.

Além disso, o fato de ser cerca de cinco a dez mil vezes menos tóxico que o glutaraldeído e de parecer produzir uma moderada resposta anti-inflamatória in vivo o torna um bom agente de reticulação (BELLÉ et al., 2018; GAUDIO et al., 2017).

O genipin revela efeitos anti-inflamatórios e anti-angiogênese, além de inibir peroxidação lipídica e produção de óxido nítrico (MUZZARELLI, 2009)

## **2.6 Técnicas de produção de sistemas micro e nanoparticulados**

Existem várias técnicas de produção de sistemas de liberação micrométricos. Dentre os diferentes métodos, podemos citar o spray-drying, a técnica de simples emulsão, a dupla emulsificação, a evaporação do solvente, bem como a geleificação ionotrópica, a complexação polieletrólítica e a reticulação química ou covalente (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; NIDHI et al., 2016; RASSU et al., 2016; SARVAIYA; AGRAWAL, 2015).

### **2.6.1 Spray-drying**

O Spray-drying é uma técnica de secagem amplamente utilizada para obtenção de pós e grânulos a partir de uma mistura de fármaco com os excipientes

em suspensões. O método se baseia na secagem de gotículas atomizadas por jato de ar quente (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

É um método de rápido processo, considerado custo efetivo, na qual todo o solvente orgânico é eliminado do sistema. Através dessa técnica, as micropartículas formadas têm característica porosa, e tanto polímeros hidrofílicos quanto hidrofóbicos podem ser empregados.

Contudo, é um processo que emprega altas temperaturas, e seu rendimento pode ser bem menor considerando que parte das partículas submetidas à secagem. Além disso, os fármacos submetidos à técnica podem sofrer alterações polimórficas (NIDHI et al., 2016).

### *2.6.2 Emulsificação*

Método considerado simples, consiste no gotejamento de uma fase aquosa, na qual o fármaco foi previamente disperso, em uma fase orgânica, com o intuito de produzir pequenas gotículas do fármaco presente na fase dispersa em uma fase dispersante, que necessitam ser submetidas após o preparo com emprego de agitação, aos processos de centrifugação e lavagem, para posterior separação das partículas produzidas. A emulsão formada é estabilizada pela adição de um agente reticulante ou ainda por aquecimento. O processo de mistura e agitação com a fase orgânica ou aquosa pode acontecer mais de uma vez, processo que gera uma dupla emulsificação (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; EL-SAY; EL-SAWY, 2017; NIDHI et al., 2016).

### *2.6.3 Coacervação/precipitação*

Método que considera as propriedades físico-químicas da quitosana, mas que precipita e/ou coacerva quando em contato com solução alcalina. As partículas produzidas através da aspersão da dispersão de quitosana sobre uma solução de pH alcalino como o hidróxido de sódio, a partir do uso de um compressor de ar. Em alguns casos, pode ser complicado remover completamente o óleo da preparação (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; EL-SAY; EL-SAWY, 2017; NIDHI et al., 2016).

#### 2.6.4 Geleificação iônica ou ionotrópica

É uma técnica que tem sido aplicada com o objetivo de evitar uma possível toxicidade dos reagentes empregados, prevenindo o surgimento de efeitos indesejáveis. Um poliânion, como o tripolifosfato de sódio (TPP) e um polycation como a quitosana são dispostos por gotejamento sob agitação, e interagem por forças eletrostáticas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; RASSU et al., 2016).

Inclusive, a quitosana facilmente forma complexos polieletrólitos com ácido hialurônico, sulfato de condroitina, genipin, entre outros (SARVAIYA; AGRAWAL, 2015). O uso de complexação entre macromoléculas de cargas opostas para preparar microesferas de quitosana tem atraído muita atenção, uma vez que o processo é muito simples e suave. Ao contrário da reticulação química, na qual as interações acontecem por ligações covalentes, a reticulação física envolve interações eletrostáticas (NIDHI et al., 2016).

#### 2.6.5 Reticulação covalente ou reticulação química

Por esse método, ao se empregarem aldeídos mono ou bifuncionais como agentes de reticulação, a reação ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila dos agentes. Na sequência, há a produção de bases de Schiff ou aldiminas. O mesmo mecanismo reacional ocorre quando são empregadas cetonas bifuncionais (GONSALVES et al., 2011)

O mecanismo de reticulação das cadeias de quitosana pelo genipin parece ser influenciado pelo pH do meio reacional (MUZZARELLI, 2009). Sendo assim, dois processos químicos de reticulação podem acontecer: um em meio com pH ácido ou neutro e o outro processo em ambiente de pH alcalino.

As micro e nanopartículas preparadas por este método tendem a ser estáveis em meio aquoso, em pH ácidos, neutros e levemente alcalinos (LIU et al., 2008).

### 2.7 Micro e nanopartículas baseadas em polissacarídeos

Polímeros empregados no preparo de sistemas de liberação nanoparticulados devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Com esse objetivo, muitos materiais poliméricos têm sido aplicados, incluindo o ácido poliláctico, o ácido poliglicólico, a policaprolactona, os polissacarídeos, em particular a quitosana, a família do ácido poliacrílico, bem como proteínas e polipeptídeos como a gelatina, e outros, sendo que os polissacarídeos são os materiais poliméricos mais populares no preparo de sistemas de liberação nanoparticulados (LIU et al., 2008).

Os polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos. Na natureza, os polissacarídeos podem ser encontrados em diversos recursos como o alginato, extraído de algas, a pectina e a goma guar, de origem vegetal, a dextrana e a goma xantana, de origem microbiana, bem como a quitosana e a condroitina, de origem animal (LIU et al., 2008; MALVIYA et al., 2018).

Os polissacarídeos tem um grande número de grupamentos químicos reativos, além de uma ampla variação no peso molecular, com composição química variada, o que contribui para sua diversidade estrutural e de propriedade. Podem se dividir em polieletrólitos e não-polieletrólitos, sendo que ainda podem ser caracterizados como polissacarídeos carregados positivamente, como a quitosana, ou carregados negativamente, como o alginato, a heparina, a pectina, o ácido hialurônico, entre outros (LIU et al., 2008).

A maioria dos polissacarídeos tem grupamentos hidrofílicos em suas cadeias como hidroxilas, carboxilas e grupamentos amino, que podem formar ligações não covalentes com tecidos biológicos, principalmente o epitélio e as mucosas, proporcionando bioadesão. A quitosana e o alginato são exemplos de bons materiais bioadesivos. Os carreadores nanoparticulados desenvolvidos com polissacarídeos bioadesivos podem prolongar o tempo de permanência, bem como aumentar a absorção dos fármacos que carregam em seu interior (LIU et al., 2008).

Nos últimos anos, um extenso número de estudos tem sido conduzido com esses materiais e seus derivados, com potencial aplicação nos sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados.

## **2.8 Nanopartículas obtidas por complexação polieletrólítica**

A técnica de complexação polieletrólítica envolve a mistura de polieletrólitos com carga oposta que resulta na autoformação de agregados em solução aquosa

devido à formação de ligações eletrostáticas fortes, mas reversíveis, sem qualquer uso de reticulante covalente (DU et al., 2015).

A complexação polieletrólítica se diferencia da técnica de reticulação iônica ou ionotrópica por empregar moléculas maiores com faixa mais ampla de massa molecular, como polissacarídeos, proteínas e polímeros sintéticos (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010)

As propriedades de resposta ao pH de complexos polieletrólíticos a base de quitosana (PECs) dependem, de modo geral, principalmente da escolha da molécula aniônica para a sua formação e da razão de carga de dois polieletrólitos. Diferentes moléculas aniônicas possuem diferentes intensidades de carga e o pH do meio ambiente modula as interações iônicas entre a quitosana e as moléculas aniônicas e, conseqüentemente, as propriedades do complexo (DU et al., 2015).

Polieletrólitos de cargas opostas podem formar complexos intermoleculares, mas demonstram desestabilização pH-dependente. Inclusive, a estabilidade destes compostos também depende da densidade de carga, do solvente, da força iônica e da temperatura (AMIDI et al., 2010).

É relatada na literatura a produção deste tipo de sistema com sucesso a partir do uso de várias macromoléculas aniônicas solúveis em água, incluindo polímeros naturais como alginato, gelatina, colágeno e sulfato de dextrano, e polímeros sintéticos como o ácido poliacrílico, poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), ácido poli ( $\gamma$ -glutâmico). Por exemplo, usando quitosana quaternizada (HTCC) e sulfato de dextrano (DS), complexos polieletrólíticos podem ser obtidos para liberação de proteínas (DU et al., 2015).

O processo de complexação polieletrólítica apresenta uma série de vantagens. Por ser um método livre da utilização de solventes orgânicos, tem se revelado um processo atóxico, o que evita indução a efeitos tóxicos e outros efeitos indesejáveis (DUMITRIU; CHORNET, 1998), além de ser uma metodologia que requer condições relativamente simples de controle e sem o envolvimento de altas temperaturas (KIILL et al., 2017).

A quitosana, com inúmeros grupamentos amino e característica catiônica, é insolúvel na cavidade oral em pH alto, enquanto se torna mais solúvel a medida que o pH diminui, como quando exposto ao ambiente gástrico. As formulações com dissolução pH responsiva são bastante empregadas no tratamento de várias doenças gástricas (DU et al., 2015).

Além do complexo polieletrólítico poder evitar a liberação prematura do fármaco, estudos mostram que a escolha de um polímero aniônico gastrorresistente pode também evitar a liberação gástrica de fármacos associados à complexos polieletrólíticos compostos por quitosana. O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) é um polímero aniônico comumente empregado em filmes de revestimento gastrorresistente de cápsulas e comprimidos (FERREIRA, 2008). Ele foi recentemente utilizado no preparo de complexos polieletrólíticos de quitosana para incorporação de zidovudina para tratamento oral da AIDS, e os resultados mostraram que estes complexos formaram nanopartículas e que o polímero contribuiu para evitar a liberação do fármaco em ambiente gástrico e promoveu sua liberação em ambiente entérico, além de estudos *in vitro* de interação eletrostática com a mucina terem mostrado promover a mucoadesão (PEDREIRO; CURY; GREMIÃO, 2016).

## **2.9 Nanopartículas obtidas por reticulação covalente**

A reticulação química é uma abordagem direta para produzir redes de hidrogel permanentes através da ligação covalente entre cadeias de polímero com agentes de perfil de liberação controlada (DU et al., 2015).

Os derivados de quitosana com grupos carboxilo tais como carboximetilquitosana, succinilquitosana e alguns outros podem ser desenvolvidos em preparações sensíveis ao pH para administração intestinal após ligação com reticulantes apropriados. Estas preparações podem intumescer de modo significativo e realizar a liberação acelerada do fármaco no pH intestinal devido à protonação de grupos carboxilo. A quitosana reticulada quimicamente pode tornar a rede polimérica estável em certos ambientes de pH, em particular ao pH gástrico intensamente ácido, o que pode impedir a liberação de fármaco no estômago e realizar administração intestinal localizada de modo controlado (DU et al., 2015).

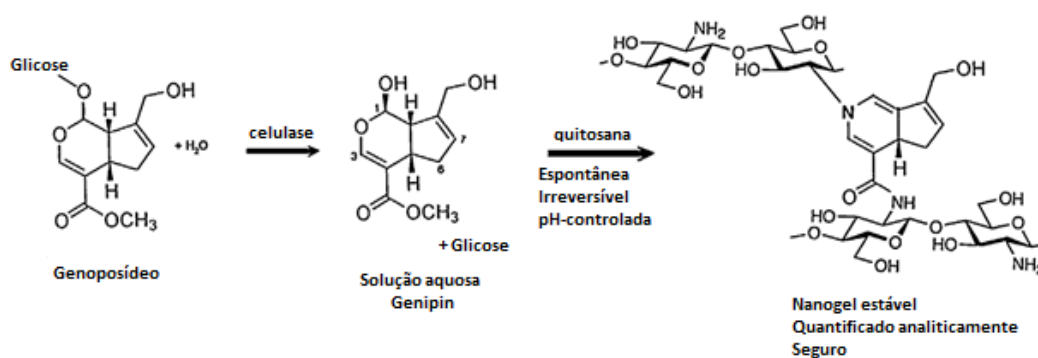
Moléculas bifuncionais pequenas, como glutaraldeído, ureia-formaldeído e dianidrido piromelítico têm sido aplicadas com sucesso como agentes reticulantes da quitosana para administração intestinal de fármacos. Estas moléculas podem se ligar aos grupamentos  $-NH_2$  e  $-OH$  disponíveis no esqueleto de quitosana para formarem ligação covalente, com a formação de base de Schiff. De maneira alternativa, os polímeros com grupos funcionais tais como o poli (ácido  $\gamma$ -glutâmico)

podem também formar redes reticuladas com quitosana, levando à melhora da propriedade mecânica ao pH gástrico (DU et al., 2015).

O processo de reticulação covalente pode ser realizado a partir da realização de ligações químicas pelo uso de pequenas moléculas de agentes reticuladores, de reações entre polímeros com grupamentos químicos funcionalizados, e ainda com agentes fotossensíveis ou reações catalisadas por enzimas (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Os agentes reticulantes mais utilizados são o glutaraldeído e o formaldeído, porém são agentes com propriedades tóxicas. Assim, um novo agente reticulante, o genipin, um agente químico naturalmente derivado do gênero Gardenia, tem sido investigado pela sua biocompatibilidade. Tem sido reportado que o genipin se liga a tecidos biológicos e biopolímeros como a quitosana e a gelatina, além de se ligar bem às proteínas. Demonstra ser efetivo na reticulação com polímeros contendo grupos amino, além de ser muito menos citotóxico que o glutaraldeído. Inclusive, seu uso tem demonstrado um perfil de liberação prolongada in situ em hidrogéis de quitosana (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010). Além disso, tem sido reportado que o genipin possui propriedades anti-inflamatória, anti-angiogênica, antioxidante, anti-proliferativa e indutoras de apoptose (MUZZARELLI et al., 2016). A Figura 2 representa o mecanismo proposto para a formação da reticulação entre quitosana e genipin.

Figura 2 - Reação de formação da base de Schiff entre quitosana e genipin, formando composto identificado pela coloração azul.



Fonte: adaptado de Muzzarelli et al., 2016.

## 2.10 Nanopartículas contendo mesalazina

O 5-ASA é um fármaco de classe IV segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, logo, possui baixa solubilidade e permeabilidade, culminando em baixa biodisponibilidade (FERREIRA, 2008). Desta maneira, muitos estudos focam no desenvolvimento de sistemas particulados com o objetivo de penetrar e reter o sistema através da mucosa, melhorando seu contato com o local de ação, onde o fármaco deve agir.

Nanopartículas de PLGA preparadas por emulsificação e difusão do solvente, tamanho 135 nm, com eficiência de encapsulação na faixa de 22-28%, promoveu um perfil de liberação do 5-ASA com um efeito burst (liberou quase 50%) seguido de uma liberação prolongada de 10 dias. Apesar de aparentemente ser um resultado promissor, foi utilizado como meio de liberação a água, não levando em consideração as diferenças de pH do TGI (MAHAJAN; SAKARKAR; MANMODE, 2011).

Micropartículas de quitosana e alginato produzidas por spray-drying resultaram em partículas esféricas negativas com diâmetro menor que 10  $\mu\text{m}$  e eficiência de incorporação de cerca de 8%, o qual foi considerado satisfatório em comparação com o valor teórico de 14,3%. Este resultado é promissor, tendo em vista a solubilidade limitada do 5-ASA. O estudo se limitou à caracterização físico-química e estabilidade (MLADENOVSKA et al., 2007).

Outro exemplo de microesferas de quitosana preparadas por spray-drying testou os sistemas em modelo in vitro de inflamação. Elas não apresentaram citotoxicidade, promoveram a redução dos níveis de IL-1e IL-8 e mantiveram os níveis de das interleucinas em células não inflamatórias. O teste de liberação resultou num perfil extremamente lento, mas isto foi devido ao meio de dissolução utilizado ser a água, no qual o 5-ASA é insolúvel (AGUZZI et al., 2011).

Mura et al., (2012) testou uma quitosana modificada, a N-succinil-quitosana, por possuir como diferencial a baixa solubilidade em meio gástrico, o que confere potencial para atingir o cólon, além da biocompatibilidade, mucoadesão e baixa toxicidade, assim como a quitosana convencional. Foram produzidas micropartículas por spray-drying, resultando em partículas esféricas com potencial zeta  $-20.7 \pm 4.9$  mV, intumescimento máximo em pH = 7,4, liberação de menos de 10% do

5-ASA em pH ácido em 2h e mais de 90% em pH colônico em 24h (MURA et al., 2012).

Com o objetivo de aumentar ainda mais o direcionamento colônico, um estudo desenvolveu microesferas magnéticas de magnetita para promover o direcionamento por meio de aplicação de um campo magnético externo. As microesferas foram produzidas pela técnica da evaporação de solvente, utilizando como polímeros gastrorresistentes o Eudragit S-100 e a etilcelulose, juntamente com a quitosana. Foi avaliado a encapsulação do 5-ASA e a liberação, porém não foram realizados estudos de direcionamento colônico por meio da magnetita (KAKAR; BATRA; SINGH, 2013)

Outra maneira de retardar a liberação de fármacos é por meio de acoplamento covalente do fármaco ao sistema de liberação. Pertuit et al (2007) ligou o 5-ASA ao polímero policaprolactona e produziu partículas por emulsificação e nanoprecipitação, obtendo nanopartículas entre 200-350 nm. Resultados in vivo mostraram uma diminuição da atividade de mieloperoxidase (PERTUIT et al., 2007).

Apesar de alguns trabalhos encontrados, são encontrados poucos os estudos envolvendo o desenvolvimento de micro e nanopartículas contendo 5-ASA. A maioria aplica a quitosana somada a algum polímero gastrorresistente, utilizando técnicas de spray-drying, emulsificação e nanoprecipitação.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é explorar diferentes técnicas de produção de micro e nanopartículas de quitosana para incorporação de 5-ASA, a fim de promover uma potencial liberação colônica de mesalazina.

#### 3.1 Objetivos específicos

- a) Investigar as condições ótimas para a obtenção das nanopartículas de quitosana, empregando a complexação polieletrólítica, a reticulação covalente e a emulsificação seguida por reticulação covalente;
- b) Avaliar a capacidade de incorporação do 5-ASA aos sistemas;
- c) Realizar a caracterização das partículas por estudos de determinação do tamanho médio, análise da morfologia e potencial zeta;
- d) Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação do 5-ASA nos sistemas desenvolvidos e nos testes de liberação;
- e) Determinar o perfil de liberação do fármaco a partir das micropartículas obtidas em diferentes valores de pH.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e equipamentos

- a) Ácido 5-aminossalicílico ou mesalazina, grau de pureza 95%, marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- b) Ácido acético P.A. Vetec<sup>®</sup>
- c) Ácido clorídrico P.A., marca Vetec<sup>®</sup>
- d) Agitador magnético analógico, marca Velp<sup>®</sup>, modelo Multistirrer 6
- e) Água deionizada Milli-Q<sup>®</sup>
- f) Balança analítica UniBloc, marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo AUY220
- g) Cartucho pré-coluna C<sub>18</sub> Aqua, 10/PCT, marca Phenomenex<sup>®</sup>
- h) Coluna de fase reversa para sistema CLAE C<sub>18</sub> de 150mm x 4,6mm, marca ACE<sup>®</sup>
- i) Dessecador
- j) Dissolutor, marca Nova Ética<sup>®</sup>, modelo 299
- k) Filtro de seringa de nylon 0,45µm, 13mm, 100/PCT, marca Allcrom<sup>®</sup>
- l) Filtro de seringa PTFE hidrofóbica 0,45µm, 13mm, 100/PCT, marca Allcrom<sup>®</sup>
- m) Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. Vetec<sup>®</sup>
- n) Fosfato de sódio monobásico monoidratado P.A. Vetec<sup>®</sup>
- o) Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (100g), marca Shin-Etsu Chemical<sup>®</sup>
- p) Genipin, grau CLAE, marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- q) Hidróxido de sódio (lentilhas) P.A. Vetec<sup>®</sup>
- r) Membrana filtrante PTFE hidrofóbica 0,45µm, 47mm, 200/PCT, marca Millipore<sup>®</sup>
- s) Metanol grau CLAE, marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- t) Óleo mineral ou vaselina líquida, marca Vetec<sup>®</sup>
- u) pHmetro digital, marca Tecnopon<sup>®</sup>, modelo mPA-210, equipado com eletrodo de pH blindado de bulbo circular, marca Sensoglass<sup>®</sup>, modelo SC06
- v) Pipetadores de volume ajustável, marca Kacil<sup>®</sup>, modelos AMD e ASD
- w) Polissorbato 80 ou Tween 80 P.A., marca Vetec<sup>®</sup>
- x) Quitosana de baixo peso molecular (250g), marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>

- y) Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, marca Shimadzu<sup>®</sup>, LC-20AT, com detector UV-Vis SPD-20A, módulo de comunicação CBM-20A, e autoamostrador SIL-20HT
- z) Termômetro digital infravermelho de mira laser, marca Incoterm<sup>®</sup>, modelo ST-600
- aa) Zetasizer Nano ZS, marca Malvern<sup>®</sup>

#### **4.2 Etapas de pré-formulação para reação de complexação polieletrólítica**

Inicialmente, foi realizado um estudo da incorporação do fármaco mediante análise do seu comportamento nos meios ácido e básico, considerando que o fármaco apresenta diferentes valores de pKa. Três diferentes soluções contendo 5 mg.mL<sup>-1</sup> de 5-ASA foram preparadas: em ácido acético, em ácido clorídrico e em NaOH, cada uma na concentração de 0,1 M e o resultado foi avaliado visualmente quanto a presença de precipitação ou floculação, variações na cor da solução no momento do preparo e alterações de cor em decorrência do tempo pós preparo e por exposição à luz.

Considerando que a complexação polieletrólítica é altamente influenciada pelo pH do meio reacional, realizou-se um estudo para determinação da ordem ideal para gotejamento dos polímeros e para definição de qual dispersão polimérica receberia o fármaco, uma vez que as alterações possíveis refletiriam no resultado.

Foi testada a solubilização do fármaco em tampão fosfato e em ácido clorídrico 0,1 M. Foram realizados gotejamentos da dispersão de HPMCP sobre dispersão de quitosana preparada com ácido acético 0,1 M contendo o fármaco anteriormente solubilizado em solução tampão fosfato ou em ácido clorídrico 0,1 M, posteriormente ajustado para 5,5, com o auxílio de seringas com agulha descartável e sob constante agitação magnética próxima de 800 rpm.

#### **4.3 Método da complexação polieletrólítica**

As nanopartículas de quitosana foram preparadas através da complexação polieletrólítica com HPMCP, polímero insolúvel em pH ácido e que, por este motivo, confere gastrorresistência. Desta forma, suspensões de partículas foram formadas

por gotejamento da dispersão de HPMCP em dispersões de quitosana sob agitação magnética próxima de 800 rpm e temperatura fixada em torno de 35 a 37°C.

A dispersão de quitosana foi preparada a partir da incorporação do pó em solução de ácido acético 0,1 M, mantida sob agitação por cerca de 30 minutos a velocidade aproximada de 500 rpm, até completa dissolução. Já a dispersão de HPMCP foi preparada a partir da incorporação do pó em solução de hidróxido de sódio 0,1 M, mantida por cerca de 20 minutos sob agitação constante, a mesma velocidade. O pH destas soluções situava-se em valores próximos de 4,00 e 13,00, respectivamente. Os valores de pH das soluções foram posteriormente ajustados para cerca de 5,50.

A complexação polieletrólítica foi realizada com a preparação de diferentes volumes de HPMCP, em diversas concentrações, os quais foram gotejados em dispersão de quitosana de concentração variável sob constante agitação magnética. Em seguida, a mistura resultante foi classificada visualmente como dispersão transparente (DT), dispersão opalescente (DO) e agregados (A). Por fim, os valores das concentrações de quitosana e HPMCP presentes na dispersão final de cada amostra foram organizados e encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação para preparo das amostras de partículas em relação ao volume de quitosana e HPMCP a serem utilizados e sua razão polimérica em massa.

(continua)

Amostra	Concentração QS e HPMCP (mg.mL <sup>-1</sup> )	Volume de QS	Volume de HPMCP	Razão QS/HPMCP (mg/mg)
<b>NP1</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	3,0 mL	16:1
<b>NP2</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	6,0 mL	8:1
<b>NP3</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	12,0 mL	4:1
<b>NP4</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP5</b>	2,0 e 1,0	24,0 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP6</b>	3,0 e 1,0	16,0 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP7</b>	4,0 e 1,0	12,0 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP8</b>	5,0 e 1,0	9,6 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP9</b>	6,0 e 1,0	8,0 mL	16,0 mL	3:1
<b>NP10</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	24,0 mL	2:1
<b>NP11</b>	1,0 e 1,0	48,0 mL	48,0 mL	1:1
<b>NP12</b>	1,0 e 5,0	48,0 mL	3,0 mL	3,2:1
<b>NP13</b>	1,0 e 5,0	48,0 mL	6,0 mL	1,6:1

Tabela 1 – Relação para preparo das amostras de partículas em relação ao volume de quitosana e HPMCP a serem utilizados e sua razão polimérica em massa.

(conclusão)

Amostra	Concentração QS e HPMCP (mg.mL <sup>-1</sup> )	Volume de QS	Volume de HPMCP	Razão QS/HPMCP (mg/mg)
NP14	1,0 e 5,0	48,0 mL	12,0 mL	0,8:1
NP15	1,0 e 5,0	48,0 mL	24,0 mL	0,4:1
NP16	1,0 e 5,0	48,0 mL	48,0 mL	0,2:1
NP17	5,0 e 1,0	48,0 mL	3,0 mL	80:1
NP18	5,0 e 1,0	48,0 mL	6,0 mL	40:1
NP19	5,0 e 1,0	48,0 mL	8,0 mL	30:1
NP20	5,0 e 1,0	48,0 mL	12,0 mL	20:1
NP21	5,0 e 1,0	48,0 mL	24,0 mL	10:1
NP22	5,0 e 1,0	48,0 mL	48,0 mL	5:1

Fonte: do autor.

#### 4.4 Método de reticulação química da quitosana com genipin

O método foi adaptado de Fonsêca (2015). Em um béquer, foi pesado aproximadamente 0,01 g de polissorbató 80. Em seguida, foram pesados 50 mg de 5-ASA, que foram adicionados sobre 10 mL de quitosana previamente preparada na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em ácido clorídrico 0,1 M. À parte, foram preparados 50 mL de solução alcoólica a 40%, contendo 11,30 mg de genipin e 10 mL dessa solução foi adicionada gota a gota sobre a mistura de 10 mL da dispersão de quitosana, empregando uma seringa imersa na dispersão, com pressão necessária para fornecer fluxo de 1 mL/min.

Foram testados dois tipos de agitação para a reação de reticulação: a agitação magnética a 800 rpm por 3 horas (agitador magnético analógico, marca VELP, Multistirrer 6, Usmate Velate, Itália) e o agitador digital de alta performance (ultra-turrax, IKA, modelo T 25 D, Staufen, Alemanha) a 8.000 rpm por 5 minutos. As dispersões resultantes foram centrifugadas a 3.400 rpm por 30 minutos e ressuspensas em água para caracterização.

As amostras produzidas por esse método foram chamadas de Chem-Mag, quando submetidas à agitação magnética e Chem-UT, quando submetidas à agitação pelo ultra-turrax.

#### **4.5 Método de emulsificação água/óleo pela reticulação da quitosana com genipin**

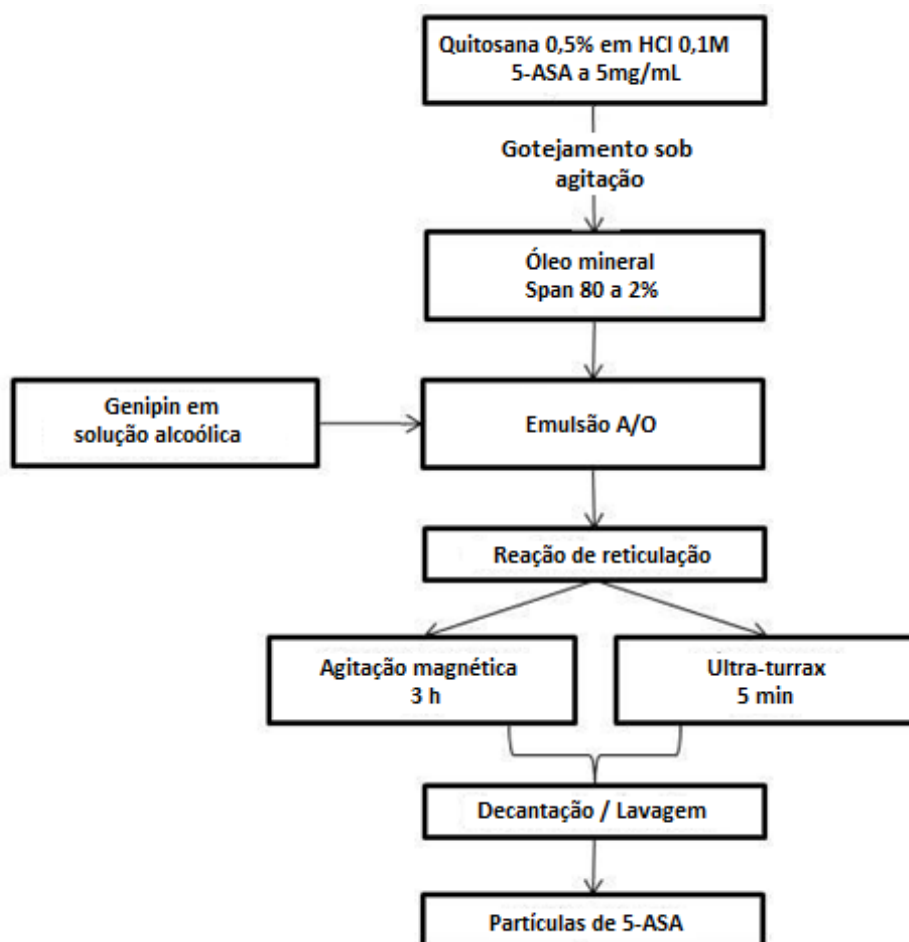
O procedimento de preparo é similar ao descrito por Moura et al. (2015) com algumas pequenas modificações. A quitosana foi preparada na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução aquosa de HCl a 0,1 M. Como resultado, foram obtidas dispersões correspondentes à fase dispersa em água (hidrofílica), na qual o 5-ASA foi solubilizado à  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Em seguida, um volume de 3 mL dessa solução foi dispenso, então, por gotejamento, a 40 mL da mistura de óleo mineral e 0,8 mL de Span 80 (2%, v/v), que foi a fase orgânica, resultando em uma fase água/óleo na proporção de 1:13,3 v/v. A emulsão A/O foi produzida sob constante agitação, utilizando agitação magnética na velocidade aproximada de 800 rpm (MOURA; MARTINS; DUARTE, 2015). Uma vez formada a emulsão, 15 mg de genipin foram dispersos em 5 mL de etanol 70%, do qual um volume de 0,5 mL foi retirado, para manter proporção 1:100 GNP/QS, e foi adicionado gota a gota à emulsão A/O, a fim de obter uma emulsão com a proporção de genipin para quitosana de 1:6 (v/v). O pH final das dispersões de quitosana e de genipin não foram medidos. Para a reticulação dessas partículas, também foram testados dois processos de agitação, um usando agitador magnético a 800 rpm por 3 horas e outro com ultra-turrax a 8.000 rpm por 5 minutos, ambos à temperatura de 25°C.

As partículas resultantes foram separadas da fase dispersante por decantação. O sobrenadante foi eliminado e as partículas foram lavadas com 20 mL de hexano com agitação manual com auxílio de um bastão de vidro por três vezes. Finalmente, as partículas foram deixadas em repouso, e em seguida, submetidas à secagem à temperatura ambiente. As amostras produzidas por este método foram denominadas Emul-Mag quando submetidas à agitação magnética e Emul-UT quando submetidas à agitação por ultra-turrax.

O procedimento de preparo de amostras por emulsificação A/O, seguida por reticulação química está descrito na Figura 3.

Figura 3 - Procedimento para preparo de amostras por emulsificação A/O e reticulação química.



Fonte: Do autor.

#### 4.6 Caracterização das partículas obtidas

Conforme descrito abaixo, foram realizadas as análises para determinação de tamanho, Pdl e análise de potencial zeta para as amostras de micropartículas preparadas.

##### 4.6.1 Determinação de tamanho, Pdl e análise de potencial zeta

As amostras foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), o índice de polidispersidade (Pdl) e a mobilidade eletroforética usando o Zetasizer NanoZS, da Malvern Instruments, Inglaterra. Os índices de refração usados foram de 1,33 e 1,55 para a água e a quitosana, respectivamente. Todas as medidas foram

realizadas em triplicata na temperatura de 25°C e para cada amostra, o diâmetro médio da partícula, a polidispersidade e o desvio-padrão de dez determinações foi calculado pela aplicação de análise multimodal.

#### *4.6.2 Morfologia das partículas*

A morfologia das partículas produzidas foi analisada mediante imagens de microscopia ótica, acoplada a uma câmera. Foi obtida por um procedimento de escaneamento uma média de 50 imagens para cada uma das 3 amostras preparadas, colocadas sobre uma lâmina e secas ao ar livre, seguindo uma sequência da esquerda para a direita (MOURA; MARTINS; DUARTE, 2015).

#### *4.6.3 Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier*

A espectroscopia infravermelho empregada foi o FTIR-ATR – Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier com dispositivo de refletância total atenuada, Vertex 70, Bruker, Alemanha. Esse método foi usado para investigar a reação de reticulação dos grupos amino da quitosana com o genipin. As partículas usadas nesta análise, contudo, foram previamente submetidas à liofilização com o intuito de produzir um pó fino. Foi adicionado brometo de potássio ao pó obtido e a mistura foi compactada em forma de pastilha. Os espectros de infravermelho foram obtidos em temperatura ambiente, na frequência entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Foram também obtidos os espectros dos polímeros puros e do fármaco para comparação.

#### *4.6.4 Análise de difração de raios-X por pó*

As análises foram realizadas à temperatura ambiente usando o difratômetro Rigaku, marca Ultima IV, Tóquio, Japão com geometria  $\theta$ - $2\theta$ , utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), e monocromador de grafite, em operação a 40 kV e 30 mA. O intervalo de varredura angular  $2\theta$  entre  $3^\circ$  e  $50^\circ$  em  $2\theta$ , com varredura contínua, passo de  $0,02^\circ$  em  $2\theta$  e velocidade de  $0,5^\circ 2\theta/\text{min}$ . As amostras foram finamente posicionadas em um superfície de vidro no amostrador.

Os padrões experimentais foram comparados aos calculados pela importação das estruturas dos cristais determinados para o fármaco livre, o cloridrato de mesalazina e cloridrato de mesalazina monoidratada (CCDC CODE: SAQJAV02; SAQJEZ; PUVMAU), encontradas no programa Mercury.

#### 4.6.5 *Análise do rendimento de partículas*

Toda a massa de partículas de quitosana recuperada após a lavagem e a secagem foi pesada e dispersa em 15 mL de NaOH 1 M para promover a precipitação da quitosana e a solubilização do 5-ASA. O sistema foi centrifugado a 3.400 rpm por 30 min e o sobrenadante foi diluído em fase móvel, sendo posteriormente filtrado em membrana PTFE 45 µm para injeção no CLAE.

O rendimento foi calculado pelo peso do placebo, e das partículas que possuíam o 5-ASA encapsulado recuperadas em relação ao material inicialmente usado para o preparo das partículas. O rendimento foi determinado pelo uso da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Rendimento \%} = \text{Rendimento prático} / \text{Rendimento Teórico} \times 100$$

#### **4.7 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para determinação de 5-ASA nas partículas**

Uma metodologia analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi desenvolvida e validada para determinação da concentração do fármaco. O equipamento da Shimadzu foi usado nas análises, e consiste de um módulo com bomba para doseamento dos solventes CBM-20A, detector espectrofotométrico SPD-20A, ajustado para 254 nm, e um módulo de injeção automática SIL-20AHT, para injeção de 20 µL de amostra. Foi usada uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> marca ACE de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula 5 µm.

A fase móvel isocrática empregada consistia de uma mistura de metanol/tampão fosfato pH 6,6, com proporção 9:1 (v/v), sob um fluxo de 0,6 mL/min. Foi construída uma curva de calibração das soluções padrão de 5-ASA de 1 µg.mL<sup>-1</sup> a 50 µg.mL<sup>-1</sup> dissolvida em fase móvel.

A fase móvel para construção da curva de calibração foi composta de tampão fosfato 0,05 M pH 5,5 ou 6,6 e metanol, na proporção de 90:10, visando manter o tempo de retenção adequado à separação dos componentes das formulações e a visualização do perfil cromatográfico.

Os seguintes parâmetros de validação foram considerados na construção da curva analítica: seletividade, linearidade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação.

Para avaliação da seletividade, foi eluído pelo sistema cromatográfico uma amostra contendo o fármaco, na mesma fase móvel do sistema, dentro da faixa de concentração estabelecida para construção da curva e uma amostra denominada “branco”, que não continha traços do insumo farmacêutico ativo empregado.

Para demonstração da linearidade a partir da curva analítica construída, foram preparadas três amostras para sete diferentes concentrações, a saber: 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 50,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , diluídas a partir de uma mesma solução mãe, conforme recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2017).

Para avaliação da exatidão e da precisão do método, foram preparadas para cada parâmetro três amostras para três diferentes concentrações (baixa, média e alta), cujas concentrações reais, desvios-padrão e coeficientes de variação foram calculados.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados em parâmetros da curva analítica.

Quanto à robustez, o método não foi completamente avaliado, apesar das percepções do analista durante a determinação das melhores condições para realização das análises.

#### **4.8 Estudos de liberação *in vitro* do 5-ASA**

Os estudos de liberação *in vitro* do 5-ASA a partir das formulações desenvolvidas foram realizados empregando dissolutor (modelo 299, marca Nova Ética) e as seguintes condições: volume de meio de 300 mL, aparato cesto e agitação 50 rpm e temperatura de 37°C. As formulações foram isoladas do meio de liberação através do acondicionamento em sacos de diálise (membrana sintética de acetato de celulose com cut off de 12-14 KDa). As membranas foram cortadas em forma de cilindro com cerca de 6 cm e lavadas com água Milli-Q à temperatura de

100°C por 15 minutos. Em seu interior, foram acrescentados 2 mL da amostra, contendo 5-ASA a 4 mg.mL<sup>-1</sup>, tendo posteriormente as duas extremidades amarradas com um nó.

Para avaliação da liberação gástrica utilizou-se como meio de dissolução, solução de ácido clorídrico 0,1 M, pH 1,2 e procedeu-se o ensaio durante 1 hora. Para avaliação da liberação entérica, utilizou-se como meio de dissolução tampão fosfato 0,05 M, pH = 6,6, e procedeu-se o ensaio por 6 horas, com coleta a cada hora, para traçar o perfil de liberação do fármaco. Vale ressaltar que para os dois meios utilizados, as condições *sink* foram mantidas. Foram coletadas amostras de 1 mL, com imediata reposição do meio, e o fármaco foi determinado CLAE.

A cinética de liberação do fármaco foi avaliada pela aplicação de diferentes modelos matemáticos, como de ordem zero, de primeira ordem, Weibull, Korsmeyer-Peppas e Higuchi. Para selecionar o melhor modelo que se adequa ao perfil de liberação foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r) (COSTA; SOUSA LOBO, 2001; FREDENBERG et al., 2011).

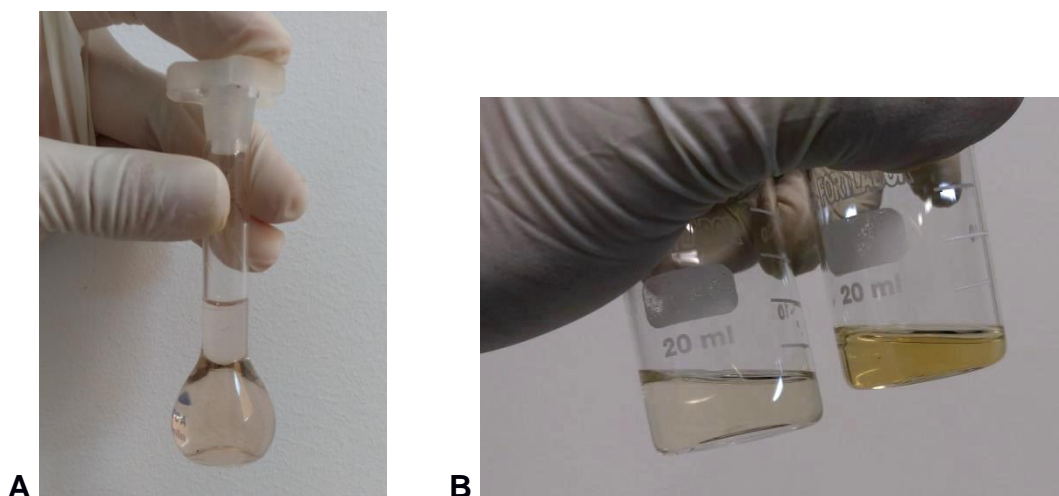
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em cada uma das fases realizadas na pesquisa estão descritos abaixo.

### 5.1 Obtenção das micropartículas de quitosana

Como a mesalazina é um fármaco que possui diferentes valores de pKa (2,02; 5,8 e 12) conforme descreve ZERROUK et al. (1998), foram realizados testes de solubilidade, com o propósito de identificar o seu comportamento em soluções ácida e básica, para realização da complexação polieletrólítica. Com a concentração estabelecida em  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , o fármaco foi pesado em balança analítica, adicionado em soluções de ácido acético e clorídrico 0,1 M e em solução alcalina de NaOH 0,1 M, e o resultado da solubilização foi avaliado visualmente, conforme Figura 4.

Figura 4 – Solução de mesalazina preparada em diferentes condições.

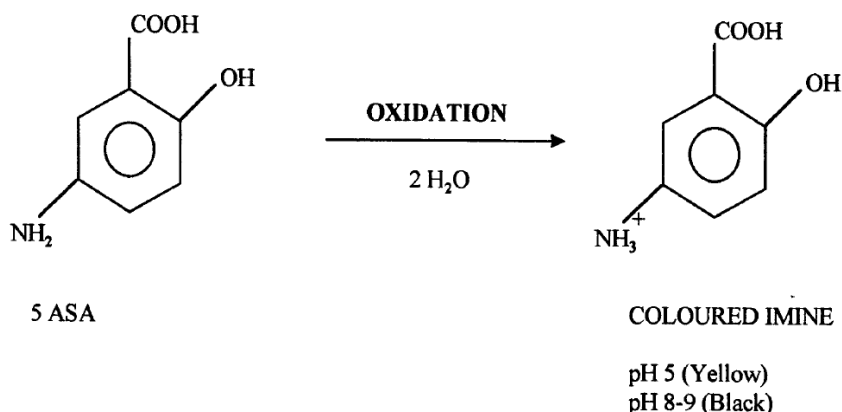


Fonte: Do autor.

Legenda: Em A, solução recém-preparada de mesalazina a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em solução de ácido clorídrico 0,1 M. Em B, comparação entre as soluções em meio ácido (ácido clorídrico) e básico (hidróxido de sódio), respectivamente.

Foi observado que em solução básica o escurecimento é mais pronunciado, o que está de acordo com Zerrouk et al. (1998), que relata que em pH elevado há o aparecimento de imina, de coloração escura, devido à oxidação do 5-ASA, como reproduzido na Figura 5.

Figura 5 - Degradação oxidativa do 5-ASA.



Fonte: ZERROUK et al., 1998.

Após a percepção de que independentemente do solvente utilizado, a solução de 5-ASA escurecia em poucos dias, foi determinado que para a realização dos estudos posteriores, as amostras de 5-ASA deveriam ser sempre preparadas no momento do uso. Porém, a partir da utilização da solução de HCl 0,1 M, a amostra se mantinha límpida e sem a presença de precipitados durante a produção das nanopartículas.

Com isso, foi estipulado que, para a sua solubilização e a produção das nanopartículas por complexação polieletrólítica, o meio que mantinha a estabilidade do 5-ASA por maior tempo, sendo o mais apropriado, era o que possuía ácido clorídrico, no qual o pH esteja menor que 2.

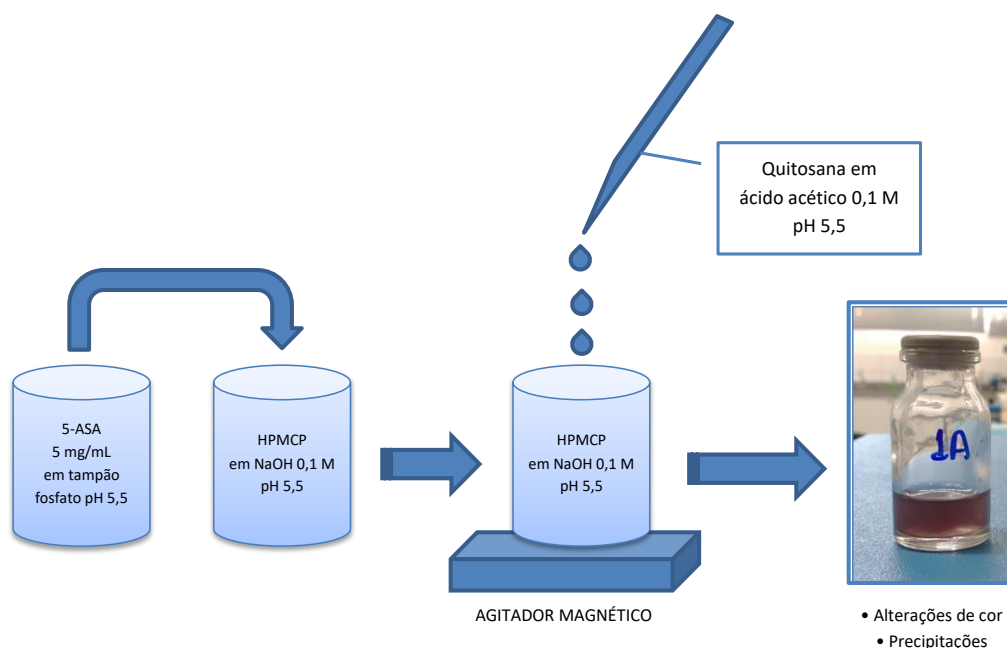
Para determinar em qual das duas dispersões poliméricas (quitosana ou HPMCP) o fármaco deve ser incorporado previamente ao processo de complexação polieletrólítica, foram produzidas suspensões de nanopartículas empregando quitosana de baixa viscosidade (QS) em ácido acético 0,1 M, o HPMCP e o 5-ASA, nas concentrações de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, 4 mg.mL<sup>-1</sup> e 5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, mantendo-se uma relação de massa três vezes superior de quitosana em relação ao HPMCP, conforme descrito na literatura (BARBI, 2011).

Primeiramente foi testada a incorporação do 5-ASA solubilizado em tampão fosfato pH 5,5 na dispersão de HPMCP preparada em NaOH a 0,1M, com pH ajustado para 5,5, conforme Figura 6. A partir dessas soluções, foi efetuado o gotejamento da dispersão de HPMCP contendo o fármaco já disperso sobre a

dispersão de quitosana, visando à produção de nanopartículas com a concentração final de fármaco situada em 5,0% em relação à massa de polímeros adicionada.

As suspensões resultantes apresentaram opalescência, com aparência leitosa de cor esbranquiçada, mas tornavam-se escuras em poucos dias, apresentando cor vinho a preto e sedimentação grosseira. A alteração da cor pode ser devido às reações de oxidação do 5-ASA em meio alcalino, que resulta no surgimento de imina, de cor mais escura (ZERROUK et al., 1998), o que está de acordo com o estudo de solubilização do 5-ASA. Portanto, a solubilização do 5-ASA em meio neutro-alcalino para adicioná-lo na dispersão de HPMCP resulta em nanopartículas com alteração do fármaco. Desta maneira, alterou-se o método de modo que a adição do 5-ASA ocorra na dispersão de quitosana preparada em ácido acético 0,1 M, com a prévia solubilização do fármaco em meio ácido contendo HCl na concentração de 0,1 M.

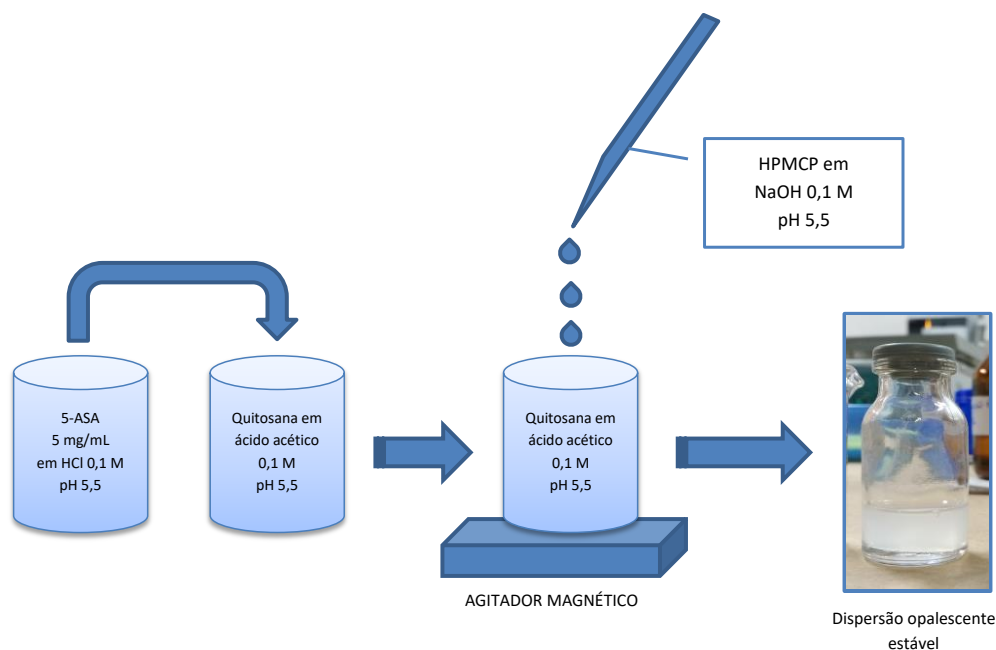
Figura 6 - Formação das NPs de quitosana em tampão fosfato pH 5,5.



Fonte: Do autor.

O pH final da dispersão de quitosana adicionada do fármaco foi posteriormente ajustado para 5,5 e foi gotejada com a dispersão de HPMCP, como indicado na Figura 7. As nanopartículas resultantes tinham aparência bem mais clara e estável que as obtidas no processo anterior.

Figura 7 – Formação de NPs de quitosana em ácido clorídrico 0,1 M.



Fonte: Do autor.

A partir desses resultados, ficou definida a incorporação da 5-ASA na dispersão de quitosana, que por sua vez é gotejada sobre o HPMCP, sob constante agitação.

Tendo definido a melhor maneira de realizar o gotejamento, foi construída uma tabela, na qual é possível identificar as partículas cuja proporção entre polímeros torna possível a produção de suspensões opalescentes, um indicativo de formação das nanopartículas.

Para isso, foi empregada solução de QS e HPMCP, ambas nas concentrações de 0,1 e 0,5%, com a consequente produção de partículas sem fármaco.

Mediante gotejamento, a solução de HPMCP foi titulada sobre a dispersão de QS, com o uso de uma seringa com agulha descartável e agitação magnética constante.

As suspensões de partículas foram preparadas com diferentes volumes de HPMCP, gotejados sobre a dispersão de quitosana. Com isso, foram preparadas 22 amostras, visualmente classificadas como dispersões transparentes (DT), opalescentes (DO) ou agregados (A), como demonstrado na Figura 6. A classificação visual das amostras está indicada na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação visual em dispersões transparentes (DT), opalescentes (DO) ou agregados (A) das amostras de partículas produzidas.

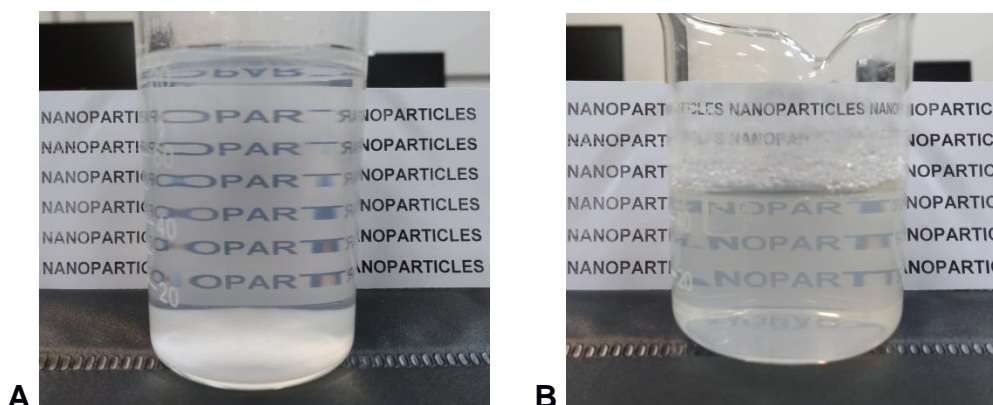
Amostra	Razão QS/HPMCP	Classificação visual
NP1	16:1	DO*
NP2	8:1	DO*
NP3	4:1	DO*
NP4	3:1	DO
NP5	3:1	DO
NP6	3:1	DO
NP7	3:1	DO
NP8	3:1	DO
NP9	3:1	DO
NP10	2:1	DO**
NP11	1:1	DT
NP12	3,2:1	DO*
NP13	1,6:1	DO*
NP14	0,8:1	DT*
NP15	0,4:1	DT*
NP16	0,2:1	A
NP17	80:1	DO
NP18	40:1	DO
NP19	30:1	DO
NP20	20:1	DO
NP21	10:1	DO*
NP22	5:1	A

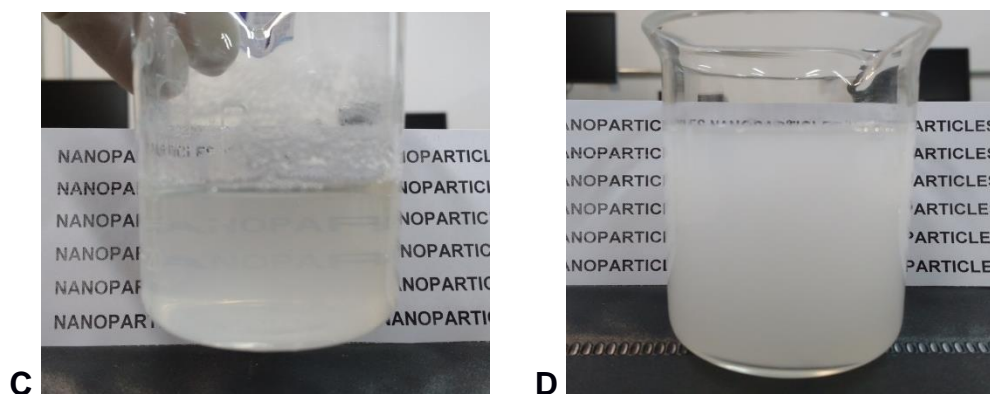
Fonte: Do autor.

\* Nota: Presença de sedimentação grosseira. \*\* Sedimentação discreta e fina.

A Figura 8 ilustra as diferenças visuais de opalescência entre as amostras produzidas.

Figura 8 – Suspensões de nanopartículas produzidas por reticulação polieletrólítica





Legenda: Em A, amostra de partículas classificada como dispersão transparente, inclusive com presença de sedimentação. Em B e C, amostras classificadas como dispersão opalescente, apesar da diferença no grau da opalescência. Em D, amostra totalmente opaca, característica de uma amostra agregada.

Fonte: Do autor.

As amostras que resultaram em dispersão opalescente foram a NP4 a 9 e NP18 a  $\mu$ Os resultados de diâmetro médio, PDI e potencial zeta estão dispostos na Tabela 3. A partir desses resultados, foi possível compreender que com altas proporções de QS em relação ao HPMCP, o PDI fica aumentado, o que se deve ao fato de que parte da QS utilizada pode não ter interagido com o HPMCP gotejado na amostra. Com isso, decidiu-se por empregar uma menor concentração e proporção na produção das novas amostras.

Tabela 3 – Concentração e proporção dos polímeros empregados, tamanho, PDI e potencial zeta das suspensões de nanopartículas sem fármaco.

Amostras	Proporção polimérica	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NP4	3:1	299,8	0,148	24,4
NP5	3:1	340,0	0,199	22,5
NP6	3:1	395,3	0,207	23,5
NP7	3:1	419,8	0,232	21,9
NP8	3:1	491,0	0,264	23,2
NP9	3:1	583,3	0,315	23,2
NP18	40:1	483,4	0,667	-
NP19	30:1	480,3	0,706	-
NP20	20:1	498,7	0,641	-

Fonte: Do autor.

Com isso, as amostras que resultam em NPs com melhor PDI foram as NPs de 4 a 9.

Foram produzidas nanopartículas contendo 5,0% de fármaco, em relação à concentração utilizada dos polímeros, para a NP8. Seu diâmetro médio, PDI e potencial zeta foram respectivamente 532,8 nm, 0,289 e 25,7 mV.

É possível constatar que com a utilização do fármaco, houve um ligeiro aumento no tamanho, PDI e potencial zeta em relação à amostra sem fármaco.

## 5.2 Metodologia analítica para análise de 5-ASA por CLAE

Foram determinados dois valores de pH para construção das curvas de calibração para a análise do fármaco contido nas partículas produzidas. Foi estabelecido pH 5,5 como o pH mais favorável à produção das nanopartículas, enquanto que o pH 6,6 foi estabelecido como o pH necessário à realização dos ensaios de liberação.

Dessa forma, foram preparadas soluções com concentração conhecida de fármaco e que posteriormente foram injetadas no sistema CLAE para quantificação.

Nas tabelas 4 e 5, encontram-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada concentração preparada para a obtenção das curvas no pH 5,5 e 6,6, respectivamente.

Tabela 4 – Dados de área do pico cromatográfico, desvio padrão e coeficiente de variação das amostras das soluções de trabalho em tampão fosfato quantificadas em CLAE no pH 5,5

5-ASA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média	DP	CV (%)
1,0	12.603,00	600,25	4,76
2,5	41.998,00	210,29	0,50
5,0	97.642,33	227,29	0,23
10,0	203.656,33	747,20	0,37
20,0	436.739,67	4.177,86	0,96
40,0	858.173,33	3.371,36	0,39
50,0	1.077.369,00	5.135,33	0,48

Fonte: Do autor.

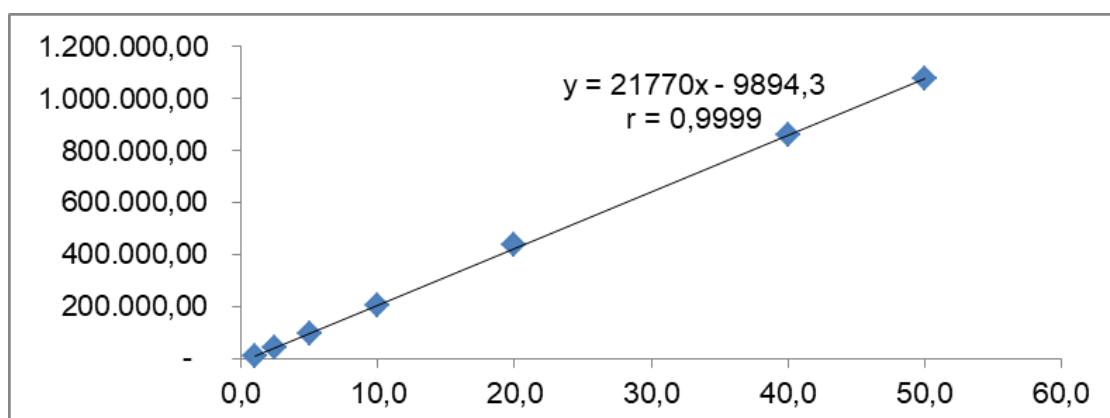
Tabela 5 – Dados de área do pico cromatográfico, desvio padrão e coeficiente de variação das amostras das soluções de trabalho preparadas em tampão fosfato quantificadas por CLAE no pH 6,6

5-ASA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Área média	DP	CV (%)
1,0	21.617,67	1.478,02	6,84
2,5	64.049,33	708,42	1,11
5,0	134.040,67	721,01	0,54
10,0	272.160,67	463,47	0,17
20,0	560.437,00	5.598,22	1,00
40,0	1.088.322,00	3.118,21	0,29
50,0	1.361.994,67	11.384,19	0,84

Fonte: Do autor.

Na Figura 9 encontra-se a curva de calibração e a regressão linear em pH 5,5, cuja inclinação da curva possui desvio padrão de 44,93, e coeficiente de variação de 0,21%, e o y-intercepto possui desvio padrão de 203,14, e coeficiente de variação de 2,05%, com o coeficiente de correlação r superior a 0,99.

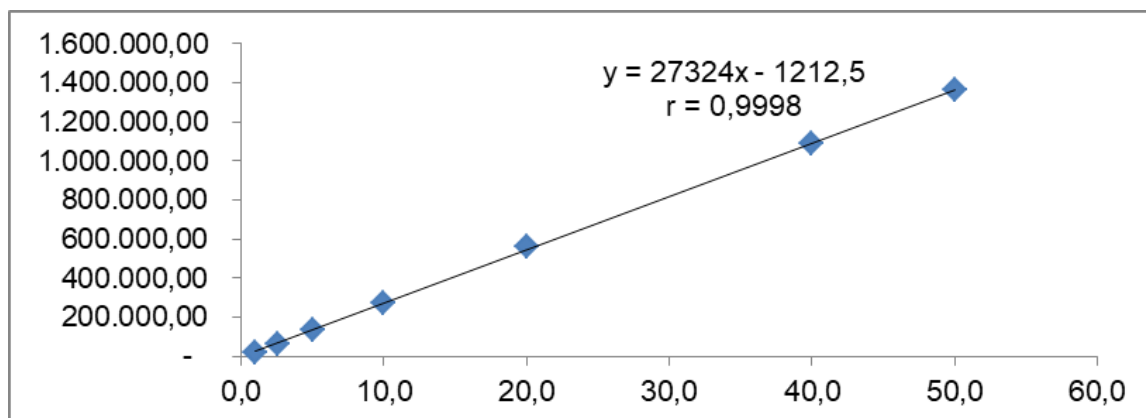
Figura 9 – Curva de Calibração da análise de 5-ASA em pH = 5,5 por CLAE, em mistura de tampão fosfato e metanol, na proporção 90:10.



Fonte: Do autor.

Já na Figura 10, encontra-se a curva de calibração e a regressão linear do pH 6,6, cuja inclinação da curva possui desvio padrão de 164,78, e coeficiente de variação de 0,60%, e o y-intercepto possui desvio padrão de 92,65, e coeficiente de variação de 7,64%, com coeficiente de correlação r superior a 0,99.

Figura 10 – Curva de Calibração da análise de 5-ASA em pH 6,6 por CLAE, em mistura de tampão fosfato e metanol, na proporção 90:10.



Fonte: Do autor.

Foram determinadas a precisão intra e inter-dia. Ambas foram determinadas pela análise de três concentrações variadas (2,5, 10,0 e 50,0 µg/mL) em um mesmo dia ou dias distintos, respectivamente. Os resultados estão nas tabelas 6 e 7.

A partir desses dados, foi possível calcular seu desvio padrão e coeficiente de variação para  $n=3$ , determinando assim o índice de recuperação ou exatidão do ensaio, com valor médio de 97,78% para o ensaio intra-dia e 97,81% para o ensaio inter-dia no pH 5,5, e 98,46% para o ensaio intra-dia e 97,90% para o ensaio inter-dia no pH 6,6.

Inclusive, foram determinados os limites de detecção e quantificação para o fármaco analisado, e os limites constatados foram de 0,027994 e 0,0993313 µg.mL<sup>-1</sup> no pH 5,5 e de 0,010172 e 0,033908 µg.mL<sup>-1</sup> no pH 6,6, demonstrando a alta sensibilidade e repetibilidade do sistema de cromatografia utilizado.

Tabela 6 - Ensaio de precisão intra-dia e inter-dia no pH 5,5 ( $n=3$ )

(continua)

	5-ASA (µg.mL <sup>-1</sup> )	Média	DP	CV
INTRA	2,5	41.998,00	210,29	0,50%
	10,0	97.642,33	227,29	0,23%
	50,0	203.656,33	747,20	0,37%

Tabela 6 - Ensaio de precisão intra-dia e inter-dia no pH 5,5 (n=3)

(conclusão)				
	5-ASA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média	DP	CV
<b>INTER</b>	2,5	41.035,33	202,18	0,49%
	10,0	205.945,00	223,24	0,11%
	50,0	1.086.260,00	3.311,29	0,30%

Fonte: Do autor.

Tabela 7 - Ensaio de precisão intra-dia e inter-dia no pH 6,6 (n=3)

	5-ASA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média	DP	CV
<b>INTRA</b>	2,5	64.049,33	708,42	1,11%
	10,0	272.160,67	463,47	0,17%
	50,0	1.361.994,67	11.384,19	0,84%
<b>INTER</b>	2,5	58.840,00	211,80	0,36%
	10,0	290.440,67	2.654,63	0,91%
	50,0	1.352.149,00	6.173,05	0,46%

Fonte: Do autor.

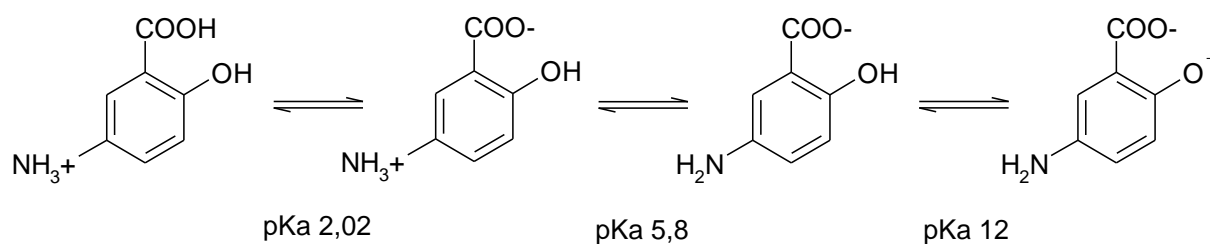
### 5.3 Análise de eficiência de incorporação das NPs produzidas por complexação polieletrólítica

Para a determinação da EI% foi preparada a NP4, contendo 5-ASA na proporção 5,0% em relação à massa polimérica.

As NPs foram centrifugadas para quantificação do fármaco presente no sobrenadante. Porém, ao observar a formação de precipitado nas amostras, foi constatada a presença de partículas enegrecidas, o que sugere que houve precipitação do 5-ASA durante o processo de complexação polieletrólítica.

Este resultado pode ser devido ao pH necessário para a reticulação entre a QS e o HPMCP ser igual a 5,5, dentro da faixa em que ambos os polímeros estão ionizados, mas que, por outro lado, é um pH no qual o 5-ASA encontra-se em sua forma zwitteriônica (Figura 11), contribuindo para sua precipitação.

Figura 11 – Representação do processo de ionização do 5-ASA.



Fonte: Adaptado de Zerrouk et al, 1998.

Nanopartículas sem fármaco foram produzidas com sucesso usando o método da complexação polieletrólítica entre quitosana e HPMCP, resultando em uma dispersão opalescente homogênea de nanopartículas com diâmetro médio de 491 nm, Pdl 0,26 e potencial zeta de + 23,2.

Contudo, nanopartículas carregadas com 5-ASA resultaram em uma dispersão turva, na qual era possível visualizar partículas suspensas de coloração acastanhada, diferente das nanopartículas não carregadas, sugerindo precipitação do fármaco.

Amostras com fármaco foram centrifugadas para determinação da eficiência de incorporação e o 5-ASA não foi detectado no sobrenadante, o que, em um primeiro momento poderia sugerir todo o fármaco estava reticulado nas nanopartículas, mas que por outro lado, poderia significar que o fármaco pode não ter sido detectado uma vez que ele poderia ter sido completamente precipitado.

Anteriormente à reação de complexação polieletrólítica, a dispersão de quitosana que continha o fármaco estava completamente límpida, com as partículas de coloração marrom aparecendo após a complexação. Sabe-se que o 5-ASA pode existir sob diferentes formas iônicas, dependendo do pH da solução. Com pKa menor que 2,02 o fármaco é catiônico, entre 2,02 e 5,8 é zwitteriônico e acima de 12 apresenta características aniônicas. O pH das suspensões de nanopartículas era 5,5, na qual a forma zwitteriônica é predominante e pode ser menos solúvel que as formas iônicas.

Dessa forma, esses achados indicam que a complexação polieletrólítica para a reticulação de 5-ASA não é o método mais indicado, já que depende da solubilidade do fármaco e as condições necessárias para os polímeros levam à precipitação do fármaco.

#### 5.4 Método da reticulação química da quitosana com genipin

O resultado da reticulação química entre quitosana e genipin contendo o fármaco resultou em uma dispersão opalescente de coloração enegrecida. As dispersões resultantes foram produzidas utilizando ambos os métodos de agitação empregados. A opalescência pode indicar a formação de nanopartículas ou de uma dispersão coloidal, mas a coloração pode ser um problema. Um mecanismo de degradação do 5-ASA parece ser dependente da produção de uma amina colorida de cor enegrecida (ZERROUK et al., 1998). O fármaco também é sensível à luz, o que pode leva-lo à oxidação, apesar de todos os experimentos foram realizados em sala escura ou sob a luz UV. Contudo, as condições encontradas durante este método parecem ter contribuído para a degradação do fármaco, não sendo indicada à reticulação do fármaco.

#### 5.5 Método da emulsificação A/O seguida por reticulação da quitosana com genipin

Neste método, o parâmetro variável foi o processo de agitação – magnética por longo tempo e alta velocidade (ultra-turrax) por curto tempo. Tanto as partículas não carregadas quanto as carregadas com a mesalazina apresentaram-se com formato quase esférico e de coloração azulada, conforme Figura 12.

Figura 12 - Imagem de microscopia ótica das partículas de quitosana produzidas por emulsificação água em óleo seguida por reticulação química da quitosana com genipin.



Fonte: Do autor.

Legenda: À esquerda, reticulação sob agitação magnética de 3 h. À direita, reticulação sob agitação com ultra-turrax por 5 min.

Esses resultados estão de acordo com Moura, Martins e Duarte (2015) que atribui esta coloração à formação das partículas reticuladas por reação de polimerização do genipin e em seguida, pela sua reação com os grupamentos amino da quitosana.

## 5.6 Análise de rendimento das partículas

A Tabela 8 resume as características de tamanho, Pdl, potencial zeta e rendimento das partículas preparadas pelos diferentes métodos.

Tabela 8 - Dados de tamanho, Pdl, potencial zeta e rendimento para as partículas preparadas.

	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	Rendimento (% m/v)
PEC	532 ± 45	0,29 ± 0,2	25,7 ± 2,3	*
Não carregadas PEC	491 ± 83	0,26 ± 0,1	23,2 ± 1,2	*
Chem-Mag	724 ± 209	0,36 ± 0,1	59,1 ± 1,7	*
Chem-UT	854 ± 121	0,63 ± 0,1	59,0 ± 2,5	*
Emul-Mag	2692 ± 717	0,58 ± 0,1	46,0 ± 5,4	47,21 ± 0,08
Emul-UT	537 ± 169	0,57 ± 0,1	43,3 ± 1,5	58,40 ± 4,62

Fonte: Do autor.

Nota: \* valor não determinado

O rendimento encontrado demonstra que a agitação por ultra-turrax foi ligeiramente mais efetiva nas partículas carregadas com fármaco, o que sugere que a intensidade da agitação parece ser mais importante que o tempo de agitação, uma vez que o tempo de agitação com o ultra-turrax foi de 5 minutos, em comparação com o da agitação magnética (3 h).

Entretanto, os valores encontrados (em torno de 50%) podem ser considerados satisfatórios, considerando a impossibilidade de reticulação do 5-ASA usando tanto a reação polieletrólítica quanto a reticulação química.

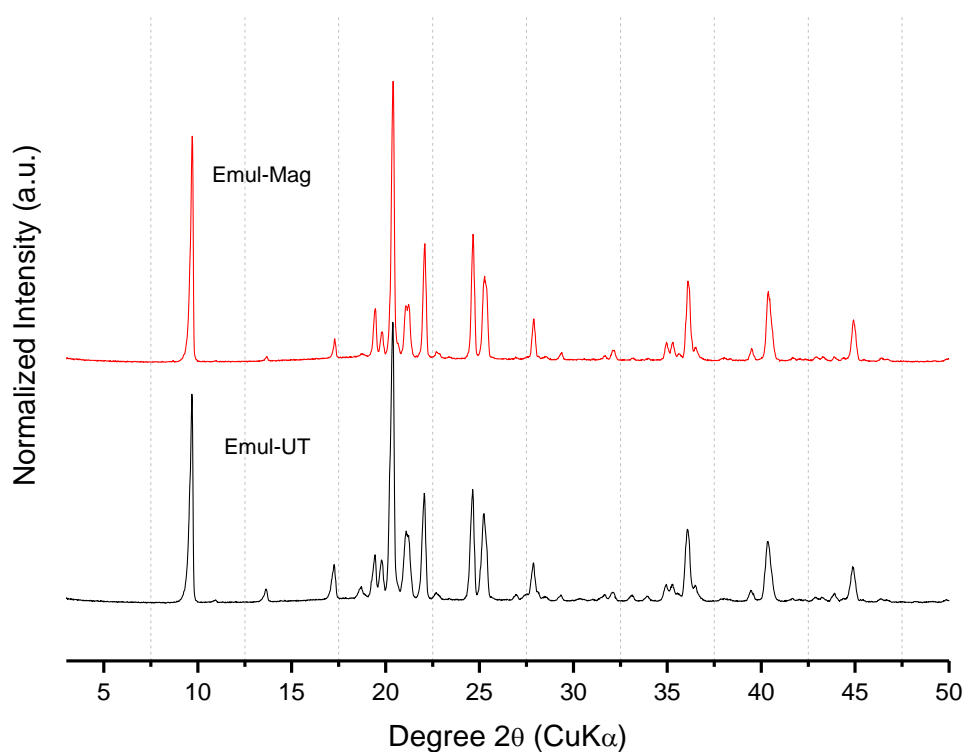
Importante destacar que a incorporação do 5-ASA é limitada à sua solubilidade em ácido clorídrico, determinada experimentalmente em 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Uma vez que o valor solubilizado do fármaco era de 5 mg.mL<sup>-1</sup> na fase aquosa interna da emulsão, a quantidade máxima de 5-ASA com possibilidade para incorporação no sistema estava definida para o método empregado.

## 5.7 Difração de raios-X por pó (DRXP)

As análises de difração de raios-X por pó (DRXP) foram realizadas para caracterizar o material policristalino inicial e o obtido após o processo de reticulação.

A Figura 13 mostra os difratogramas gerados experimentalmente a partir das amostras Emul-Mag e Emul-UT não carregadas. É possível observar que os sistemas são materiais cristalinos, pois apresentaram picos de difração em diferentes ângulos. Quando os picos de Bragg são comparados, podemos verificar que as diferentes agitações empregadas não geraram materiais cristalinos diferentes porque os picos de Bragg verificados aparecem em ângulos coincidentes.

Figura 13 - Difratograma experimental gerado para as amostras Emul-Mag e Emul-UT não carregadas.

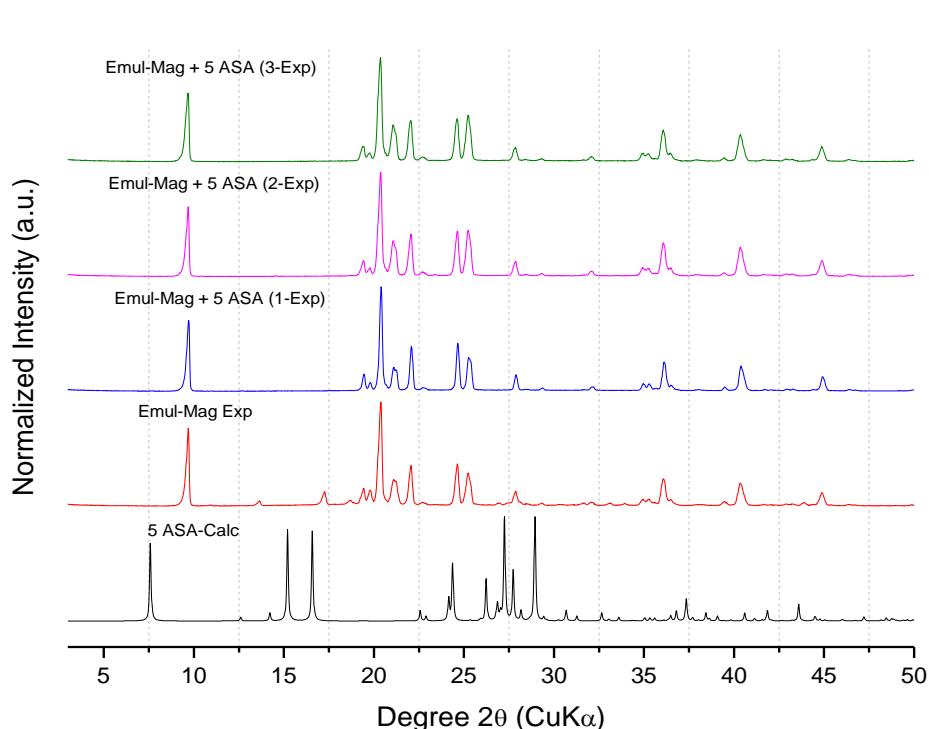


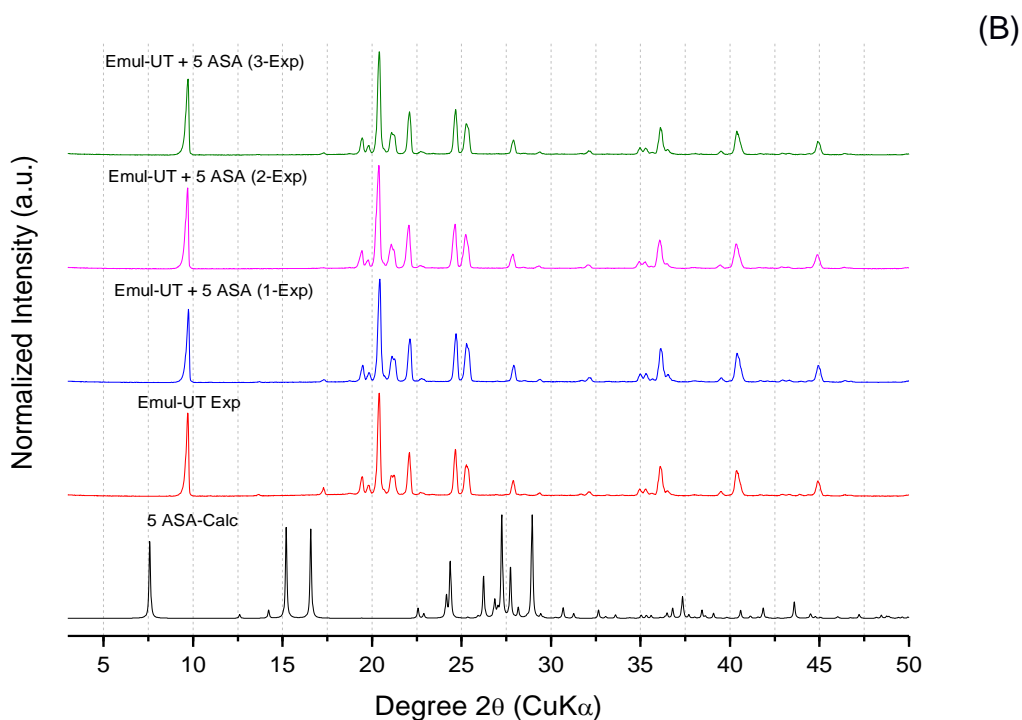
Fonte: Do autor.

As amostras Emul-UT e Emul-Mag contendo o 5-ASA também foram analisadas por DRXP em triplicata. Como é possível ver na Figura 14, os difratogramas experimentais gerados foram comparados com os difratogramas experimentais das mesmas amostras não carregadas e também com o difratograma calculado a partir do CCDC CODE: SAQJAV02 encontrado no banco de dados de

estruturas cristalinas para orgânicos (CCDC-CSD) para a base livre de 5-ASA. Os difratogramas mostram que os picos de Bragg gerados para as amostras carregadas e não carregadas são coincidentes e não é possível identificar picos de Bragg em ângulos coincidentes ao difratograma calculado da base livre de 5-ASA. Com estes resultados podemos sugerir que o 5-ASA pode ter sido totalmente incorporado ao sistema, ou por outro lado, como a massa incorporada de 5-ASA é inferior ou igual a 5% em relação ao peso total da amostra, a técnica de DRXP pode não ter sido capaz de identificar a fase do fármaco na amostra. Resultado semelhante foi encontrado em Nunes, Mahendrasingam e Suryanarayanan (2005) e em Varasteh et al.(2009). Além disso, estes resultados mostram que não houve diferença entre os dois tipos de agitação para os materiais cristalinos obtidos.

Figura 14 - Difratogramas experimentais das amostras carregadas e não carregadas Emul-Mag (a) e Emul-UT (b) comparados ao difratograma calculado do fármaco 5-ASA livre



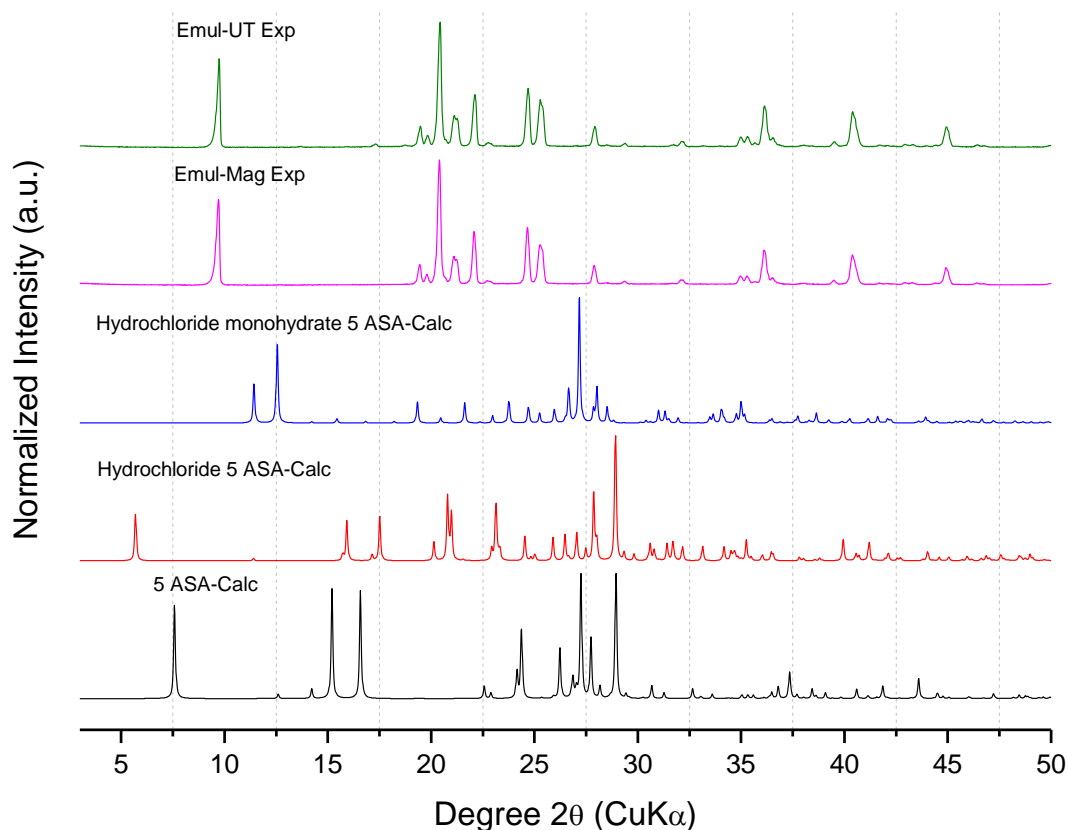


Fonte: Do autor.

Nota: O difratograma calculado do 5-ASA em ambas as imagens corresponde ao CCDC CODE: SAQJAV02.

Os difratogramas experimentais das amostras preparadas por agitação magnética e ultra-turrax com o fármaco incorporado foram comparados aos difratogramas calculados a partir dos CCDC CODE: SAQJAV02; SAQJEZ; PUVMAU, correspondentes à base livre de 5-ASA, cloridrato de mesalazina e o cloridrato monoidratado de mesalazina respectivamente (BANIĆ-TOMIŠIĆ; KOJIĆ-PRODIĆ; ŠIROLA, 1997; CHERUKUVADA et al., 2013; DOBSON; GERKIN, 1998). Esta comparação foi realizada para verificar se houve transição de fase cristalina do fármaco incorporado ao material. Na Figura 15 pode ser notado que não foi possível identificar picos de Bragg nas amostras em ângulos correspondentes às formas cristalinas existentes para a mesalazina, demonstrando que não houve transição de fase e o material obtido pode ser uma nova forma cristalina ou mistura de fases. Para informações conclusivas sobre esta nova fase cristalina, mais estudos seriam necessários.

Figura 15 - Difratomogramas experimentais para Emul-Mag e Emul-UT carregadas com 5-ASA comparados com os difratogramas experimental e calculado da 5-ASA livre, cloridrato de mesalazina e cloridrato monoidratado de mesalazina.



Fonte: Do autor.

Nota: Os difratogramas para o 5-ASA calculado, o cloridrato e o cloridrato monoidratado correspondem sequencialmente ao CCDC CODE SAQJAV02; SAQJEZ; PUVMAU.

## 5.8 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

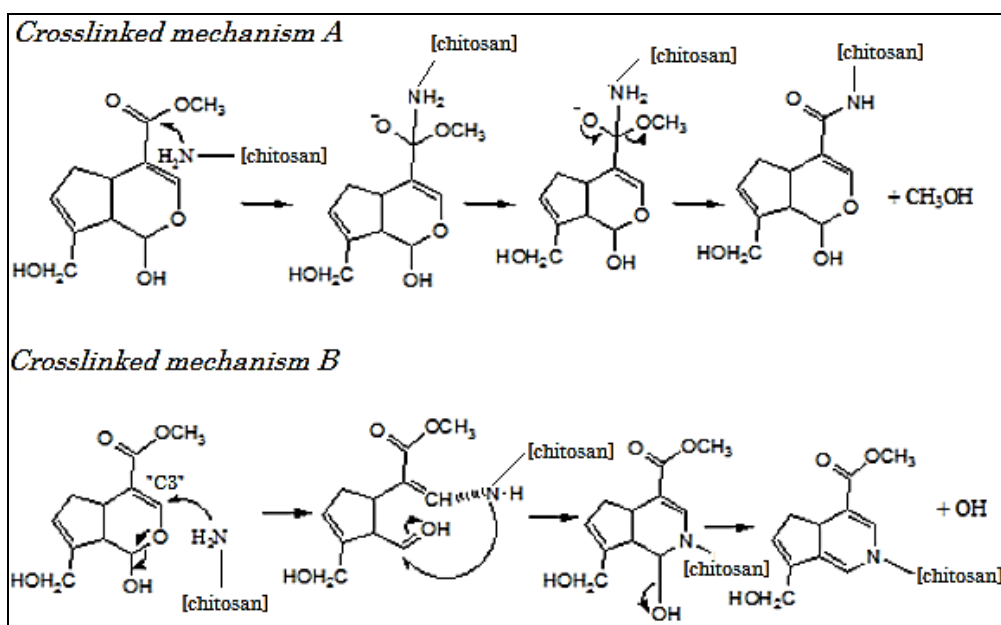
As análises de infravermelho corroboram com os resultados de DRXP na caracterização dos sistemas. É possível verificar nas análises de IV que as bandas e estiramentos característicos da quitosana (BRUGNEROTTO et al., 2001), material em maior quantidade na amostra estão presentes e também comprova a reticulação com o genipin, conforme as Figuras 7 e 8.

A literatura propõe dois mecanismos distintos para que ocorra a reticulação entre a quitosana e o genipin. Um dos mecanismos (mecanismo A) baseia-se em uma reação mais lenta em que ocorre a substituição nucleofílica, a qual envolve um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do genipin ocorrendo uma

substituição deste grupo por uma amida secundária com a liberação de metanol (Figura 6).

A segunda proposta (mecanismo B) está relacionada a reação em que acontece um ataque nucleofílico da amina primária no carbono "C<sub>3</sub>" do genipin formando um aldeído intermediário. Com isto, há uma abertura do anel heterocíclico do genipin, que é atacado pelo grupo da amina secundária, formando um composto heterocíclico ligado ao grupo amina, conforme Figura 16 (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003).

Figura 16 - Esquema dos mecanismos propostos para a reticulação entre quitosana e genipin.

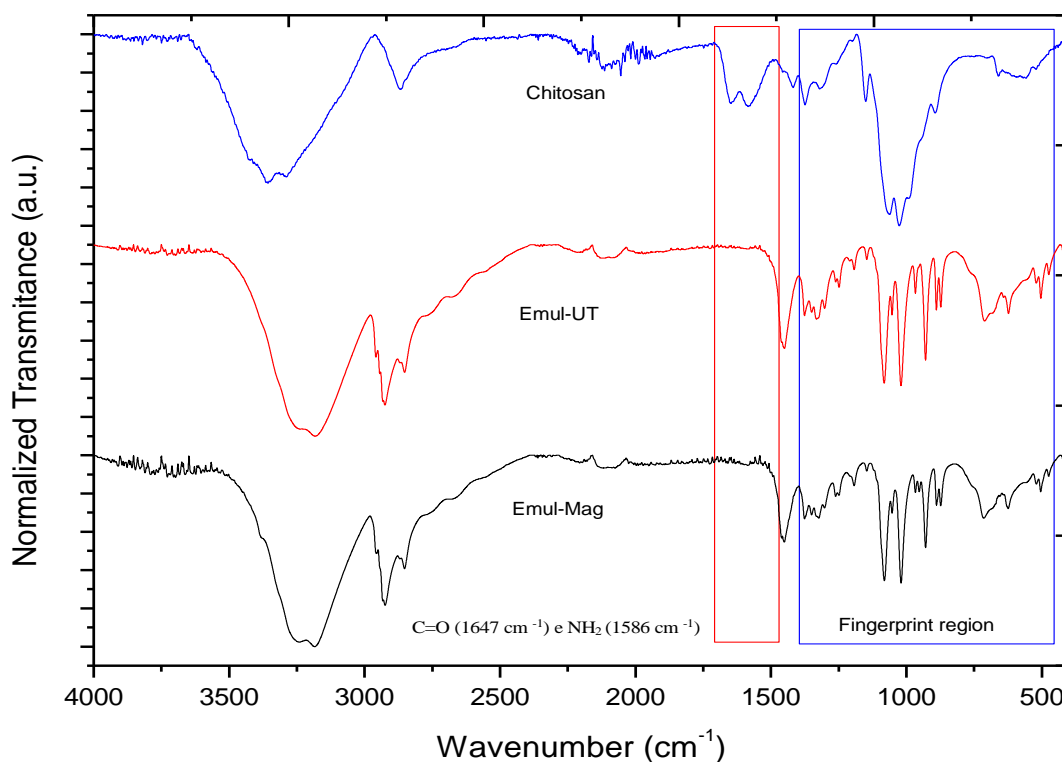


Fonte: BUTLER, NG e PUDNEY, 2003.

Com os espectros de IV obtidos para a quitosana pura e depois reticulada com o genipin que são mostrados na Figura 17, pode-se ver nos espectros que provavelmente a reticulação ocorreu de acordo com o que foi proposto no mecanismo de reação B, haja vista que para que houvesse ocorrido a reação proposta pelo mecanismo A, bandas características de amidas ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; MOURA; MARTINS; DUARTE, 2015) deveriam estar presentes nos espectros do material reticulado, o que não acontece neste caso. Já o que foi proposto pela reação do mecanismo B apresentaram algumas evidências nos espectros de IV do material reticulado. Pode-se verificar que as de C=O ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ) e NH<sub>2</sub> ( $1586\text{ cm}^{-1}$ ) presentes no espectro da quitosana pura já não

são observadas nos espectros dos materiais reticulados. O desaparecimento destas bandas características da quitosana indicam que houve o ataque do grupo amino dela ao “C<sub>3</sub>” do genipin gerando o grupo heterocíclico com a presença de uma amina terciária nele. E o que também corrobora de que a reticulação ocorreu é a mudança na região de impressão digital da molécula quando são comparados os espectros da quitosana com os materiais reticulados. É importante também ressaltar que os procedimentos de agitação empregados não diferenciaram os materiais reticulados formados (FIGURA 9).

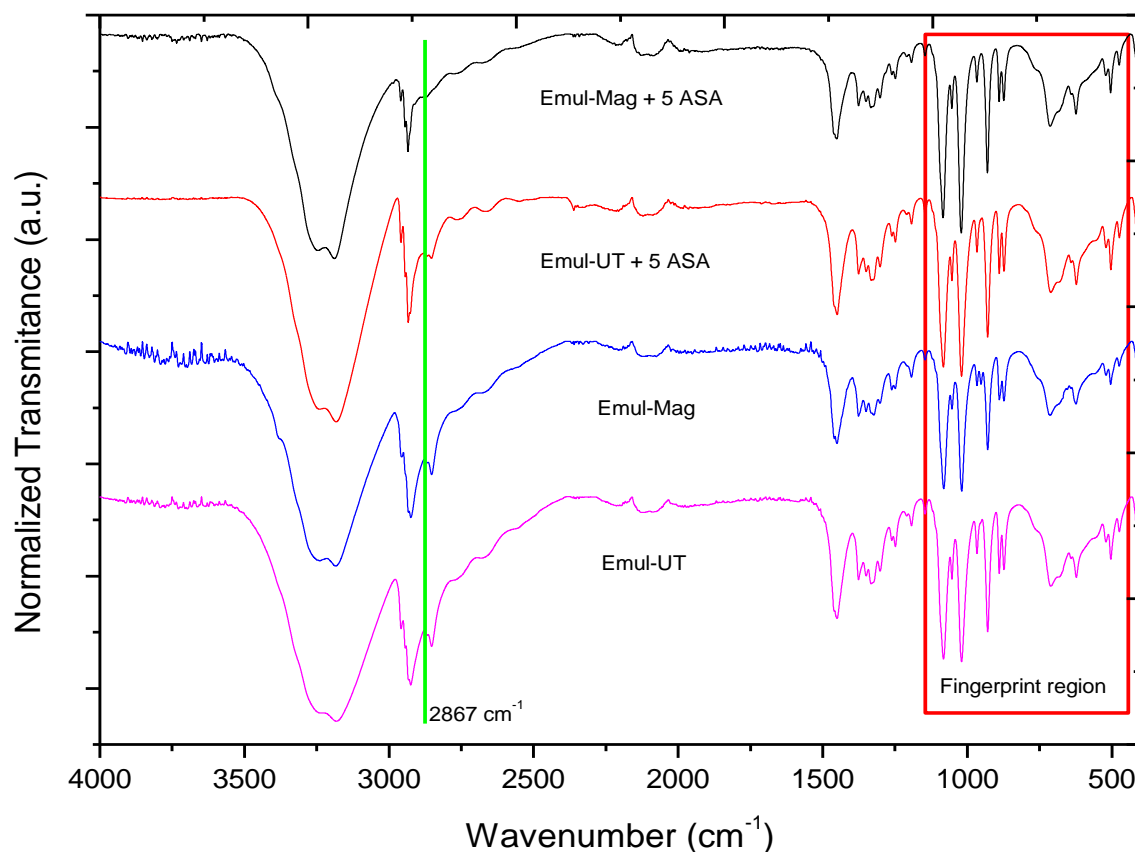
Figura 17 - Espectros de IV da quitosana, Emul-UT e Emul-Mag.



Fonte: Do autor.

Na Figura 18 é possível visualizar a região de impressão digital da molécula, que não se diferenciou tanto entre as amostras não carregadas Emul-UT e Emul-Mag como as carregadas com 5-ASA, destacado em vermelho. Segundo Desbrie et al. (2001), a banda presente em torno de 2867 cm<sup>-1</sup> que pode ser vista no espectro de IV das amostras, destacada pela linha verde, e a ausência de bandas em torno de 1560 cm<sup>-1</sup> também verificada no espectro indicam a baixa acetilação da quitosana, mesmo em presença de outros materiais (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Figura 18 - Espectros de IV das amostras Emul-Mag e Emul-UT não carregadas e carregadas com 5-ASA.



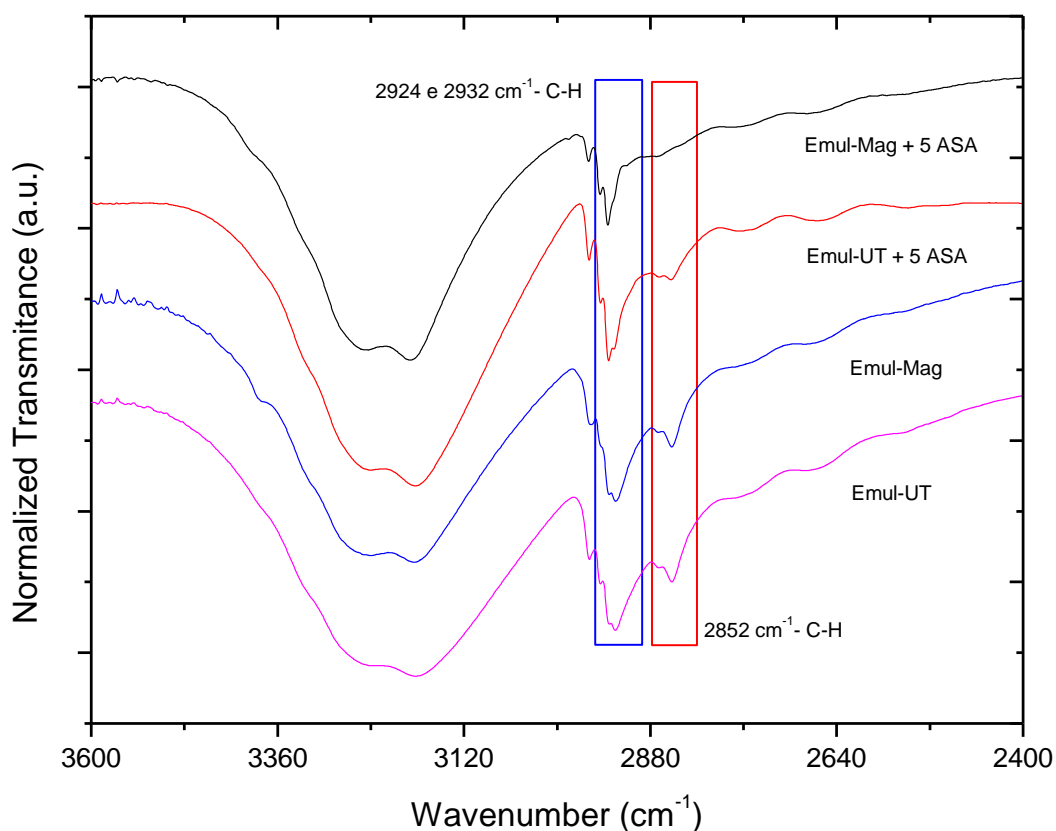
Fonte: Do autor.

Nota: Em destaque a região de impressão digital da quitosana (vermelho) e a banda em torno de 2867 cm<sup>-1</sup> (verde).

O espectro FTIR na Figura 19 mostra o provável ponto de interação molecular entre o 5-ASA e a quitosana. É possível ver a atenuação da banda em torno de 2852 cm<sup>-1</sup> para as amostras carregadas com 5-ASA, destacada em vermelho, e a inversão da intensidade das bandas presentes em 2924 e 2932 cm<sup>-1</sup>, em azul. É importante ressaltar que não houve diferença entre os processos de agitação, uma vez que a atenuação e inversão ocorreram para os dois tipos de agitações empregadas.

Para demonstrar a provável interação existente no sítio de (C sp) da quitosana, os espectros das amostras não carregadas foram comparados com as amostras carregadas com 5-ASA. Os cálculos de intensidade relativa para as bandas de C-H a partir da banda de maior intensidade (em torno de 3177 cm<sup>-1</sup>) foram feitos para comprovar esta possível interação molecular, como pode ser visto na Tabela 9.

Figura 19 - Espectros FTIR das amostras Emul-Mag e Emul-UT, não carregadas e carregadas



Fonte: Do autor.

Nota: Destaca-se as bandas C-H em  $2852\text{ cm}^{-1}$  (em vermelho) e as bandas em torno de  $2924$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$  (em azul).

Através dos cálculos foi possível verificar que a banda em torno de  $2852\text{ cm}^{-1}$  para a Emul-UT carregada atenuou em 39,59% em relação à não carregada. Quando comparada as intensidades relativas das bandas em torno de  $2924$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$  a atenuação foi de 31,78 e 26,10% respectivamente.

É importante destacar que além da atenuação de banda, estas também sofreram inversão de intensidade. A amostra Emul-UT não carregada apresentou as seguintes intensidades relativas 83,33 e 81,30% para as bandas presentes em torno de  $2924$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Para Emul-UT carregada, as intensidades relativas se invertem, sendo que, em torno de  $2932\text{ cm}^{-1}$  ela passa a ser maior (55,20%) do que a calculada para a banda presente em torno de  $2932\text{ cm}^{-1}$  (51,55%).

Tabela 9 - Cálculos das intensidades relativas das bandas em torno de 2852, 2924 e 2932  $\text{cm}^{-1}$  das amostras Emul-UT e Emul-Mag não carregadas e carregadas com 5-ASA.

Emul-UT			Emul-UT +5-ASA		
Intensidade	$\text{cm}^{-1}$	Intensidade relativa (%)	Intensidade	$\text{cm}^{-1}$	Intensidade relativa (%)
88,01	3177	100,00	74,95	3177	100,00
59,35	2852	67,44	20,87	2852	27,85
73,34	2924	83,33	38,64	2924	51,55
71,55	2932	81,30	41,37	2932	55,20

Emul-Mag			Emul-Mag +5-ASA		
Intensidade	$\text{cm}^{-1}$	Intensidade relativa (%)	Intensidade	$\text{cm}^{-1}$	Intensidade relativa (%)
56,35	3177	100,00	49,55	3177	100,00
33,97	2852	60,28	14,65	2852	29,57
44,12	2924	78,30	22,00	2924	44,40
42,91	2932	76,15	25,87	2932	52,21

Fonte: Do autor.

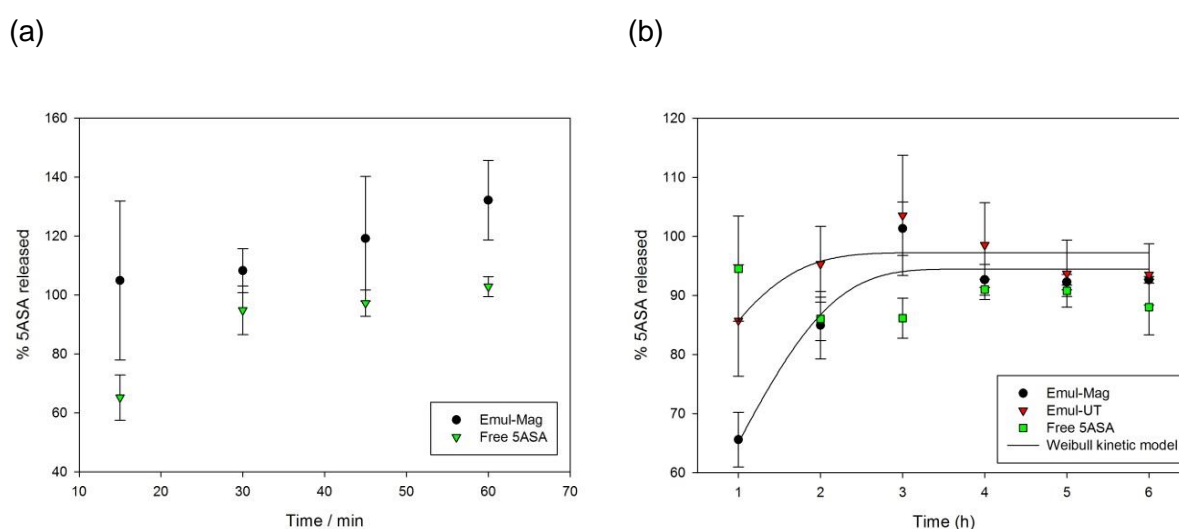
O mesmo resultado foi observado para a amostra Emul-Mag carregada com 5-ASA, com algumas diferenças nas intensidades relativas calculadas. A atenuação da banda em torno de 2852  $\text{cm}^{-1}$  foi de 30,71% e em 2924 e 2932  $\text{cm}^{-1}$  foi de 33,90 e 23,94% respectivamente. Além da atenuação das bandas (2924 e 2932  $\text{cm}^{-1}$ ), a inversão também foi verificada. Emul-Mag não carregada apresentou intensidades relativas para estas bandas em torno de 78,30 e 76,15% respectivamente, mas quando o fármaco é incorporado, verifica-se a inversão de intensidades relativas para elas. A intensidade relativa calculada para a banda em torno de 2924  $\text{cm}^{-1}$  foi de 44,40%, menor do que a encontrada para a banda em torno de 2932  $\text{cm}^{-1}$  (52,21%).

Estes resultados demonstram que, possivelmente, a interação entre fármaco 5-ASA e a quitosana pode estar ocorrendo no sítio (C sp) da molécula de quitosana.

## 5.9 Liberação *in vitro* do fármaco

A quantidade de 5-ASA liberada expressa em porcentagem está demonstrada em razão do tempo na Figura 20. Pode ser visto que o 5-ASA foi totalmente liberado a partir das micropartículas em meio ácido. Este resultado mostra que a reticulação covalente pode não ser eficaz na promoção da gastrorresistência. Para a liberação em meio colônico, as partículas produzidas aqui devem ser encapsuladas em uma cápsula gastrorresistente, mas um revestimento polimérico de gastrorresistência pode ser testado.

Figura 20 - Perfil de liberação de micropartículas Emul-Mag, Emul-UT e 5-ASA livre: (a) fluido gástrico simulado; (b) fluido entérico simulado.



Fonte: Do autor.

O perfil de liberação obtido a partir do pH colônico é mostrado na Figura 12b. Houve uma liberação rápida das amostras 5-ASA livre e Emul-UT e os perfis de liberação estão sobrepostos. Emul-Mag foi mais efetivo no controle da liberação de 5-ASA, já que na primeira 1h havia 60% do fármaco já liberado, enquanto mais de 80% já havia sido liberado de Emul-UT e 5-ASA base livre.

Estruturalmente, Emul-UT e Emul-Mag são iguais. O retardo na liberação inicial de Emul-Mag pode ser atribuído ao tipo e tempo do processo de agitação durante a produção de micropartículas. É sugestivo que a agitação magnética resulta em ligações covalentes mais estáveis entre a quitosana e o genipin, devido

ao tempo mais longo para a reação e uma agitação mais suave, o que retarda a liberação de 5-ASA.

Os perfis obtidos no ensaio de liberação de fármaco foram analisados por modelos matemáticos para identificar os mecanismos envolvidos na liberação de 5-ASA, onde os valores de  $R^2$  são mostrados na tabela abaixo. O modelo de Weibull apresentou o  $R^2$  mais alto e foi usado para discutir os dados. Este modelo expressa a fração acumulada do fármaco em função do tempo, a partir da qual o parâmetro de forma,  $b$ , caracteriza a curva como exponencial ( $b = 1$ ) (Caso 1), sigmoide, em forma de S, com curvatura ascendente seguida de um ponto de declínio ( $b > 1$ ), ou parabólico, com uma inclinação inicial mais alta e depois consistente com o exponencial ( $b < 1$ ) (Caso 3) (COSTA; SOUSA LOBO, 2001).

A Tabela 10 mostra os valores de  $B$  derivados do encaixe do modelo de Weibull para os dados completos da curva de liberação do fármaco. Os valores de  $b$  foram significativamente maiores do que 1, indicando perfil sigmóide. Um perfil sigmoidal de liberação caracterizado por uma liberação mais lenta no estágio inicial (0-1 h) seguido de liberação rápida durante o estágio posterior (3-6 h) pode garantir a liberação direcionada do fármaco para o cólon (ALI ASGHAR et al., 2009).

Tabela 10 - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido dos modelos matemáticos de liberação de fármacos e o parâmetro de forma ( $b$ ) calculado

Modelo cinético	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	
	Emul-Mag	Emul-UT
Ordem zero	0.2641	0.6487
Primeira ordem	0.6330	0.8740
Higushi	0.0000	0.0000
Korsmeyer-Peppas	0.4703	0.7801
Weibull	0.7818	0.9536
$b$	18551.2	23828.4

Fonte: Do autor.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo teve grande importância por demonstrar as limitações do encapsulamento da mesalazina em micro e nanopartículas através de técnicas convencionais como a complexação polieletrólítica da quitosana com um poliânion e a reticulação química da quitosana com genipin. O método bem sucedido foi aquele no qual foi possível proteger o fármaco do meio reativo – emulsificação água/óleo seguida pela reticulação química da quitosana com o genipin.

Foi possível solubilizar o fármaco em um pH apropriado para a estabilidade e proteger o fármaco na fase interna da emulsão, enquanto a reação entre a quitosana e o genipin podia ocorrer na superfície da gotícula. A partir da variação no processo de agitação, foi possível constatar que não houve diferença significativa nas características das partículas, bem como no rendimento percentual, mas a agitação das partículas por longo tempo através da agitação magnética demonstrou ser mais eficiente no prolongamento da liberação do fármaco.

Dessa forma, é possível afirmar que estes achados são de grande importância para apontar um método adequado para a produção de partículas micrométricas para uma potencial liberação colônica do 5-ASA.

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004.
- AGUZZI, C. et al. Assesment of anti-inflammatory properties of microspheres prepared with chitosan and 5-amino salicylic acid over inflamed Caco-2 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 638–644, 2011.
- AHMAD, M. et al. Chitosan centered bionanocomposites for medical specialty and curative applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, p. 200–217, 2017.
- ALI, H. S. M.; HANAFY, A. F.; EL ACHY, S. N. Tailoring the mucoadhesive and sustained release characteristics of mesalamine loaded formulations for local treatment of distal forms of ulcerative colitis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 233–243, 2016.
- ALI ASGHAR, L. F. et al. Design and in vitro evaluation of formulations with pH and transit time controlled sigmoidal release profile for colon-specific delivery. **Drug Delivery**, v. 16, n. 6, p. 295–303, ago. 2009.
- AMIDI, M. et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59–82, 2010.
- BANIĆ-TOMIŠIĆ, Z.; KOJIĆ-PRODIĆ, B.; ŠIROLA, I. Hydrogen bonds in the crystal packings of mesalazine and mesalazine hydrochloride. **Journal of Molecular Structure**, v. 416, n. 1–3, p. 209–220, out. 1997.
- BARBI, M. DA S. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração nasal de zidovudina**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2011.
- BAUTZOVÁ, T. et al. Bioadhesive pellets increase local 5-aminosalicylic acid concentration in experimental colitis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 379–385, 2012.
- BELLÉ, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, v. 246, p. 266–274, 2018.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2018.
- BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan

characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569–3580, 2001.

BUTLER, M. F.; NG, Y.-F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of Polymer Science**, v. 41, n. 24, p. 3941–3953, 2003.

CAPRILLI, R. et al. The long journey of salicylates in ulcerative colitis: The past and the future. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 3, n. 3, p. 149–156, 2009.

CARVALHO, F. C. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 89–100, 2012.

CHERUKUVADA, S. et al. 4 - Aminosalicilyc Acid Adducts. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 4, p. 1551–1557, 2013.

COCO, R. et al. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles : Comparison of different strategies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 1, p. 3–12, 2013.

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

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–133, maio 2001.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3. ed. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2007.

DATE, A. A.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, v. 240, 2016.

DOBSON, A. J.; GERKIN, R. E. 5-ammoniosalicilyc acid chloride monohydrate. **Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications**, v. 54 ( Pt 11, p. 1632–4, nov. 1998.

DU, H. et al. The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 8, p. 1004–1011, 2015.

DUAN, H. et al. Mucoadhesive microparticulates based on polysaccharide for target dual drug delivery of 5-aminosalicylic acid and curcumin to inflamed colon. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 510–519, 2016.

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

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. v. 31, p. 223–246, 1998.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles : Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, p. 675–691, 2017.

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

FANG, L. et al. Micro- and nano-carrier systems: The non-invasive and painless local administration strategies for disease therapy in mucosal tissues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, p. 153–171, 2017.

FERREIRA, A. DE O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

FONSÊCA, G. D. **Micropartículas contendo nanopartículas de quitosana usando sulfato de sódio e genipina para liberação modificada de triancinolona: Obtenção, caracterização e estudo em células tumorais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1–2, p. 34–52, ago. 2011.

FRICIU, M. M. et al. Carboxymethyl starch and lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 521–530, 2013.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2 SPEC. ISS., p. 247–265, 2005.

GAUDIO, C. DEL et al. Natural polymeric microspheres for modulated drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 408–417, 2017.

GONSALVES, A. DE A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

HELMY, A. M. et al. Development and in vivo evaluation of chitosan beads for the colonic delivery of azathioprine for treatment of IBD. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 269–279, 2017.

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

KAKAR, S.; BATRA, D.; SINGH, R. Preparation and evaluation of magnetic microspheres of mesalamine (5-aminosalicylic acid) for colon drug delivery. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 226–231, 2013.

KIILL, C. P. et al. Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1695–1702, 2017.

KOUCHAK, M. Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan Nanoparticles

Containing Diclofenac Using the Ion-Gelation Method. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, v. 10, n. 2, 2015.

KUMAR, G. V.; SU, C. H.; VELUSAMY, P. Ciprofloxacin loaded genipin cross-linked chitosan/heparin nanoparticles for drug delivery application. **Materials Letters**, v. 180, p. 119–122, 2016.

KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–6084, 2004.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. M. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 788–793, 2001.

LAUTENSCHLÄGER, C. et al. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 58–76, 2014.

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

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 256–276, 2016.

MAHAJAN, N. M.; SAKARKAR, D. M.; MANMODE, A. S. Design and development of mesalamine loaded PLGA nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 4, p. 1263–1266, 2011.

MALVIYA, T. et al. Synthesis of Aloe vera-Acrylonitrile based nanoparticles for targeted drug delivery of 5-ASA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 930–939, 2018.

MANSURI, S. et al. Mucoadhesion : A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151–172, 2016.

MEISSNER, Y.; LAMPRECHT, A. Alternative Drug Delivery Approaches for the Therapy of Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2878–2891, 2008.

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

MOULARI, B. et al. The targeting of surface modified silica nanoparticles to inflamed tissue in experimental colitis. **Biomaterials**, v. 29, n. 34, p. 4554–4560, 2008.

MOURA, M. J.; MARTINS, S. P.; DUARTE, B. P. M. Production of chitosan microparticles cross-linked with genipin - Identification of factors influencing size and shape properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 82–90, 2015.

MURA, C. et al. Design, characterization and in vitro evaluation of 5-aminosalicylic acid loaded N-succinyl-chitosan microparticles for colon specific delivery. **Colloids**

**and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 199–205, 2012.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1366–1381, 2016.

NIDHI et al. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 458–472, 2016.

NUNES, C.; MAHENDRASINGAM, A.; SURYANARAYANAN, R. Quantification of Crystallinity in Substantially Amorphous Materials by Synchrotron X-ray Powder Diffractometry. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 11, p. 1942–1953, nov. 2005.

**P.R. Vade-mécum de medicamentos**. Disponível em:  
<<http://www.prvademecum.com.br>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

PEDREIRO, L. N.; CURY, S. B. F.; GREMIÃO, M. P. D. Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier to Improve Zidovudine Permeability. **J Nanosci Nanotechnol.**, v. 16, p. 1248–56, 2016.

PERTUIT, D. et al. 5-Amino Salicylic Acid Bound Nanoparticles for the Therapy of Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 3, p. 211–218, 2007.

PREISIG, D. et al. Mucoadhesive microparticles for local treatment of gastrointestinal diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 156–165, 2016.

RASSU, G. et al. Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 77–87, 2016.

SANTOS, L. DOS; TORRIANI, M. S.; BARROS, E. **Medicamentos na prática da farmácia clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

SARVAIYA, J.; AGRAWAL, Y. K. Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 454–465, 2015.

SHIN-ETSU. **Hypromellose Phthalate : CONTENTS PAGE**. Tóquio, Japão. Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. , 2002.

SIGMA-ALDRICH. Disponibiliza informação sobre produtos. Disponível em:  
<<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 11 fev. 2018.

TALAEI, F. et al. Overcoming therapeutic obstacles in inflammatory bowel diseases: A comprehensive review on novel drug delivery strategies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 712–722, 2013.

TU, J. et al. Chitosan nanoparticles reduce LPS-induced inflammatory reaction via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway in Caco-2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 848–856, 2016.

URBANSKA, A. M. et al. What's Next for Gastrointestinal Disorders. **Journal of Controlled Release**, v. 221, p. 48–61, 2016.

VALDEQUÍMICA PRODUTOS QUÍMICOS LTDA. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos**. São Paulo: [s.n.].

VARASTEH, M. et al. Quantitative determination of polymorphic impurity by X-ray powder diffractometry in an OROS® formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 74–81, 2009.

VISCIDO, A. et al. Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 9, p. 903–918, 2014.

XU, J. et al. Mucoadhesive chitosan hydrogels as rectal drug delivery vessels to treat ulcerative colitis. **Acta Biomaterialia**, v. 48, p. 247–257, 2017.

ZERROUK, N. et al. Physical characteristics of inclusion compounds of 5-ASA in  $\alpha$  and  $\beta$  cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 171, n. 1, p. 19–29, 1998.

ZHANG, S.; LANGER, R.; TRAVERSO, G. Nanoparticulate drug delivery systems targeting inflammation for treatment of inflammatory bowel disease. **Nano Today**, v. 16, p. 82–96, 2017.