Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rui Augusto Ribeiro Lima

Desenvolvimento de revestimentos de nanopartículas para administração oral

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professor Doutor Artur Cavaco-Paulo

e coorientação de
Professora Doutora Andreia Gomes
Doutora Joana Cunha

Janeiro 2015

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rui Augusto Ribeiro Lima

Desenvolvimento de revestimentos de nanopartículas para administração oral

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professor Doutor Artur Cavaco-Paulo

e coorientação das
Professora Doutora Andreia Gomes
Doutora Joana Cunha

Janeiro 2015

Declaração

Nome: Rui Augusto Ribeiro Lima

Endereço eletrónico: ruia91@gmail.com

Título da dissertação:

Desenvolvimento de revestimentos de nanopartículas para administração oral

Orientador (es): Professor Doutor Artur Cavaco-Paulo, Professora Doutora Andreia Gomes, Doutora Joana Cunha

Designação do Mestrado: Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, __/__/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem a colaboração diversas pessoas.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Professor Doutor Artur Cavaco-Paulo por me ter recebido no seu grupo de investigação BBRG e à Professora Doutora Andreia Gomes por todo o apoio durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

Queria também expressar a minha especial gratidão à Doutora Joana Cunha que esteve sempre ao meu lado ao longo deste ambicioso projeto. Sem a sua ajuda não teria sido possível iniciar e terminar esta etapa académica.

Aos elementos do grupo de investigação BBRG gostaria de manifestar a minha gratidão pela forma como me receberam e me ajudaram, e da forma como demonstraram à-vontade para expor e retirar as duvidas que iam surgindo.

Ao Doutor Artur Ribeiro gostaria de agradecer a sua ajuda no ensaio de citotoxicidade, à Doutora Ulyana Shimanovich pelo tratamento de imagens 3D de microscopia confocal e ao Doutor Johan Härmark pelas imagens de Crio-ME.

Por fim gostaria de agradecer à minha família e amigos que sempre demonstraram o seu apoio nesta etapa da minha vida.

Resumo

A administração oral é a via de administração de fármacos mais cómoda para o paciente e que apresenta maior adesão à terapêutica. Permite ao paciente a ausência do ambiente hospitalar, conferindo a este um maior conforto. A utilização de nanopartículas é uma mais-valia para o tratamento de diversas patologias, permitindo a otimização da utilização dos fármacos através do seu direcionamento específico para as zonas afetadas. A associação destes dois fatores apresenta-se como um objetivo a ser atingido na medicina moderna.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um revestimento que permita a administração oral de nanopartículas proteicas com o recurso aos polímeros quitosano e poloxamer 407.

Os polímeros utilizados apresentam características capazes de tornar o transporte transepitelial de nanopartículas proteicas exequível. O quitosano tem um efeito protetor dos fluídos digestivos presentes no trato gastrointestinal, assim como uma capacidade mucoadesiva que permite aumentar o tempo de contacto das partículas com o epitélio intestinal. Por outro lado, o poloxamer 407 apresenta características mucopenetrantes que permitem uma possível progressão das partículas através da mucosa intestinal, possibilitando a sua aproximação às células epiteliais.

O uso do quitosano e do poloxamer 407 como revestimento de partículas proteicas apresentou resultados promissores. A análise por microscopia confocal e eletrónica de varrimento em transmissão juntamente com a determinação do tamanho das partículas demonstraram o eficiente revestimento das esferas proteicas. Ensaios de toxicidade demonstraram que as partículas revestidas não induzem alterações na viabilidade celular em células *Caco-2*.

As formulações foram analisadas em ensaios *ex vivo* em intestino de porco, tendo-se observado a difusão de material constituinte da partícula para os fluídos recetores. Detetou-se fluorescência resultante do conjugado BSA-FITC, componente estrutural da partícula. No entanto, não foi possível confirmar a manutenção da estrutura e morfologia das partículas nos fluídos recetores, sendo necessário o desenvolvimento de novas abordagens.

Apesar destes resultados preliminares, a utilização do quitosano e do poloxamer 407 como revestimento de partículas proteicas pode significar um avanço significativo na área da administração oral de fármacos e futuramente ser impactante na I&D da indústria farmacêutica.

Abstract

Oral administration is the drug delivery route more convenient for the patient and that presents greater compliance to therapy. It allows the patient to be outside of the hospital environment, providing them a greater comfort. The use of nanoparticles is nowadays presented as an asset for the treatment of various diseases, allowing the optimization of the therapy through its specific targeting to the affected areas. The combination of those two factors is as a goal to be achieved in modern medicine.

This study aimed to develop a coating based on chitosan and poloxamer 407 polymers that allows oral administration of protein nanoparticles.

The polymers used have characteristics capable of effectively consent the transepithelial transport of protein nanoparticles. Chitosan is a protector of the digestive fluids present in the gastrointestinal tract, and its mucoadhesive capability increases the contact time of the particles with the intestinal epithelium. On the other hand, poloxamer 407 is mucopenetrant, which allows the progression of the particles through the intestinal mucosa, promoting their approach to the epithelial cells.

The use of chitosan and poloxamer 407 as coating of protein particles showed promising results. Analysis by STEM and confocal microscopy, along with the determination of the particles size, showed efficient coating of the particles. Cytotoxicity assays have demonstrated that the coated particles do not induce changes in *Caco-2* cell viability.

The formulations were tested *ex vivo* in pig intestine, showing diffusion of particles structural material. It was detected the fluorescence of BSA-FITC conjugate, a structural component of the particle. However, it was not possible to confirm the maintenance of the structure and morphology of the particles in the receptor fluids, being necessary to develop new approaches to clarify these findings.

Despite these preliminary results, the use of chitosan and poloxamer 407 as coating of our proteinaceous particles can mean a significant advance in the field of oral delivery and, in the future, have a great impact on R&D of pharmaceutical industry.

Índice

Agradecimentos iii

Resumo v

Abstract vii

Lista de abreviaturas xvii

Lista de figuras xxi

Lista de tabelas xxv

Lista de equações xxvii

Introdução

1. Administração oral 3

1.1.Epitélio Intestinal 4

1.2.Estratégias para o sucesso da administração oral de fármacos 7

1.2.1.Ultrapassar variações no esvaziamento gástrico e na motilidade intestinal 7

1.2.2.Ultrapassar a gama de pH do trato GI 8

1.2.3.Ultrapassar a degradação proteolítica 9

2. Quitosano 11

2.1.Influência do peso molecular e grau de desacetilação 12

2.2.Aplicações do quitosano 13

2.3.Mecanismo de ação do quitosano na modificação da permeabilidade intestinal ... 13

3. Poloxamer 407 17

4. Interesse do revestimento de partículas com quitosano e poloxamer 407 . 19

Enquadramento e Objetivos

1. Enquadramento e objetivos 23

1.1.Objetivos específicos 24

Materiais e Métodos

1. Construção de esferas proteicas 27

1.1.Produção de nanopartículas de BSA 27

1.2.Produção de micropartículas de BSA 27

1.3.Determinação do rendimento de formação das esferas proteicas 27

1.4.Revestimento das partículas 28

1.5.Construção de partículas fluorescentes 28

1.6.Produção de quitosano – Alexa Fluor 647 29

1.6.1.Conjugação química do quitosano com Alexa Fluor 647 29

1.6.2.Quantificação colorimétrica do quitosano no conjugado CS-AF647 30

1.7.Produção de poloxamer 407 – rodamina B 31

1.7.1.Conjugação química de poloxamer 407 com rodamina B 31

1.7.2.Quantificação colorimétrica de poloxamer 407 no conjugado P407-Rho B 31

1.8.Determinação da eficiência de conjugação dos fluoróforos com os polímeros 32

2. Caracterização das partículas 33

2.1.Tamanho e potencial zeta (ζ) 33

2.2.Microscopia eletrónica 33

2.2.1 Coloração negativa 33

2.2.2 Microscopia eletrónica de transmissão em varrimento (STEM) 33

2.3.Microscopia confocal 34

2.4.Estabilidade em fluídos digestivos 34

2.5.Degradação das NP nos fluídos digestivos 35

2.6.Citotoxicidade celular 35

2.7.Estudo de permeabilidade intestinal *ex vivo* 37

2.7.1.Preparação da mucosa intestinal 37

2.7.2.Preparação das formulações 38

2.7.3.Incubação das partículas com o intestino 38

3. Análise estatística e outro *software* 39

Resultados e Discussão

1. Preparação de esferas proteicas 43

1.1.Rendimento, tamanho e potencial ζ 43

1.2.Morfologia 46

1.3.Microscopia confocal 49

2. Avaliação da toxicidade das NP 51

3. Ensaios em condições simuladas do trato gastrointestinal 55

3.1.Estabilidade das NP em pH gástrico e intestinal 55

3.2.Degradação das NP no trato gastrointestinal 56

4. Ensaios *ex vivo* de permeabilidade em intestino de porco 59

4.1.Quantificação da BSA 59

4.2.Deteção de partículas 60

4.2.1.Citometria de fluxo 61

4.2.2.Análise do seguimento de partículas – NTA 63

Conclusões e Trabalho Futuro

1. Conclusões 67

2. Trabalho futuro 69

Referências Bibliográficas 73

Anexos

Anexo I – Curvas padrão 81

Curva padrão de BSA 81

Curva padrão de quitosano 81

Curva padrão de poloxamer 407 82

Curva padrão de Alexa Fluor 647 82

Curva padrão de rodamina B 83

Curva padrão BSA-FITC 83

Anexo II – Soluções e reagentes 84

Soluções *stock* dos polímeros de revestimento 84

Solução *stock* de tiocianato de cobalto II 84

Fluídos digestivos simulados 84

Anexo III – Resultados suplementares 85

Imagem das MP-FITC obtida por microscopia eletrónica de varrimento em transmissão 85

Grau de conjugação dos polímeros com os marcadores fluorescentes 85

Degradação das NP nos fluídos digestivos FGS e FDS 86

Permeabilidade das diferentes formulações em ensaios *ex vivo* em intestino de porco .. 86

Formulações de NP presentes nos fluídos 87

Lista de abreviaturas

- AF647 – Alexa Fluor 647
- BSA – Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
- CAMs – Moléculas de adesão celular (*cell adhesion molecules*)
- CLDN 1/4 – Claudina 1 ou 4
- CS – Quitosano
- DCC – *n,n'*-diciclohexilcarbodiimida
- DCM – Diclorometano
- dH_2O – Água desionizada
- DLS – Dispersão dinâmica de luz (*dynamic light scatering*)
- DMAP – 4-(Dimetilamina)piridina
- DMEM – Meio de cultura *Dulbecco's modified eagle medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ECACC – Coleção Europeia de Linhas Celulares (*European collection of cell cultures*)
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FRET – Transferência de energia de ressonância por fluorescência (*fluorescence resonance energy transfer*)
- GI – Gastrointestinal
- GJs – Junções comunicantes (*gap junctions*)
- HAP – Homogeneizador de alta pressão
- HCl – Ácido clorídrico
- MALT – Tecido linfóide associado à mucosa (*mucosal-associated lymphoid tissue*)
- MP – Microesferas proteicas
- MWCO – Tamanho de poro (*molecular weight cut-off*)
- MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- NP – Nanoesferas proteicas
- P407 – Poloxamer 407
- PBS – Tampão salino de fosfatos em água (*phosphate-buffered saline*)
- POE – Polióxido de etilo
- POP – Polióxido de propileno
- Potencial ζ – potencial zeta

- Rho B – Rodamina B
- FDS – Fluído duodenal simulado
- FGS – Fluído gástrico simulado
- FIS – Fluído intestinal simulado
- FIES – Fluído intercelular dos enterócitos simulado
- FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência (*fluorescence resonance energy transfer*
- STEM – Microscopia eletrónica de varrimento em transmissão (*scanning transmission electron microscopy*)
- TEER – Resistência elétrica trans-epitelial (*transepithelial electric resistance*)
- TJs – Junções de oclusão (*tight junctions*)

Lista de figuras

Introdução

Figura 1: Esquema do transporte de moléculas por transcitose, difusão passiva e paracelular no epitélio intestinal. 4

Figura 2: Micrografia eletrónica de uma camada fina de células epiteliais do intestino demonstrando a localização das diferentes junções celulares. 5

Figura 3: Esquema da transformação da quitina em CS por desacetilação dos resíduos de N-acetilglucosamina. 11

Figura 4: Esquema representativo da regulação da permeabilidade das TJs pelo CS. 15

Figura 5: Estrutura polimérica do poloxamer 407 17

Figura 6: Micrografia obtida por microscopia confocal a laser do duodeno, jejuno e íleo de intestino de rato 2 horas após administração intragástrica de lipossomas, lipossomas dopados com poloxamer 407 e lipossomas dopados com quitosano, marcados com cumarina 6. 20

Enquadramento e Objetivos

Figura 7: Esquema representativo do objetivo do trabalho a desenvolver com o revestimento das partículas pelos polímeros CS e P407. 23

Materiais e Métodos

Figura 8: Estrutura química da ninidrina. 30

Figura 9: Reação de redução do MTT a formazano por redutases celulares. 37

Figura 10: Esquema representativo das camadas presentes no intestino delgado. 37

Resultados e Discussão

Figura 11: Tamanho das NP das formulações controlo e revestidas com CS e/ou P407. 45

Figura 12: Potencial ζ das NP das formulações controlo e revestidas com CS e/ou P407. 46

Figura 13: Microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão das NP revestidas. 47

Figura 14: Coloração negativa das NP, NP+CS e NP+[CS+P407]. 48

Figura 15: Microscopia confocal das MP+[CS+P407]. 49

Figura 16: Reconstrução 3D das MP-FITC+[CS-AF647+P407-Rho B] das imagens obtidas por microscopia confocal apresentadas na figura 15. 50
Figura 17: Variação relativa do pH do meio de cultura da linha celular Caco-2 com o aumento da percentagem das formulações NP+CS e NP+[CS+P407] (v/v). 51
Figura 18: Imagens da linha celular Caco-2 após incubação com 25% (v/v) das diferentes formulações e respetivos controlos.. 52
Figura 19: Viabilidade celular das células Caco-2 após 48 horas de incubação com 10, 20 e 25% (v/v) das diferentes formulações. 53
Figura 20: Variação do tamanho das formulações de NP em função do tempo e do pH gastrointestinal em fluídos simulados com média e desvios padrão de triplicados. 55
Figura 21: Degradação das NP após incubação sequencial nos fluídos digestivos FGS e FDS..... 57
Figura 22: Permeabilidade das diferentes formulações intestino de porco quantificada pela relação da variação da massa de BSA-FITC inicial e final. 60
Figura 23: Gráficos de densidade obtidos por análise por citometria de fluxo das formulações antes do ensaio de permeabilidade intestinal. 61
Figura 24: Gráficos de densidade obtidos por análise por citometria de fluxo dos fluídos recetores após incubação das formulações com mucosa intestinal. 62
Figura 25: Formulações de NP presentes nos fluídos recetores após a incubação em intestino de porco durante 4 horas. 62
Figura 26: Análise de seguimento das NP-FITC após produção. 63
Figura 27: Análise de seguimento das partículas nos fluídos recetores das células de Franz após incubação das diferentes formulações e controlo negativo (PBS) com a mucosa intestinal. 64

Anexos

Figura 28: Curva padrão de BSA. 81
Figura 29: Curva padrão de quitosano. 81
Figura 30: Curva padrão de poloxamer 407. 82
Figura 31: Curva padrão de Alexa Fluor 647. 82
Figura 32: Curva padrão de rodamina B 83
Figura 33: Curva padrão de BSA-FITC. 83
Figura 34: Microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão das MP-FITC. 85

Lista de tabelas

Materiais e Métodos

Tabela 1: Constituição das diferentes formulações das NP com revestimentos. 28

Tabela 2: Soluções e respetivos volumes utilizados na construção da curva de calibração para a quantificação de CS. 30

Tabela 3: Concentrações de BSA, CS e P407 presentes nas diferentes formulações utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. 36

Resultados e Discussão

Tabela 4: Rendimento de formação das NP e das MP 43

Tabela 5: Tamanho, potencial zeta e PDI das NP revestidas pelas diferentes formulações compostas por CS e P407 44

Anexos

Tabela 6: Grau de conjugação dos polímeros com os marcadores fluorescentes. 85

Tabela 7: Degradação das NP nos fluídos digestivos FGS e FDS pela variação da concentração de BSA-FITC 86

Tabela 8: Permeabilidade das diferentes formulações em intestino de porco quantificada pela relação da variação da massa de BSA-FITC inicial e final. 86

Tabela 9: Eventos fluorescentes presentes nos fluídos recetores. 87

Lista de equações

Materiais e Métodos

Equação 1: Rendimento de produção de partícula. 28

Equação 2: Eficiência de conjugação de polímero com o fluoróforo. 32

Equação 3: Degradação das nanopartículas. 35

Equação 4: Difusão de BSA – FITC no intestino de porco. 38

Capítulo I

Introdução

1. Administração oral

A toma de fármacos por via oral é considerada a administração mais conveniente e confortável para os pacientes [1], por ser uma via não invasiva e bem tolerada pela sua maioria. Doenças como o cancro exigem quimioterapias que se demonstram devastadoras para os doentes. Os perfis de toxicidade da quimioterapia apresentam os seus maiores efeitos a nível gastrointestinal (GI) e imunitário [2]. Como alternativa a este tipo de tratamento, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias de combate às células cancerígenas. A utilização de células dendríticas [3], nanopartículas superparamagnéticas [4] e nanopartículas para veiculação de fármacos [5] têm sido cada vez mais exploradas como alternativa nos tratamentos de quimioterapia. Estas estratégias têm como um dos objetivos melhorar a qualidade de vida dos pacientes com cancro, reduzindo os efeitos secundários mais comuns da quimioterapia. A associação destas novas abordagens de tratamento à possibilidade de administração oral seria uma mais-valia no tratamento deste tipo de doenças, pois permitiriam uma maior independência do paciente assim como uma menor exposição ao ambiente hospitalar, o que numa visão holística seria um benefício na sua recuperação.

Contudo existe uma falta de opções para a administração oral de produtos farmacêuticos derivados de proteínas e outras macromoléculas por se tratar de um grande desafio a nível tecnológico. A descoberta da insulina e da heparina nos anos 20 foi o maior estímulo para a criação de fármacos ativos por via oral derivados de produtos que, até então, eram administrados por injeção intravenosa [6].

A insulina, proteína descoberta por Banting e Best no Canadá em 1921 [7], tornou-se o primeiro fármaco de origem proteica utilizado a nível mundial por via injetável. Como resultado, tornou-se também o componente modelo para o desenvolvimento de formulações para administração oral de macromoléculas [6]. Também a heparina, um mucopolissacarídeo descoberto por McLean em 1916 [8], embora não tão empregada a nível clinico como a insulina, é muito utilizada como fármaco modelo para o desenvolvimento de formulações orais [6].

Graças à biotecnologia, foi possível produzir grandes quantidades deste tipo de macromoléculas purificadas a um baixo custo, permitindo o seu uso na experimentação de novas vias de administração [6].

É necessário perceber que diversos fatores afetam a absorção de macromoléculas. Em primeira instância, os fatores que mais contribuem para a baixa biodisponibilidade de macromoléculas são o seu peso molecular e as características de solubilidade.

A biodisponibilidade é independente do peso molecular para compostos com menos de 500-700 daltons (Da), contudo, esta diminui significativamente para valores mais elevados [6].

A solubilidade do composto tem um papel crucial na sua absorção. É necessário um nível mínimo de lipofilicidade para que as moléculas atravessem a barreira formada pela membrana das células epiteliais e sejam absorvidas para o sangue, por difusão passiva, via transporte transcelular [9] (Figura 1). Sem este grau mínimo de lipofilicidade não é possível ocorrer absorção passiva, a não ser que esta advenha pela via paracelular (Figura 1). No entanto, esta não se apresenta como uma possibilidade para macromoléculas, pois encontra-se restrita a pequenos compostos com pesos moleculares inferiores a 100-200 Da [6]. Adicionalmente, a maioria dos fármacos aprovados são moléculas hidrofílicas, característica que se apresenta como uma dificuldade real para a sua absorção.

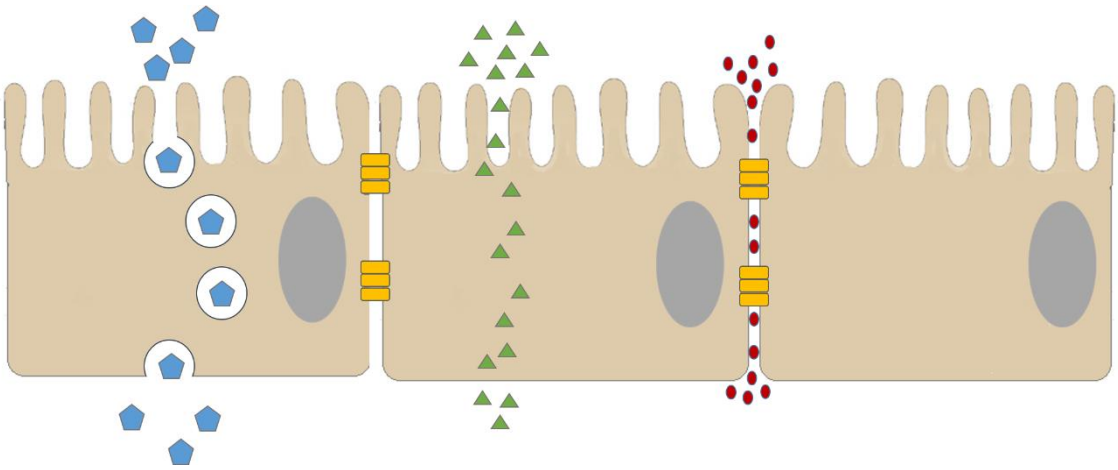

Figura 1: Esquema do transporte de moléculas por transcitose (azul), difusão passiva (verde) e paracelular (vermelho) no epitélio intestinal.

1.1. Epitélio Intestinal

O sistema GI assegura ao organismo nutrientes essenciais à vida. O trato digestivo inclui a boca, a faringe, o esófago, o estômago, o intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e o intestino grosso (ceco e cólon ascendente, transversal, descendente e sigmóide) [10].

O intestino delgado será o foco de interesse neste trabalho por ser o local de absorção de eleição. A parede intestinal é revestida por um epitélio de revestimento com funções de absorção e secreção. As células epiteliais presentes no intestino delgado, também denominadas de enterócitos, permitem a passagem para o organismo dos nutrientes, eletrólitos e fluídos provenientes da alimentação, para a via sanguínea e via linfática, ao mesmo tempo que formam

uma barreira protetora contra macromoléculas, toxinas e microrganismos [11]. No epitélio de forma cilíndrica encontram-se projeções da membrana plasmática apical denominadas de microvilosidades que aumentam significativamente a superfície membranar e, consequentemente, a capacidade de absorção do epitélio. A orientação das microvilosidades é mantida pelas numerosas conexões entre as membranas adjacentes e os microfilamentos centrais de actina [12].

Todas as células epiteliais encontram-se ligadas entre si e à matriz extracelular por junções celulares especializadas [13]. As junções celulares desempenham um papel essencial na coesão e rigidez do tecido, transmissão de informação entre o meio extracelular e intracelular, controlo da passagem de iões e moléculas pela membrana celular, e servem também como condutas para o movimento de iões e moléculas do citoplasma de uma célula para outras células vizinhas.

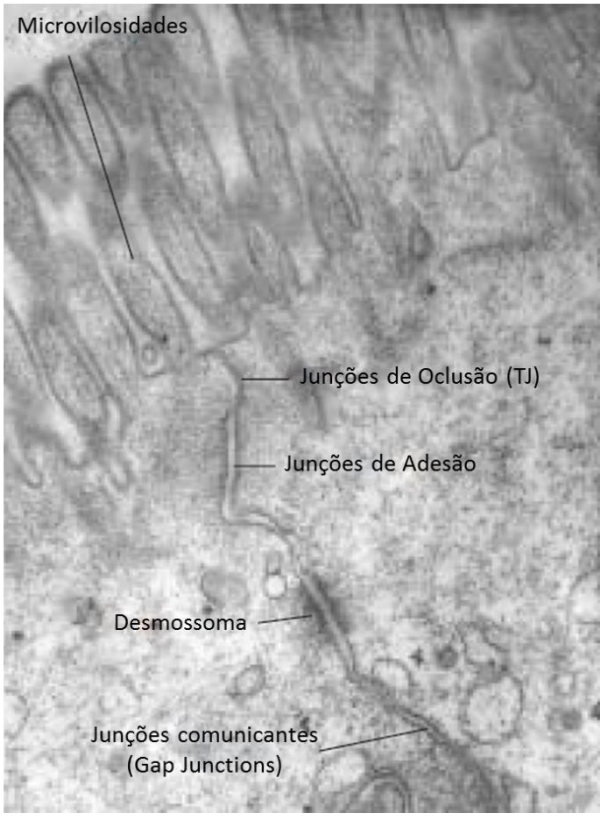

Figura 2: Micrografia eletrónica de uma camada fina de células epiteliais do intestino demonstrando a localização das diferentes junções celulares. Adaptado de Tsukita *et al.* [14].

Nos enterócitos dos animais vertebrados estão presentes três classes de junções celulares apresentadas na figura 2: junções de ancoragem, de oclusão e comunicantes.

Junções de ancoragem (desmossomas, hemidesmossomas e junções de adesão) e junções de oclusão (TJs – *tight junctions*) desempenham a tarefa fundamental de manter as células unidas, formando um tecido [14]. Estas junções são formadas por três componentes: moléculas de adesão

celular (CAMs – *cell adhesion molecules*), que ligam uma célula a outra, ou recetores de adesão, que ligam células à matriz extracelular; proteínas adaptáveis, que se ligam às CAMs ou a recetores de adesão dos filamentos do citoesqueleto e a moléculas sinalizadoras; e os próprios filamentos do citoesqueleto [15]. Adicionalmente, as TJs também controlam o fluido de solutos entre as células que formam a camada epitelial.

As células epiteliais, entre outras como o músculo liso, são fortemente ligadas por desmossomas. Hemidesmossomas estão normalmente localizados na superfície basal das células epiteliais, ancorando os componentes subjacentes do epitélio à matriz. Desmossomas e hemidesmossomas também transmitem força de cisalhamento de uma região da membrana celular para o epitélio como um todo, providenciando força e rigidez a toda a membrana celular epitelial. Estas junções são especialmente importantes na manutenção da integridade do epitélio da pele [14].

As junções de adesão, que ligam as membranas laterais adjacentes das células epiteliais, estão normalmente localizadas perto da superfície apical, abaixo das TJs. Um cinto circunferencial de filamentos de actina e miosina num complexo com junções de adesão funcionam como um cabo de tensão que internamente abraça as células controlando, assim, a sua forma.

O terceiro tipo de junções, as comunicantes (GJs – *gap junctions*), permite a rápida difusão de pequenas moléculas e moléculas hidrofílicas entre o citoplasma de células adjacentes. Apesar de presentes no epitélio, as GJs são abundantes em tecidos não epiteliais e estruturalmente apresentam-se muito diferentes das junções de ancoragem e TJs [16].

A permeabilidade da barreira epitelial, que geralmente é mantida pelas proteínas que formam as TJs, permite apenas a absorção de água e eletrólitos do lúmen intestinal, prevenindo a passagem de agentes inflamatórios e infeciosos para a mucosa e circulação sistémica [17].

Neutra *et al.* [18] documentaram a capacidade das células M transportarem material estranho ao organismo por via transepitelial do lúmen para o tecido linfático. Como a superfície mucosa de todo o intestino delgado é rica em flora microbiana, este tipo de transporte feito pelas células M poderia resultar num elevado risco de infeções. Contudo, este risco é contrabalançado por uma densa rede de processamento de antigénios, o tecido linfóide associado à mucosa (MALT – *mucosal-associated lymphoid tissue)*, que tem uma localização imediatamente subjacente às células M [19].

As células M são células tipicamente epiteliais, mas a presença de um subdomínio de membrana basolateral é uma particularidade que aumenta a superfície da célula, formando um "bolso" intraepitelial [20]. Este "bolso" de membrana permite um local de ancoragem especial para uma

subpopulação de linfócitos intraepiteliais [21] (constituintes do MALT) e diminui significativamente a distância de transcitose da superfície apical para o lado basolateral da barreira epitelial [18].

O muco presente no epitélio intestinal é essencial para a prevenção da passagem dos agentes inflamatórios e infeciosos. São as células calciformes (*goblet cells*), um tipo especializado de epitélio simples colunar, que secretam a mucina, o principal componente do muco. [22]

Em suma, o epitélio intestinal apresenta-se como o maior órgão de absorção seletiva de nutrientes por diversos tipos de transporte: paracelular, transcelular e transmembranar. Associado a esta importante característica apresenta-se ainda como uma barreira de excelência aos agentes patogénicos protegendo, assim, a entrada destes no organismo, não só pelas características morfológicas específicas mas também pela existência intraepitelial de um ramo do sistema imunitário.

1.2. Estratégias para o sucesso da administração oral de fármacos

A administração oral de macromoléculas hidrofílicas demonstra ser um desafio devido a estas terem de enfrentar diversas barreiras no trato GI [23, 24].

1.2.1. Ultrapassar variações no esvaziamento gástrico e na motilidade intestinal

Além das dificuldades já descritas que a administração oral de macromoléculas pode trazer devido às suas elevadas dimensões e características de hidro/lipofilicidade, outras das principais contrapartidas da administração por via oral são o atraso na assimilação do fármaco e a falta de controlo no tempo de retenção para absorção, como resultado da variabilidade da mobilidade intestinal e esvaziamento gástrico. No cólon existem ainda outras preocupações, como possíveis alterações na sua microflora e o risco de absorção, juntamente com o fármaco, de endotoxinas microbianas e outros compostos potencialmente perigosos presentes na região intestinal. [25, 26]

A utilização de fármacos como a dopamina que alteram a motilidade GI tem sido explorado para combater problemas neste campo. Dive *et al.* [27] verificaram alterações em pacientes com problemas a nível da motilidade celular quando lhe era administrado dopamina. As alterações traduziam-se numa redução das contrações antrais durante o período de jejum. Concluíram que baixas doses de dopamina afetavam adversamente a motilidade gastroduodenal de pacientes em estado grave com ventilação assistida. [27]

1.2.2. Ultrapassar a gama de pH do trato GI

A absorção de fármacos é afetada também pelo pH do meio GI envolvente. O estômago humano contém aproximadamente um bilião de células parietais que produzem ácido clorídrico (HCl). No outro extremo, as secreções exócrinas do pâncreas contendo enzimas digestivas, consistem em soluções alcalinas que libertam um litro de fluídos pancreáticos por dia para o duodeno. Desta forma, é geralmente aceite que no estômago se verifique um pH médio de 1,7, no duodeno um pH entre 2,4 e 6,8 e no jejuno um pH entre 6 e 7 [28].

A solubilidade, estabilidade química, e permeabilidade intrínseca do fármaco podem ser afetadas por alterações pontuais do pH do trato GI [28]. Para compostos iónicos a fração de fármaco disponível para absorção pode ser alterada pela variação dos valores de pH. Os compostos absorvidos por via passiva e transcelular são normalmente absorvidos na sua forma não ionizada, logo a proximidade do pH no lúmen intestinal ao pKa do fármaco é um fator determinante na taxa de absorção. Desta forma, bases fracas serão melhor absorvidas a valores de pH acima do seu pKa, e um ácido fraco será melhor absorvido a valores de pH abaixo do pKa, assumindo que não ocorrem limitações de solubilidade [28]. De uma maneira geral a taxa de dissolução de bases fracas é maior no fluido gástrico quando comparado com o do intestino.

O pH gástrico após uma refeição pode aumentar a dissolução de ácidos fracos no estômago mas inibir a absorção das bases fracas. Por outro lado, uma maior retenção dos fármacos no estômago pode levar a um aumento da porção de fármaco que se dissolve antes da passagem para o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), podendo levar a maior degradação da molécula e, consequentemente, menor absorção intestinal. Esta zona (intestino delgado) é o local primário onde ocorre a absorção de fármacos, devido à sua grande superfície epitelial e variedade de mecanismos de transporte. Desta forma, a classe de compostos mais vulneráveis a alterações relacionadas com variações de pH e motilidade GI são as bases fracas com baixa hidrofilicidade [28].

A estabilidade das moléculas ácidos fracos é a principal consideração quando se interpretam os perfis de biodisponibilidade oral sob potenciais variações de pH. Um pH gástrico elevado pode mostrar-se um amplificador da biodisponibilidade de fármacos ácidos fracos, como penicilina, eritromicina e digoxina. Por exemplo, sob condições ácidas, a digoxina é hidrolisada a digoxigenina, o que reduz a sua atividade farmacológica [28].

1.2.3. Ultrapassar a degradação proteolítica

Outro obstáculo apresentado à absorção oral de fármacos é a sua vulnerabilidade à degradação proteolítica no trato GI. A maioria das macromoléculas, principalmente proteínas e péptidos, são suscetíveis à rápida degradação por enzimas digestivas [25]. Apesar disto, hoje em dia este é um problema facilmente ultrapassável pela encapsulação do fármaco ou pela disponibilidade de uma variedade de revestimentos usualmente utilizados em formulações farmacêuticas.

A atividade proteolítica é mais intensa no estômago e no duodeno, apresentando-se significativamente reduzida no íleo e no cólon. Diversos sistemas de administração para absorção nas zonas mais distais do intestino têm sido propostos com o objetivo de minimizar a exposição do fármaco a enzimas proteolíticas [6]. Uma abordagem possível são os revestimentos capazes de atrasar a libertação da substância ativa por um período de tempo suficiente para que a formulação atravesse o estômago, o duodeno e o jejuno, sendo apenas libertada no íleo e cólon. Outra estratégia é o uso de material polimérico que é especificamente degradado pela flora intestinal humana residente no intestino delgado e cólon [29].

Também com o objetivo de reduzir a degradação das proteínas utilizadas para fins terapêuticos, têm sido co-administrados inibidores enzimáticos [30]. Contudo estes esforços têm demonstrado pouco sucesso, visto que o aumento da biodisponibilidade apenas tem sido observado quando os inibidores enzimáticos se encontram associados a potenciadores de absorção [31].

O encapsulamento de fármacos em nanopartículas erodíveis ou biodegradáveis que podem ser absorvidas para a corrente sanguínea na sua forma intacta, onde posteriormente libertarão o fármaco, é uma das vias com maior interesse em ser explorado, tendo como objetivo a proteção dos fármacos da degradação enzimática [32]. Partículas com tamanhos submicrométricos são absorvidas por transcitose pelos enterócitos e células M. Material polimérico, como o quitosano (CS), poderá demostrar potencial ao ser utilizado na construção destas partículas, visto este polímero induzir a abertura das TJs localizadas entre as células do epitélio, permitindo desta forma um aumento da ocorrência de absorção paracelular [33]. Até ao momento, esta abordagem apresenta um sucesso limitado, principalmente devido à taxa de absorção conseguida ser relativamente baixa. Outras contrapartidas nesta abordagem são a baixa capacidade de encapsulamento destas partículas, a possível degradação das macromoléculas durante a construção das nanopartículas, a rápida eliminação por parte do organismo das partículas após absorção, a possível alteração da biodistribuição do composto, os efeitos consequentes na segurança e eficácia, assim como os riscos de toxicidade do material polimérico que modifica as

TJs [34]. Com base nestes fatores, atualmente está a ser explorada a aplicação deste polímero no desenvolvimento de micro e nanopartículas para vacinas orais, tirando vantagem da capacidade destas partículas realizarem um direcionamento para as células M [34-36].

2. Quitosano

O quitosano (CS) é um polissacarídeo constituído por copolímeros de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucose) e N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glucose) unidos por ligações covalentes β(1-4) (Figura 3) derivado da desacetilação parcial sintética da quitina dos crustáceos, insetos e fungos [37]. O CS também está naturalmente presente na parede celular de microrganismos e fungos, como as leveduras [38].

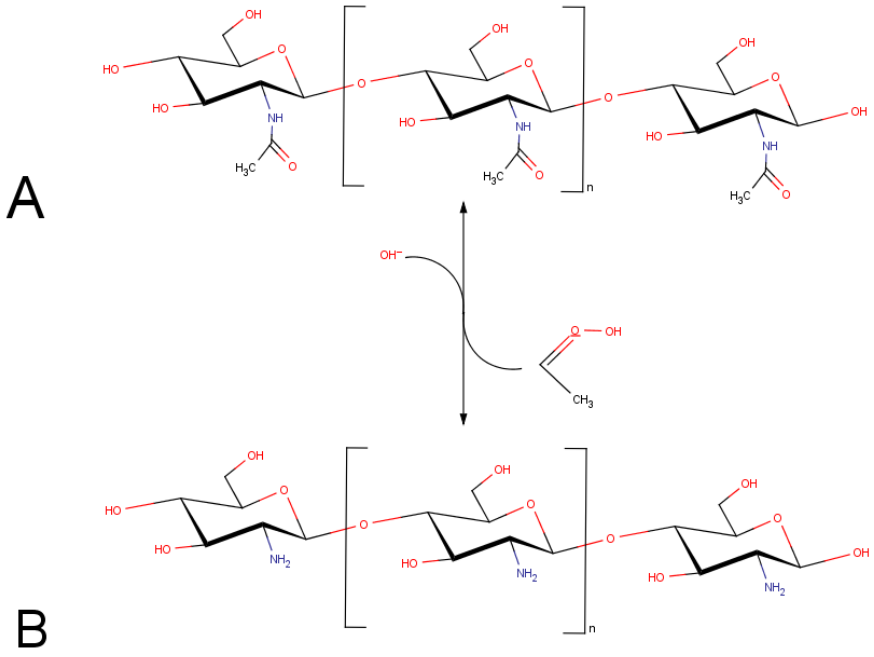

Figura 3: Esquema da transformação da quitina (A) em CS (B) por desacetilação dos resíduos de N-acetilglucosamina.

A produção de quitina e CS a nível industrial é atualmente realizada a partir de carapaças de caranguejo e camarão descartado da indústria de enlatados. A produção de CS a partir das carapaças dos crustáceos reaproveitadas do lixo da indústria alimentar é económica e fiável, especialmente se incluir a recuperação de carotenóides. As carapaças contêm quantidades consideráveis de astaxantina, um carotenóide que até ao momento não é possível sintetizar quimicamente, e que é utilizado como um aditivo alimentar para os peixes na aquicultura [39].

A descoberta deste polímero foi atribuída a Rouget em 1859 quando ao ferver quitina em hidróxido de potássio obteve um material solúvel em ácidos orgânicos [40]. Mais tarde, em 1894, Hoppe-Seyler denominou este material de CS [41], mas só em 1950 a sua estrutura foi determinada por Roelofsen e Hoette [42].

O principal constituinte do CS, a glucosamina, é uma substância natural produzida no corpo humano a partir da glucose, sendo fundamental para a produção dos glicosaminoglicanos, constituintes da matriz extracelular do tecido conectivo e da cartilagem, encontrando-se também presente nos tendões e ligamentos [43].

O termo CS é genericamente utilizado para descrever uma série de copolímeros de glucosamina e N-acetilglucosamina com diferentes pesos moleculares (50 kDa – 2000 kDa), viscosidade (1% CS em 1% de ácido acético, <2000 mPa.s), e grau de desacetilação (40%-98%)[38]. A desacetilação da quitina é obtida por hidrólise do grupo acetilo do carbono 2 do anel glicosídico dos resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 3). Desta forma o polímero terá na sua constituição resíduos de N-acetilglucosamina e de glucosamina aleatoriamente ordenados, sendo o rácio entre estes, denominado de grau de desacetilação. Algumas destas variáveis, como o peso molecular e o grau de desacetilação, são parâmetros que influenciam as propriedades físicas e biológicas do CS [44, 45].

2.1. Influência do peso molecular e grau de desacetilação

Num cenário de produção de nanopartículas de CS, existe uma correlação entre o peso molecular do polímero e o tamanho da partícula. O tamanho médio das nanopartículas de CS apresenta-se menor quanto menor for o peso molecular do polímero, o que poderá estar associado ao facto das cadeias mais curtas do polímero originarem partículas mais pequenas. Verifica-se também que o CS com maior grau de desacetilação origina partículas de menor tamanho [46].

Associado ao tamanho da partícula e ao grau de desacetilação encontra-se o potencial zeta (ζ) que será influenciado pela distribuição dos grupos funcionais amina pela área da partícula, afetando a carga desta. A captação celular das partículas de CS é afetada pelo potencial ζ, no sentido em que quanto maior o potencial ζ da partícula maior será a sua captação celular. Quanto à citotoxicidade, as partículas de CS apresentam-se menos tóxicas quando o seu grau de desacetilação é baixo, não havendo, no entanto, uma correlação significativa da citotoxicidade com o peso molecular do CS [46].

Os sais de CS são solúveis em solução aquosa, contudo a sua solubilidade depende do seu grau de desacetilação e do pH do solvente. Moléculas de CS com um baixo grau de desacetilação (40%) apresentam-se solúveis até pH 9, enquanto o CS com um grau de desacetilação de cerca de 85% é solúvel até um pH máximo de 6,5. A solubilidade do CS é também influenciada significativamente pela adição de sais na solução: quanto maior a força iónica menor a solubilidade.

A viscosidade da solução de CS aumenta com o aumento da sua concentração e grau de desacetilação e diminui com o aumento da temperatura. A relação do aumento da viscosidade com o aumento do grau da desacetilação deve-se às diferentes conformações das moléculas de CS de acordo com o grau de desacetilação. Para um elevado grau de desacetilação, em que a molécula apresenta elevada carga positiva, o CS possui uma conformação estendida com cadeias mais flexíveis. Pelo contrário, moléculas com um menor grau de desacetilação adotam uma conformação coloidal devido à sua menor carga [47].

2.2. Aplicações do quitosano

Diversos estudos têm demonstrado a viabilidade do CS em aplicações farmacêuticas. Entre estas foi descrita a utilização do CS como transportador de fármacos por via oral, parental, nasal e ocular, em terapia génica e como sistema hidrogel associado a outros polímeros [48]. Neste trabalho é de especial interesse a capacidade do CS como transportador de compostos por via oral.

As características químicas da molécula de CS mostram-se essenciais para a mucoadesividade que este composto exibe [49]. Na sua estrutura, o CS possui grupos –OH e $–NH_2$ que conseguem formar pontes de hidrogénio, no seu estado linear, apresentando desta forma cadeias com elevada flexibilidade e dependência da força iónica presente no meio envolvente. Para além destas características, a natureza catiónica do polímero permite uma forte interação electroestática com o muco ou com superfícies mucosas carregadas negativamente [50].

Illum *et al.* [51] foram os primeiros a demonstrar que o CS era capaz de promover a absorção transmucosa no epitélio nasal de pequenas moléculas polares e de compostos proteicos e peptídeos. Mais tarde, Artursson *et al.* [52] publicaram resultados mostrando que o CS aumentou a permeabilidade paracelular da linha celular de epitélio intestinal humano *Caco-2* (adenocarcinoma colo-rectal). Estas descobertas contribuíram para que este polímero seja considerado um amplificador da absorção epitelial [53].

2.3. Mecanismo de ação do quitosano na modificação da permeabilidade intestinal

Um estudo feito por Yeh *et al.* [33] permitiu perceber o tipo de relação entre a presença do CS e o aumento da permeabilidade na linha celular *Caco-2*. O esquema representado na figura 4 sugere a indução da abertura das TJs pelo CS, sendo esta ação reversível após a remoção do polímero.

Os autores avaliaram a abertura e o fecho das TJs através da medição da resistência elétrica transepitelial (TEER, *transepithelial electrical resistance*) que, na presença de CS, apresenta um decréscimo, retornando para valores próximos do controlo após a sua remoção.

Ao nível da expressão genética, Matter *et al.* [54] verificaram a existência de seis genes de interesse relacionados com as TJs, sendo eles *RAC3* (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3) e *ROCK1* (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1), responsáveis pela codificação de proteínas regulatórias; *ACTN1* (Alpha-actinin-1) e *MYL9* (Myosin regulatory light polypeptide 9), que codificam proteínas do citoesqueleto; e *CLDN1* (claudina 1) e *CLDN4* (claudina 4), que codificam proteínas transmembranares. A actina do citoesqueleto tem um papel crucial na regulação das TJs pela sua interação direta com certos componentes das TJs, como as CLDN1 e CLDN4. Estas proteínas transmembranares estão envolvidas no fecho do espaço entre células adjacentes e são necessárias para a formação do suporte estrutural para as TJs e transdução de sinais [54].

Tzyy-Harn Yeh *et al.* [33] verificaram que a nível da expressão de genes não existia qualquer alteração com a presença do CS, ou então esta era mínima, com a exceção do gene *CLDN4*, em que encontraram um aumento significativo na sua expressão 1 hora após a remoção do CS. Subsequentemente, a sobre-expressão do gene *CLDN4* diminuiu gradualmente, voltando progressivamente ao nível das células não tratadas. Resultados de imunofluorescência demonstraram a presença das proteínas CLDN1 e CLDN4 no espaço intercelular. Contudo, quando o CS foi removido do meio de cultura verificou-se um aumento da CLDN4 nas TJs comparativamente com as células controlo, não existindo diferenças significativas nos níveis da CLDN1. Os ensaios sugerem que a CLDN4 apresenta um papel importante na recuperação da funcionalidade das TJs quando as células são tratadas com CS [33].

Outros progressos na biologia celular das TJs demonstram que as claudinas (CLDNs) regulam as funções de barreira das TJs, e que a redistribuição das CLDNs leva a alteração da estrutura das TJs [14, 55].

Em suma, o esquema da figura 4 demonstra que o tratamento de uma monocamada de células *Caco-2* com CS leva a uma relocalização da proteína CLDN4 da membrana celular para o citosol, resultando na disrupção das TJs, o que origina o aumento da permeabilidade paracelular associado a uma diminuição da TEER, indicando a abertura das TJs. Com a remoção do CS ocorre uma sobre-expressão do gene *CLDN4* para reposição das TJs para valores de permeabilidade e TEER normais, resultando, consequentemente, no fecho das TJs [33].

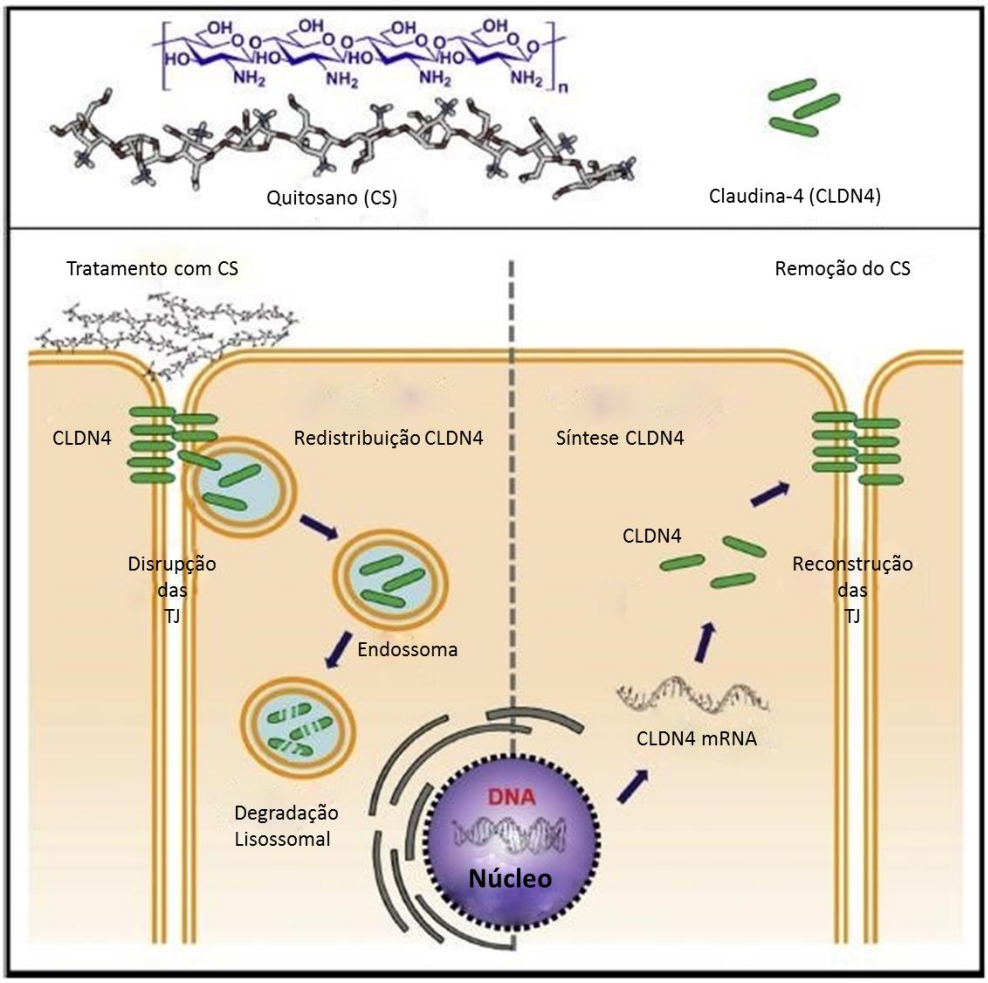

Figura 4. Esquema representativo da regulação da permeabilidade das TJs pelo CS. Adaptado de Tzyy-Harn Yeh *et al.* [33].

3. Poloxamer 407

O Poloxamer 407 (P407) é uma molécula polimérica pertencente a um grupo de polímeros constituídos por um esqueleto de polióxido de etileno (POE) e polióxido de propileno (POP) organizados na estrutura de tribloco PEO_a-POP_b-POE_a (Figura 5). Estas moléculas são sintetizadas por polimerização sequencial dos monómeros de óxido de etileno e óxido de propileno na presença de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio [56]. O P407 tem um peso molecular de cerca de 12 600 (9 840 – 14 600) Da, com cada bloco hidrofílico de POE repetido 101 vezes (a=101) e o bloco hidrofóbico de POP repetido 56 vezes (b=56) [57].

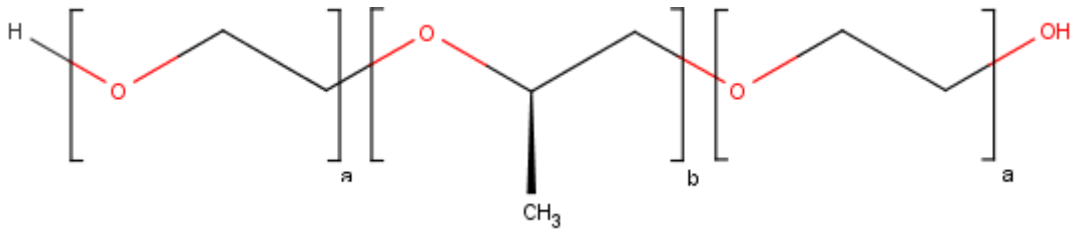

Figura 5: Estrutura polimérica do poloxamer 407

Este polímero apresenta propriedades termorreversíveis que se mostram uma mais-valia na otimização de formulações para veiculação de fármacos. Este fenómeno de termogelificação reversível é caracterizada por temperaturas de transições sólido-gel ($T_{sol \rightarrow gel}$) em que, abaixo deste valor a amostra permanece fluída, e acima daquele passa para um estado semissólido. Esta propriedade resulta de interações entre diferentes segmentos do copolímero e, acontecendo a temperaturas abaixo e acima da temperatura corporal, permite uma fácil administração e uma libertação prolongada de fármacos [58].

A combinação do P407 com outros excipientes, nomeadamente polímeros mucoadesivos, promove a otimização da $T_{sol \rightarrow gel}$ e o aumento das suas propriedades bioadesivas [59]. A bioadesividade é uma característica de elevada importância quando o tempo de retenção de uma formulação é prolongado, particularmente em administrações tópicas. O P407 é um polímero bioadesivo, sendo utilizado em diversas formulações farmacêuticas para administração rectal, oral e ocular [59].

4. Interesse do revestimento de partículas com quitosano e poloxamer 407

Partículas com propriedades mucopenetrantes são capazes de atravessar a camada de muco de modo a alcançar a membrana celular do epitélio intestinal. Como referido anteriormente, o CS apresenta propriedades amplificadoras de absorção de compostos pelo epitélio. Contudo, o muco produzido pelo epitélio intestinal é uma barreira física para o CS atingir a superfície dos enterócitos. De acordo com o estudo de Chen *et al.* [60], no duodeno, partículas com CS apresentam uma baixa penetração na mucosa intestinal, devido à menor solubilidade deste composto em pH neutro/alcalino e à neutralização da sua carga positiva a pH> 6,5. Por outro lado, os autores demonstraram que lipossomas modificados com P407 têm uma eficiência de difusão 5 a 7 vezes superior a lipossomas não modificados.

Num trabalho desenvolvido anteriormente, Li *et al.* [61] verificaram a influência do polímero P407 na dopagem de lipossomas para administração oral. Os autores demonstraram que, como já referido, o CS apresentava dificuldade de mucopenetração, apesar da sua capacidade de regulação da abertura das TJs e mucoadesividade, enquanto que os lipossomas dopados com P407 apresentaram uma maior capacidade de mucopenetração (Figura 6). Complementarmente, duas horas após a administração intragástrica em ratos, Chen *et al.* [60] conseguiram verificar uma acumulação dos lipossomas dopados com CS na porção superior do trato intestinal. Detetaram uma intensa fluorescência no duodeno que iria diminuindo ao longo do trajeto do intestino, apresentando-se menos intensa no jejuno e no íleo (Figura 6). Esta fluorescência localizava-se no lado luminal do trato intestinal ao invés de penetrar para o interior da mucosa. A passagem com baixa adesividade dos lipossomas dopados com CS ao longo trato GI pode estar relacionada com as propriedades mucoadesivas do polímero e que se relacionam com as suas características químicas: CS tende a perder a sua carga e a precipitar em ambientes neutros ou básicos, baseado nos resultados obtidos de ensaios em fluidos [60].

Quanto à avaliação dos lipossomas dopados com P407 apresentados na figura 6, os autores verificaram uma distribuição homogénea destes lipossomas ao longo do trato GI, desde o duodeno até ao íleo. Observaram, também, fluorescência no interior da camada mucosa, próximo do lado basolateral onde se encontram as células do epitélio intestinal. Estes resultados demonstraram a excelente capacidade de mucopenetração do P407 [60].

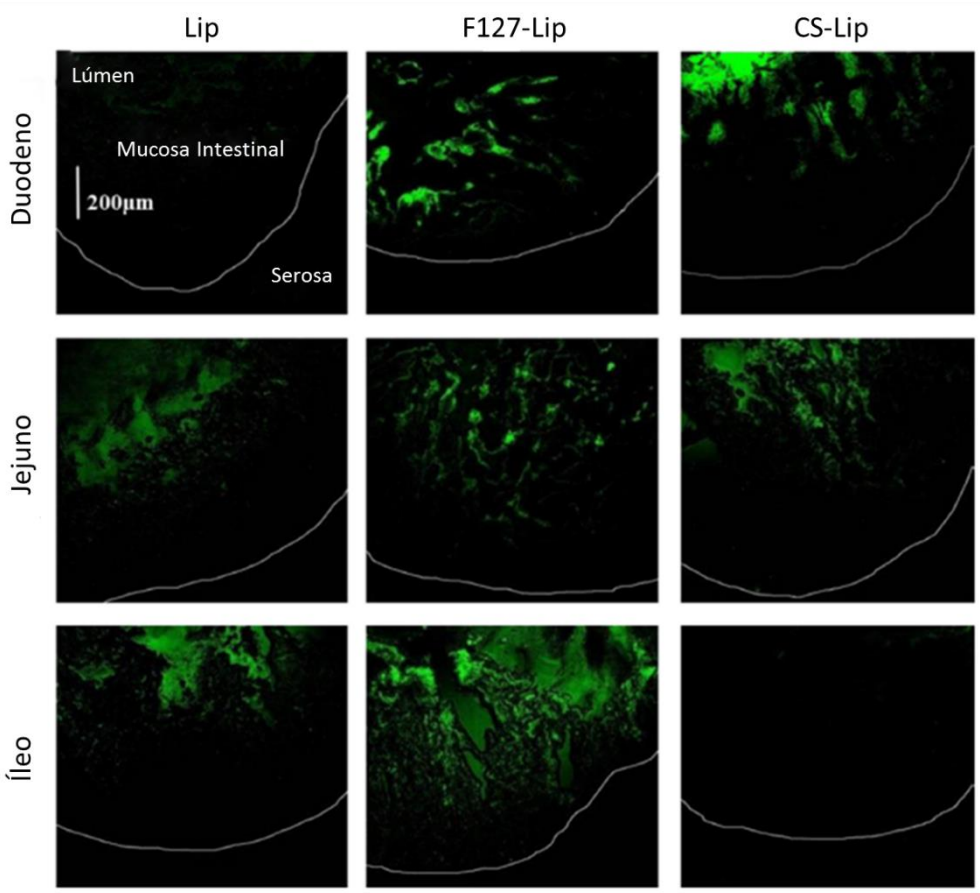

Figura 6: Micrografia obtida por microscopia confocal a laser do duodeno, jejuno e íleo de intestino de rato 2 horas após administração intragástrica de lipossomas (Lip), lipossomas dopados com poloxamer 407 (F127-Lip) e lipossomas dopados com quitosano (CS-Lip), marcados com cumarina 6. Adaptado de Chen *et al.* [60].

As características de cada um destes polímeros associados numa formulação para administração oral, apresenta-se com elevado potencial nesta área. A mucoadesão, mucopenetração, modulação da abertura das TJs e a biocompatibilidade do CS e P407 são algumas das características anteriormente descritas que permitiram ultrapassar os resultados apresentados na via de administração oral.

Capítulo II

Enquadramento e Objetivos

1. Enquadramento e objetivos

A administração oral de fármacos apresenta-se como uma mais-valia para o paciente, principalmente se estiver associado à utilização de nanoformulações com capacidade de entrega específica de fármacos. A superação das barreiras apresentadas pelo estômago (pH ácido, enzimas proteolíticas e esvaziamento gástrico) e absorção intestinal (motilidade e muco) são as principais dificuldades desta via. A utilização de polímeros com as propriedades do quitosano (CS) (mucodesividade) e do poloxamer 407 (P407) (mucopenetração) podem permitir ultrapassar as barreiras existentes desde a administração da formulação até o fármaco produzir o seu efeito a nível celular.

Após avaliação de todas as características do CS e P407, neste trabalho é proposto a elaboração de um revestimento constituído pelos dois polímeros para nanoesferas proteicas de albumina sérica bovina (BSA) para a administração oral de fármacos com efeito sistémico. O objetivo desta associação será conseguir obter um equilíbrio entre a mucopenetração e mucoadesividade características destes polímeros, permitindo que a partícula revestida atinja o epitélio intestinal e o atravesse pela via paracelular sem sofrer qualquer tipo de degradação ou alteração da sua superfície e estrutura. Espera-se que a capacidade de regulação da abertura das junções de oclusão (TJs) exibida pelo CS permita um aumento da permeabilidade do epitélio de forma a facilitar o transporte paracelular das nanoesferas proteicas de BSA, tornando possível a administração destas partículas por via oral (Figura 7).

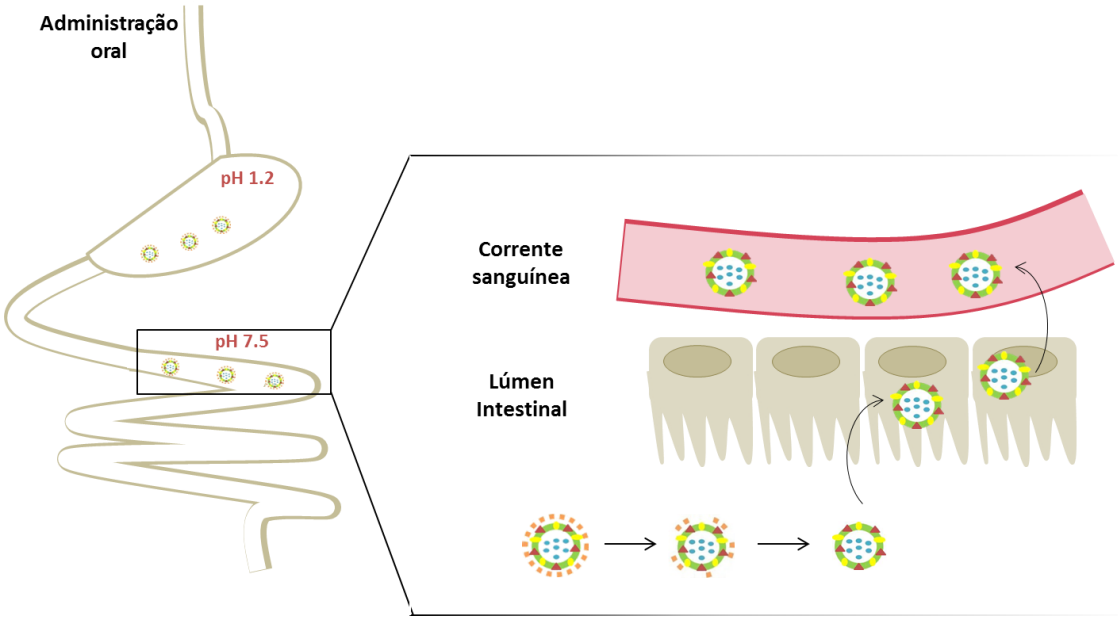

Figura 7: Esquema representativo do objetivo do trabalho a desenvolver com o revestimento das partículas pelos polímeros CS e P407. Esquema elaborado e cedido pela Dra. Joana Cunha.

1.1. Objetivos específicos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram definidos os seguintes objetivos específicos, de forma a compreender as características associadas à formulação resultante da interação destes dois polímeros com as partículas proteicas.

1) Preparação de nanopartículas de BSA revestidas com polímeros mucoadesivos e mucopenetrantes;
    a) Rendimento de formação

2) Determinação das características morfológicas e físico-químicas das partículas
    a) Tamanho
    b) Potencial ζ
    c) Morfologia

3) Estabilidade das formulações em fluídos digestivos
    a) Alteração do tamanho das partículas
    b) Degradação das partículas

4) Citotoxicidade

5) Permeabilidade das partículas em modelo *ex vivo* de intestino de porco
    a) Avaliação da difusão das partículas

Capítulo III

Materiais e Métodos

1. Construção de esferas proteicas

1.1. Produção de nanopartículas de BSA

A preparação de nanoesferas proteicas (NP) foi realizada por emulsão de acordo com os protocolos previamente desenvolvidos no laboratório [62] usando uma solução de BSA (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Espanha), poloxamer 407 (P407) (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Espanha) e óleo alimentar (0,5% v/v) (comercial) com um volume final de 100 ml em PBS. As NP foram produzidas no homogeneizador de alta pressão (HAP) de duas etapas APV-2000™ (SPX *Flow Technology*, APV *Manufacturing*, Polónia) sujeitando a amostra a uma pressão de 570 bar na primeira etapa e 240 bar na segunda etapa, durante 26 ciclos de homogeneização com um caudal de 200 ml/min. A emulsão de NP resultante do HAP foi purificada da proteína livre não incorporada com recurso a membranas com poro de 100 kDa (Amicon MWCO 100 kDa, Millipore, Espanha) por centrifugação a 5000 *g* durante 30 minutos. As NP purificadas foram ressuspendidas num volume final de 100 ml de PBS.

1.2. Produção de micropartículas de BSA

A produção de micropartículas proteicas (MP) foi realizada por emulsão através de ultrassons com a metodologia desenvolvida no laboratório, uma adaptação do método de Suslick e Grinstaff [63, 64]. Uma solução de BSA (10 mg/ml), P407 (5 mg/ml) e óleo alimentar (5% v/v) com volume final de 14 ml em PBS foi colocada numa célula de vidro (diâmetro 19 mm e altura 75 mm) mergulhada num banho de água refrigerado a uma temperatura de 5 ± 0,1°C. Introduziu-se a micro-ponta de titânio com 3 mm de diâmetro na interface óleo/água e aplicaram-se ultrassons (20 kHz Sonics & Materials Vibracell CV 33, Sonics and Materials Inc., Connecticut, USA) com uma amplitude de 40% no fornecimento de energia durante 3 minutos. As MP foram purificadas da BSA livre por centrifugação a 5000 *g* durante 30 minutos, rejeitando-se o sobrenandante e ressuspendendo as MP em 14 ml de PBS.

1.3. Determinação do rendimento de formação das esferas proteicas

O rendimento da formação das esferas proteicas foi determinado de forma indireta através da quantificação da BSA livre presente no sobrenadante utilizando o método de Brafdford [65], de acordo com as especificações do fabricante (Sigma-Aldrich, Espanha).

A proteína presente foi avaliada após incubação de 10 µl de amostra com 200 µl de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, Espanha) diluído 1:5 com H_2O durante 5 minutos à temperatura ambiente e medida a

absorção a 595 nm no leitor de microplacas SynergyMx com o *software* Gen5™ (Bio-Tek Instruments, Inc., EUA). Através da curva padrão apresentada no anexo I foi determinada a concentração.

A eficiência de formação de partículas foi calculada a partir da equação 1 em que a $[Proteína]_{Inicial}$ é a concentração da solução utilizada na síntese das partículas (10mg/ml) e a $[Proteína]_{Sobrenadante}$ é a concentração de proteína na solução resultante da filtração das NP com as membranas com MWCO 100 kDa (Millipore, Alemanha) ou da centrifugação das MP.

$$Rendimento\ de\ formação\ (\%) = \frac{[Proteína]_{Inicial} - [Proteína]_{Sobrenadante}}{[Proteína]_{Inicial}} \times 100$$

Equação 1: Rendimento de formação de partícula (%).

1.4. Revestimento das partículas

As partículas foram revestidas por polímeros adicionando a respetiva solução gota-a-gota à suspensão de partículas em agitação (300 rpm) à temperatura ambiente e mantendo a agitação por mais 16 horas. As diferentes formulações contêm os polímeros nas concentrações de 7,5 mg/ml para o P407 (Sigma-Aldrich, Espanha) e/ou 5 mg/ml para o quitosano (CS; baixo peso molecular, com um grau de desacetilação entre 75-85%; Sigma-Aldrich, Espanha), de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Constituição das diferentes formulações das NP com revestimentos.

Formulação	Concentração (mg/ml)		
	BSA	CS	P407
NP	1	0	0
NP+CS	1	5	0
NP+P407	1	0	7,5
NP+[CS+P407]	1	5	7,5

1.5. Construção de partículas fluorescentes

Foram desenvolvidas NP e MP utilizando BSA e polímeros de revestimento conjugados com marcadores fluorescentes para a realização de diversos ensaios. Prepararam-se partículas em que se substituiu 10% do seu conteúdo em BSA por BSA-FITC (Sigma-Aldrich, Espanha). Às partículas fluorescentes foram

adicionados nas diferentes formulações (Tabela 1) CS conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 647 (CS-AF647; 10 mg/ml de CS com 10 µg/ml de AF647) e/ou P407 conjugado com rodamina B (P407-Rho B; 15 mg/ml de P407 com 5 µg/ml de Rho-B).

1.6. Produção de quitosano – Alexa Fluor 647

1.6.1. Conjugação química do quitosano com Alexa Fluor 647

Preparou-se uma solução *stock* de AF647-ácido carboxílico pré-activado com o grupo éster de succinimidilo (Life Technologies, EUA) a 20 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Espanha). Adicionou-se 25 µl do fluoróforo a 2,5 ml de CS a 10 mg/ml em 0,5% de ácido acético e agitou-se durante 16 horas à temperatura ambiente no escuro. Após a incubação foram adicionados 300 µl de cloreto de sódio 3M (Sigma-Aldrich, Espanha) e 3 ml de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, Espanha), tendo sido posteriormente a solução armazenada a -20 °C durante 30 minutos para precipitar o conjugado (CS-AF647).

A purificação do polímero conjugado com o fluoróforo foi realizada por centrifugação a 11400 *g* durante 30 minutos a 20 °C, recuperando-se o precipitado. O sobrenadante foi novamente centrifugado sob as mesmas condições, tendo sido o precipitado resultante adicionado ao recolhido anteriormente. Posteriormente, o precipitado total foi lavado com etanol 70% 3 a 5 vezes por centrifugação a 11400 *g* durante 30 min.

O conjugado purificado foi seco por exposição ao ar à temperatura ambiente durante a noite, protegido da luz, dissolvendo-se posteriormente em 2,5 ml de ácido acético 1% e armazenando-se a 4 °C protegido da luz.

1.6.2. Quantificação colorimétrica do quitosano no conjugado CS-AF647

O teor em CS no conjugado CS-AF647 purificado foi avaliado por uma reação colorimétrica com o reagente ninidrina (2% de ninidrina e hidrindantina em DMSO e tampão de acetato de lítio, pH 5,2;

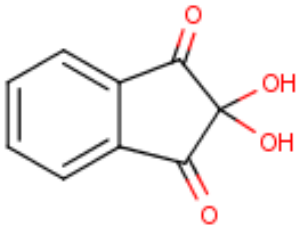

Figura 8: Estrutura química da ninidrina.

Sigma-Aldrich, Espanha) [66]. Os grupos hidroxilo (–OH) da molécula da ninidrina (Figura 8) vão reagir com os grupos amina ($–NH_2$) livres do CS (Figura 3) formando um complexo de cor castanha.

Foi criada uma curva de concentrações padrão de CS (Anexo I) a partir da diluição em água (dH_2O) de uma solução de 0,5 mg/ml de CS em 0,5% de ácido acético (amplitude de concentrações 125 – 500 µg/ml) e mistura com uma quantidade fixa de ninidrina (Tabela 2).

Tabela 2: Soluções e respetivos volumes (em µl) utilizados na construção da curva de calibração para a quantificação de CS.

Padrão nº	1	2	3	4	5
Quitosano (0,5 mg/ml)	0	250	500	750	1000
dH_2O	1000	750	500	250	0
Ninidrina	500	500	500	500	500

As amostras foram preparadas da mesma forma que a solução 5, onde 1 ml de solução de CS a 0,5 mg/ml foi substituído pela solução de amostra diluída 1:20 em dH_2O. Em seguida, todas as soluções foram agitadas cuidadosamente e colocadas num banho a 100 °C durante exatamente 10 minutos. Após esta incubação e arrefecimento das amostras à temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 ml de etanol 95%, seguindo-se a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 570 nm com o leitor de microplacas SynergyMx com o *software* Gen5™.

1.7. Produção de poloxamer 407 – rodamina B

1.7.1. Conjugação química de poloxamer 407 com rodamina B

A reação de conjugação do P407 com a Rho B foi realizada pelo método de esterificação de *Steglich* [67]. Resumidamente, a Rho B (0,2 mM) (Sigma-Aldrich, Espanha) foi pré-ativada com *n,n'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,2 mM) (Sigma-Aldrich, Espanha) no seu grupo –COOH e conjugada com os grupos –OH do P407 (0,1 mM) em diclorometano (DCM) (20 ml) (Sigma-Aldrich, Espanha), incluindo 4-(dimetilamina)piridina (DMAP) (0,2 mM) (Sigma-Aldrich, Espanha), trietilamina (0,1 ml) e piridina (0,1 ml) (Sigma-Aldrich, Espanha) como catalisadores.

Todos os reagentes, com exceção do DCC, foram dissolvidos em DCM e colocados a agitar num banho refrigerado. Quando a reação atingiu os 4 °C foi adicionado o DCC e manteve-se em agitação durante mais 5 minutos. Posteriormente, levou-se a solução à temperatura ambiente e deixou-se a agitar durante a noite. Durante todo o procedimento protegeu-se a reação da luz para evitar qualquer degradação da Rho B.

Após o término da reação de conjugação, procedeu-se à filtração da solução por vácuo por papel de filtro com 0,5 μm de poro para remover produtos secundários da reação insolúveis. Em seguida, evaporou-se o DCM sob alta pressão num evaporador rotativo a 150 rpm a 20 °C durante 20-30 minutos. O filme resultante da evaporação total do solvente foi hidratado em 10 ml de PBS.

Esta solução foi posteriormente purificada por diálise com um tubo de diálise benzoílado (MWCO 2 kDa) (Sigma-Aldrich, Espanha), contra PBS durante três dias para remoção da Rho B livre não conjugada com o P407. Após a diálise a solução foi ainda centrifugada a 5000 *g* durante 30 minutos em membranas de centrifugação Amicon (MWCO 3 kDa) (Millipore, Alemanha), sendo a solução resultante armazenada a 4 °C e protegida da luz.

1.7.2. Quantificação colorimétrica de poloxamer 407 no conjugado P407-Rho B

A quantificação do teor em P407 do conjugado P407-Rho B foi realizada por reação colorimétrica com tiocianato de cobalto, formando-se um complexo de cor azul ao reagir com os grupos –OH do polímero [68]. Para o desenvolvimento da curva padrão apresentada no anexo I foi utilizada uma solução inicial de P407 a 2mg/ml em H_2O e 7 diluições sucessivas 1:2 (amplitude de concentrações 0,015 – 2 mg/ml). A 2 ml de cada padrão foram adicionados 2 ml de acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Espanha) e 1 ml da solução de tiocianato de cobalto (Anexo II). Para a quantificação de P407 no conjugado P407-Rho B

procedeu-se de igual forma que para as soluções padrão, substituindo o padrão por 2 ml de amostra diluída 1:20 em H_2O.

Posteriormente, todas as soluções foram agitadas no vórtex e centrifugadas durante 3 min a 988 *g*. Em seguida, o sobrenadante foi dispensado e o precipitado lavado com 2 ml de acetato de etilo, repetindo-se este procedimento até o sobrenadante ficar incolor.

O precipitado resultante das lavagens foi dissolvido em 10 ml de acetona (Sigma-Aldrich, Espanha) e após a sua total dissolução foram medidas as absorvâncias das soluções padrão e da amostra a 624 nm no leitor de microplacas SynergyMx com o *software* Gen5™.

1.8. Determinação da eficiência de conjugação dos fluoróforos com os polímeros

Para determinação da eficiência da conjugação dos fluoróforos com os polímeros foram realizadas curvas padrão de concentrações do AF647 e da Rho B (Anexo I) para a sua quantificação através da medição da absorção a 649 nm e a 554 nm, respetivamente, no leitor de microplacas SynergyMx com o *software* Gen5™. Após quantificação dos polímeros conforme descrito nos pontos 1.6.2 e 1.7.2 deste capítulo, utilizou-se a equação 2 para o cálculo da eficiência de conjugação do fluoróforo com o polímero, expressa em mg de fluoróforo/mg de polímero:

$$Eficiência\ de\ conjugação = \frac{[Fluoróforo]}{[Polímero]}$$

Equação 2: Eficiência de conjugação de polímero com o fluoróforo.

2. Caracterização das partículas

2.1. Tamanho e potencial zeta (ζ)

O tamanho e o potencial ζ das NP com e sem revestimentos foram determinados a 25,0 ± 0,1 °C com recurso ao equipamento Malvern Zetasizer NS (Malvern Instruments, Reino Unido) por dispersão dinâmica de luz (DLS) e anemometria de laser Doppler, respetivamente. Todas as amostras foram diluídas 1:10, de forma a se verificar a reprodutibilidade das medições das partículas com e sem os revestimentos, tendo sido cada amostra medida pelo menos três vezes, com um mínimo de 2 ensaios independentes. Nos resultados estão apresentados os valores da média ± desvio padrão.

O tamanho das partículas dos fluídos recetores das células de Franz foi determinado por análise do seguimento de partículas (*nanoparticle tracking analysis* – NTA) com o equipamento Nanosight NS 500 (Malvern Instruments, Reino Unido) e o *software* NTA 2.2 diluindo as amostras 1:5000 em PBS.

2.2. Microscopia eletrónica

2.2.1 Coloração negativa

A coloração negativa para análise por microscopia eletrónica foi feita com 3 µl de formulação colocadas em grelhas de cobre revestidas por carbono durante 60 segundos antes da remoção do excesso de solvente. Posteriormente, as grelhas foram lavadas com duas gotas de água Milli-Q (Merk Millipore, Alemanha). Após a lavagem, o excesso de solução foi removido com papel de filtro. Em seguida, as partículas foram coradas com a grelha flutuante numa gota da solução de acetato de uranilo a 2% durante 30 segundos. O excesso de solução corante foi removido imediatamente com papel absorvente. A captura de imagens foi realizada por um microscópio eletrónico Philips CM 120 a operar a 120 kB, equipado com uma camara CCD 1k x 1k com uma ampliação de 63,280 x.

Este protocolo foi realizado pelo Dr. Johan Härmark da Escola de Saúde e Tecnologia do KTH Royal Institute of Technology e Departamento de Biociências e Nutrição do Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia.

2.2.2 Microscopia eletrónica de transmissão em varrimento (STEM)

Para a análise das NP por microscopia eletrónica de transmissão com observação em varrimento (STEM), as formulações de partículas com e sem revestimento foram diluídas e depositadas nas grelhas

de cobre com uma malha de 400 poros de 3 mm de diâmetro. O tamanho e morfologia das partículas foram observados com recurso ao microscópio eletrónico NOVA Nano SEM 200 (FEI, EUA) do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

2.3. Microscopia confocal

A morfologia das esferas proteicas e a localização dos revestimentos foram determinados por microscopia confocal utilizando um microscópio confocal LSM 510 (ZEISS, Alemanha). Devido a limitações de resolução pelas dimensões nanométricas das NP, foram produzidas MPs fluorescentes (Capítulo III, secção 1.5) de estrutura e morfologia equivalente mas com tamanho superior que permite a sua visualização por microscopia confocal.

O processamento das imagens obtidas foi realizado com o *software* Icy desenvolvido pelo Instituto Pasteur (http://icy.bioimageanalysis.org).

2.4. Estabilidade em fluídos digestivos

As diversas formulações de NP foram sujeitas a ensaios de estabilidade em fluídos digestivos que simulam o seu trajeto pelo trato GI humano após administração oral.

Para a realização destes ensaios foram utilizadas soluções iónicas sem enzimas [69] para simular o fluído gástrico (FGS), fluído duodenal (FDS), fluído intestinal (FIS) e fluído intercelular dos enterócitos (FIES) com base no trabalho de Feng *et al.* [70] (Anexo II).

As diversas formulações foram colocadas em membranas de diálise de éster de celulose *Float-a-Lyzer* com tamanho de poro (MWCO) de 300 kDa (Spectrum Labs, Holanda), tendo sido estas posteriormente imersas nos fluídos digestivos com agitação a 50 rpm, incubados num banho a 37 °C durante 2 horas. Em suma, o ensaio foi realizado com os seguintes tempos de incubação nos diversos fluídos, sucessivamente:

- 0h → 2h em FGS
- 2h → 4h em FDS
- 4h → 6h em FIS
- 6h → 8h em FIES

Nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos de incubação em cada fluído foram retiradas alíquotas de 300 µl para medição do tamanho das partículas.

2.5. Degradação das NP nos fluídos digestivos

A degradação das NP nos fluídos digestivos foi determinada por fluorescência do conjugado BSA-FITC. Esta avaliação foi analisada no FGS e FDS, fluídos pelos quais as diferentes formulações são sujeitas antes de atingirem o intestino. Através da relação entre a BSA-FITC e a intensidade de fluorescência aos 519 nm (Anexo I) foi calculada a quantidade de BSA perdida nestes fluídos como medida de degradação das NP. Foi quantificada a BSA presente na formulação inicial (BSA-FITC $_{Inicial}$), antes de ser exposta aos fluídos digestivos (FGS e FDS), e após incubação nos fluídos (BSA-FITC $_{Final}$). Através da equação 3 foi determinada a degradação das NP em FGS e FDS.

$$Degradação\ das\ NP\ (\%) = \frac{[BSA - FITC_{Inicial}] - [BSA - FITC_{Final}]}{[BSA - FITC_{Inicial}]} \times 100$$

Equação 3: Degradação das nanopartículas (%).

2.6. Citotoxicidade celular

A citotoxidade das NP com e sem os revestimentos foi avaliada na linha celular de carcinoma colo-rectal humano *Caco-2* da Coleção Europeia de Linhas Celulares (ECACC). As células foram nutridas de acordo com as recomendações da ATCC (DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, Sigma-Aldrich, Espanha) com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, Espanha)), permanecendo em crescimento a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% CO_2, e tendo sido passadas para novo frasco a cada 3-4 dias com uma diluição 1:4. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram plaqueadas com uma densidade de $1x10^5$ células/100 µl/poço em placas de 96 poços (TPP, Suíça), no dia anterior ao ensaio.

As células foram incubadas com concentrações de NP (expresso em BSA) com e sem os revestimentos, ou com diferentes soluções controlo (Tabela 3), ou 25% de PBS (volume equivalente da NP e das soluções controlo) em meio de cultura.

Tabela 3: Concentrações de BSA, CS e P407 (mg/ml) presentes nas diferentes formulações utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Formulação		BSA (mg/ml)	CS (mg/ml)	P407 (mg/ml)
10%	NP	0,1	0	0
	NP+CS		0,5	0
	NP+P407		0	0,75
	NP+[CS+P407]		0,5	0,75
20%	NP	0,2	0	0
	NP+CS		1	0
	NP+P407		0	1,5
	NP+[CS+P407]		1	1,5
25%	NP	0,25	0	0
	NP+CS		1,25	0
	NP+P407		0	1,875
	NP+[CS+P407]		1,25	1,875

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT que avalia a atividade metabólica das células. As redutases celulares atuam no brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) reduzindo-o a formazano que precipita na forma de cristais de cor púrpura (Figura 9). Desta forma, nas células metabolicamente ativas observa-se uma maior degradação do reagente MTT com aumento da absorvância nos 540 nm correspondente à formação dos cristais de formazano [71].

Após as 48 horas de incubação das células com as NP revestidas e não revestidas e com as soluções controlo, substituiu-se o sobrenadante por 100 µl de meio de cultura fresco e foram adicionados 10 µl de MTT (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Espanha), ficando a incubar durante 2 horas a 37 °C e 5% CO_2. Em seguida procedeu-se à remoção dos 110 µl de solução, adicionou-se 110 µl de uma solução de solubilização-stop de DMSO-etanol (1:1 v/v) e agitou-se cuidadosamente de forma a dissolver os cristais púrpura de formazano. Posteriormente, procedeu-se à leitura da absorvância a 540 nm no leitor de microplacas SynergyMx com o *software* Gen5™, considerando o DMSO-etanol como branco.

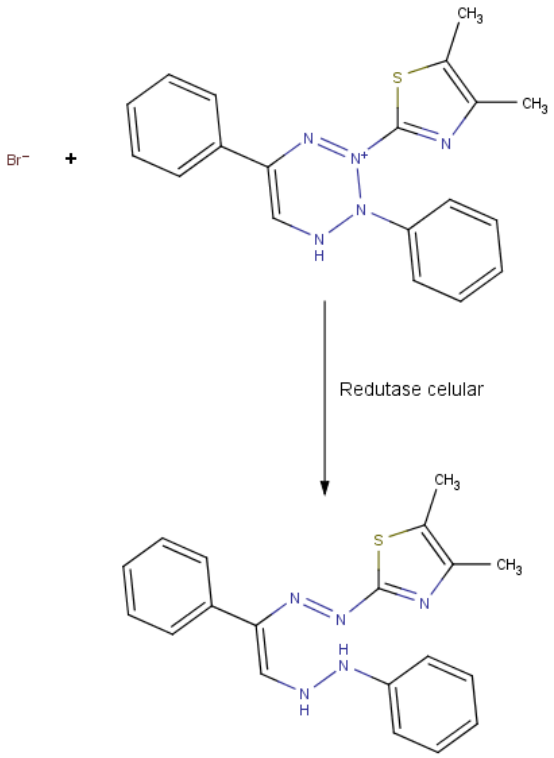

Figura 9: Reação de redução do MTT a formazano por redutases celulares.

2.7. Estudo de permeabilidade intestinal *ex vivo*

2.7.1. Preparação da mucosa intestinal

Os estudos de permeabilidade epitelial das NP com e sem os revestimentos foram realizados em células de Franz com o agitador V-Series (PermeGear, EUA). Foi utilizado intestino delgado de porco (*Sus domesticus*) adquirido através do matadouro local com um dia *post-mortem* e após exsanguinação do animal. Porções do intestino delgado foram cortadas, lavadas com PBS e mantidas em solução de Ringer com 1 g/l de glucose (Sigma-Aldrich, Espanha) e antibiótico/antifúngico (10.000 U/ml penicilina, 10.000 µg/ml estreptomicina, 25 µg/ml anfotericina (todos Sigma-Aldrich, Espanha)) até à execução do ensaio (não mais de 24h). Separou-se a submucosa das camadas inferiores do intestino (Figura 10) [72] com pinça e bisturi e colocou-se nas células de Franz entre o compartimento dador e o recetor.

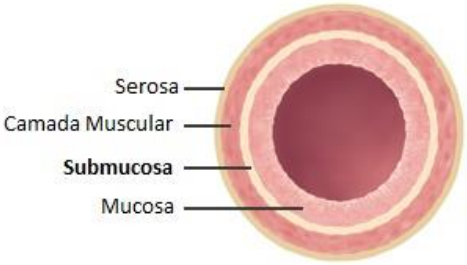

Figura 10: Esquema representativo das camadas presentes no intestino delgado. Adaptado de *Cook Biotech* [71].

2.7.2. Preparação das formulações

Avaliou-se a difusão das seguintes formulações em que as NP são fluorescentes (10% BSA-FITC) e as soluções de revestimento são não fluorescentes: NP-FITC, NP-FITC+CS, NP-FITC+P407 e NP-FITC+[CS-P407]. Todas estas formulações (e PBS como controlo negativo) foram primeiramente incubadas com os fluídos digestivos FGS e FDS (2 horas em cada fluído de forma consecutiva, tal como especificado no Capítulo III secção 2.4), de forma a mimetizar a passagem das partículas pelo estômago e duodeno, antes do ensaio de permeabilidade intestinal.

Posteriormente foram centrifugados em membranas com MWCO 100 kDa a 1000 *g* durante 1 hora, obtendo-se uma solução com um volume final de 4 ml.

2.7.3. Incubação das partículas com o intestino

No compartimento dador das células de Franz foram colocados 500 µl das diferentes formulações (PBS, NP-FITC, NP-FITC+CS, NP-FITC+P407 e NP-FITC+[CS-P407]) e no compartimento recetor foram colocados 5 ml de PBS com agitadores, tendo sido este fluído mantido a 37 °C com um circuito fechado de água. Ao final de 4 horas recolheu-se o fluído recetor e quantificou-se a BSA que atravessou o epitélio intestinal por medição da fluorescência do FITC no leitor de placas (comprimento de onda de excitação: 490 nm; comprimento de onda de emissão: 519 nm), usando a relação entre a intensidade de fluorescência do FITC e a concentração de BSA (Anexo I). A difusão de BSA-FITC pelo epitélio intestinal nas células de Franz foi determinada pela equação 4.

$$Difusão\ de\ BSA-FITC(\%) = \frac{BSA-FITC_{Final}\ (\mu g)}{BSA-FITC_{Inicial}\ (\mu g)} \times 100$$

Equação 4: Difusão de BSA – FITC no intestino de porco.

Em paralelo, determinou-se a percentagem de eventos fluorescentes no fluído recetor por citometria de fluxo com um FACSCanto II (BD Biosciences, França), analisando os resultados com o *software* FlowJo (Treestar, EUA). O tamanho das partículas presentes nos fluídos recetores foi determinado com o Nanosight NS500 (Malvern Instruments, Reino Unido) como referido anteriormente na secção 2.1 deste capítulo.

3. Análise estatística e outro *software*

Neste trabalho a análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 5.04 Demo (EUA) para o cálculo das diferenças estatísticas entre as formulações, aplicando o teste de análise de variâncias *one-way* ANOVA com o pós-teste *Tukey*, em que * representa $p < 0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Os resultados foram apresentados com média ± desvio padrão.

Para o desenho das estruturas químicas dos compostos que figuram neste manuscrito foi utilizado o *software* MarvinBeans (ChemAxon, EUA).

Capítulo IV

Resultados e Discussão

1. Preparação de esferas proteicas

Para a realização deste trabalho foram produzidas esferas proteicas de dimensões nano e micrométricas através de processos de emulsificação, com recurso a equipamento fornecedor de energia para promover a emulsificação da fase oleosa na água. Os processos de produção das esferas de BSA através da utilização do homogeneizador de alta pressão (HAP) e de ultrassons encontram-se amplamente explorados e otimizados pelo Grupo de Investigação em Bioprocessos e Bionanotecnologia [73]. Enquanto a emulsificação conseguida com o HAP origina partículas com dimensões nanométricas (nanoesferas proteicas; NP), a aplicação de ultrassons produz partículas 3-10x maiores e mais polidispersas (microesferas proteicas; MP). Estes processos permitem a organização das moléculas de BSA, colocando os seus domínios hidrofóbicos para a superfície hidrofóbica criada pelo oléo (núcleo da partícula) e os domínios hidrofílicos para a superfície hidrofílica da água, colocando assim a BSA numa interface entre óleo/água. A presença do tensioativo P407 oferece à estrutura das partículas de BSA uma maior estabilidade.

1.1. Rendimento, tamanho e potencial ζ

O rendimento obtido para a construção destas partículas foi de cerca de 92% para as NP e de cerca de 81% MP (Tabela 4), o que significa que, respetivamente, 9,2 mg/ml e 8,1 mg/ml dos 10 mg/ml iniciais de BSA ficaram emulsionados na forma de partícula.

Tabela 4: Rendimento de formação das NP e das MP

	Rendimento (%)
NP	91,93 ± 0,05
MP	80,58 ± 2,31

Após a síntese das NP e MP procedeu-se ao seu revestimento com diversas soluções de polímeros. Para isso, incubaram-se as esferas proteicas com os polímeros, resultando numa diluição 1:10 das emulsões produzidas. Por esta razão, desprezámos a percentagem de BSA não incorporada nas esferas e considerámos que tanto as formulações de NP como as de MP são constituídas por 1 mg/ml em BSA. Neste trabalho as MP foram produzidas apenas para visualização da morfologia por microscopia confocal. Por isso, a discussão irá incidir sobretudo na caracterização das NP. Foram definidas quatro

formulações: NP sem revestimento que funcionará como controlo (NP), NP revestidas por quitosano (NP+CS), NP revestidas por poloxamer 407 (NP+P407) e NP revestidas por CS e P407 (NP+[CS+P407]). Para caracterizar as diferentes formulações, determinou-se o tamanho, o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial ζ das diferentes partículas (Tabela 5 e Figuras 11 e 12).

Tabela 5: Tamanho, potencial zeta e PDI das NP revestidas pelas diferentes formulações compostas por CS e P407.

	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
NP	96,32 ± 0,71	0,20 ± 0,08	-3,44 ± 0,32
NP+CS	246,14 ± 6,60	0,24 ± 0,03	1,58 ± 0,63
NP+P407	108,77 ± 3,50	0,21 ± 0,07	-4,58 ± 0,32
NP+[CS+P407]	179,18 ± 25,65	0,26 ± 0,02	2,12 ± 0,39

Avaliou-se que a incorporação de P407 nas NP não altera o tamanho das partículas (NP *vs* NP-P407), ao contrário dos revestimentos que incluem CS (NP *vs* NP-CS e NP *vs* NP+[CS-P407]), em que se determinaram tamanhos superiores ao das NP não revestidas (Figura 11). Este tamanho parece variar quase para o dobro nas NP revestidas apenas com CS quando comparado com as NP controlo. Isto pode acontecer devido ao facto do CS ser um polímero com um elevado peso molecular com cadeias longas. Contudo, quando se associa o CS ao P407 verifica-se que as NP+[CS+P407] têm um tamanho intermédio entre as NP controlo e as NP+CS, pelo que atribuímos esta variação ao P407 presente em solução. Poderá ocorrer uma mistura entre os polímeros, sendo que as moléculas de P407 poderão intercalar-se com as moléculas de CS de maiores dimensões, obtendo-se assim partículas de tamanho inferior ao das NP+CS. Sendo o P407 um tensioativo clássico, os seus blocos hidrofóbicos e hidrofílicos poderão orientar as moléculas de CS e compacta-las, originando partículas mais pequenas, energeticamente mais favoráveis.

Embora o revestimento das NP aumente o seu tamanho para valores superiores a 100 nm, o que reduz a sua capacidade de absorção[74], esta não é uma limitação para o seu uso por via oral, uma vez que se espera que ao interagir com o muco intestinal e a superfície epitelial, o revestimento se desassocie e apenas ocorra a difusão das NP não revestidas para a circulação sanguínea.

O PDI determinado nas diferentes formulações é inferior a 0,5 (e sem diferenças estatisticamente significativas), o que significa que as partículas apresentam uma distribuição monomodal [75], podendo-se afirmar assim, a existência de uma população de tamanho predominante e representante da formulação.

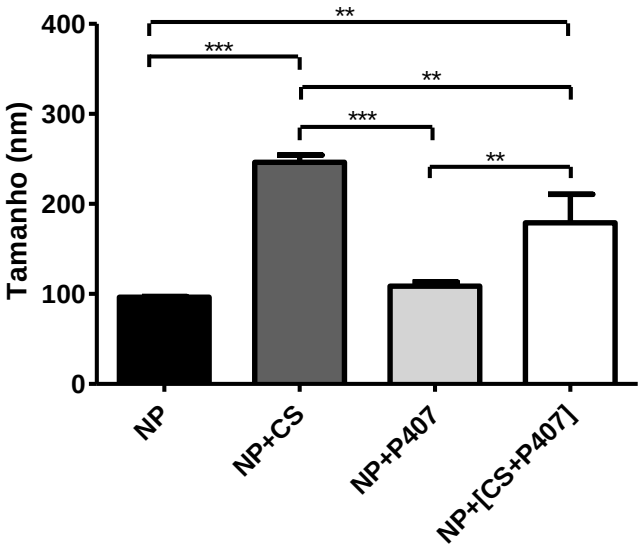

Figura 11: Tamanho das NP das formulações controlo (NP) e revestidas com CS e/ou P407 (NP+CS, NP+P407 e NP+[CS+P407]) (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre as diversas formulações estão assinaladas com ** para p<0,01 e *** para p<0,001.

Na avaliação do potencial ζ das diferentes formulações verificámos que a possível interação das NP com os polímeros de revestimento pode estar associada a interações electroestáticas entre estes. As NP apresentam um potencial ζ de aproximadamente -3,5 mV, enquanto a adição de CS (NP+CS) faz aumentar o potencial ζ para um valor de cerca de 1,5 mV. Ou seja, a carga positiva intrínseca do CS [76] facilita a aproximação à carga intrínseca negativa da NP, o que provoca uma maior interação com o polímero, resultando no revestimento da superfície das NP pelo CS. Já a incubação com P407 não altera o potencial ζ da formulação NP+P407 (ligeiro decréscimo para valores de cerca de -4,5 mV, embora não estatisticamente significativo em relação às NP). O P407 é um polímero não-iónico [77], logo a inexistência de carga não facilita a ligação com a NP. De facto, a neutralidade do revestimento com P407 em nada influencia o potencial ζ das formulações, como se comprova pelo valor obtido para a formulação NP+[CS+P407] de cerca de 2 mV, próximo do valor medido para as NP+CS.

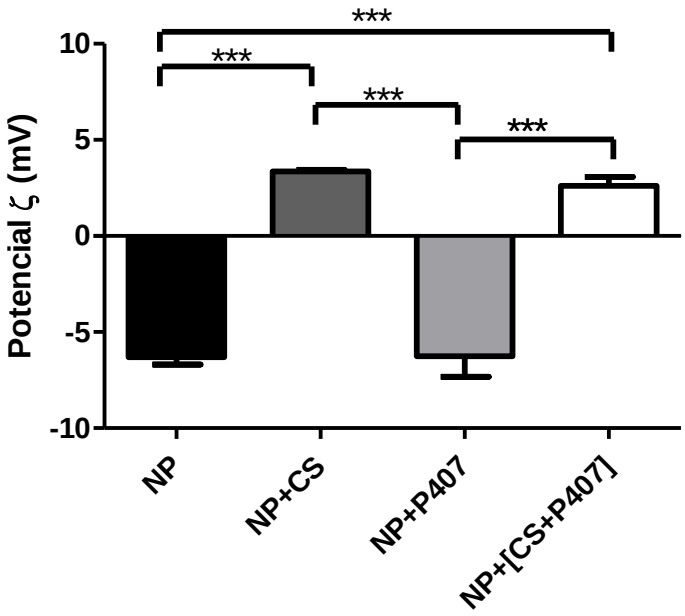

Figura 12: Potencial ζ das NP das formulações controlo (NP) e revestidas com CS e/ou P407 (NP+CS, NP+P407 e NP+[CS+P407]) (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre as diversas formulações estão assinaladas com *** em que p<0,001.

1.2. Morfologia

A morfologia das partículas apresenta-se como uma característica diretamente relacionada com a estabilidade das NP e libertação do seu conteúdo. Os métodos de emulsificação originam partículas de forma esférica [78], que conferem uma melhor relação área/volume para a estabilidade da partícula. Por outro lado, quanto mais pequena for a partícula, maior a proporção de fármaco que se encontra à superfície ou próximo desta, levando a uma libertação mais rápida [74].

A avaliação da morfologia das NP produzidas foi avaliada primeiramente por microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão (Figura 13).

Neste tipo de análise, é necessário proceder à desidratação das amostras para a sua preparação, o que pode introduzir artefactos. Com este fator é possível verificar diversas alterações nas amostras. As MP-FITC (Anexo III), que mimetizam as NP apenas com um tamanho bastante superior (mais do dobro), apresentam uma morfologia esférica. A densidade de MP deve-se ao processo de desidratação que são sujeitas. De facto, no caso das NP+CS (Figura 13A) verifica-se a formação de uma rede de polímero, onde no seu interior se encontram as NP. Possivelmente, isto sucede-se devido à viscosidade apresentada pelo polímero e às interações dos seus grupos catiónicos com a superfície das NP. Considerando que as medições de tamanho das partículas revestidas com CS indicavam um sistema

monodisperso com cerca de 246 nm (Tabela 5), a disposição reticular desta nanoformulação parece ser, então, provocada pelo processo de desidratação.

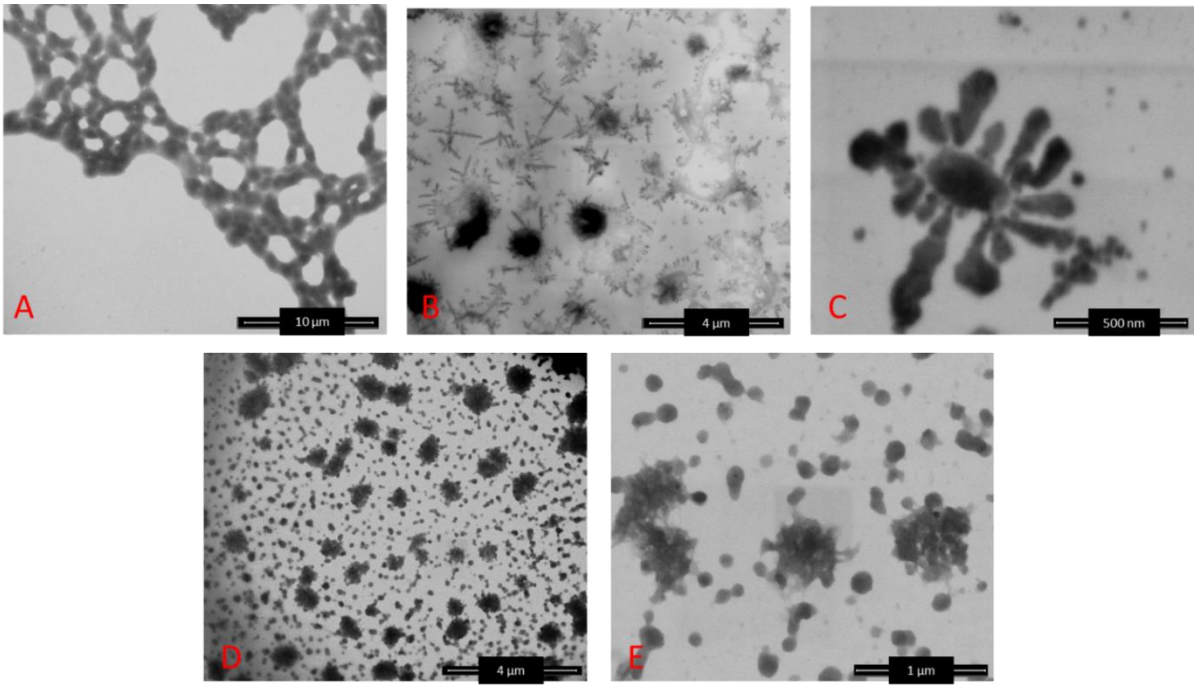

Figura 13: Microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão das NP revestidas. NP+CS (A); NP+P407 (B e C); NP+[CS+P407] (D e E).

De forma semelhante, a formulação NP+P407 (Figuras 13B e 13C) parece formar uns agregados em que as NP se localizam no centro e na zona externa poderão localizar-se partículas mais pequenas que adsorvem à superfície das NP via interação com o P407. Estes agregados podem resultar da capacidade de gelificação do polímero através da variação da percentagem de P407 em relação à quantidade de H_2O que ocorre durante o processo de desidratação. Durante o processo de gelificação, normalmente sucede-se a formação de micelas com um núcleo hidrofóbico composto pelos blocos PPO do polímero [59]. Contudo, sendo as NP hidrofílicas, a água do meio envolvente evapora mais rapidamente do que a água à superfície das NP, pelo que é possível que os blocos PPO hidrofóbicos do P407 estejam dispostos para o lado exterior da micela. A morfologia deste agregado presente na micrografia da figura 13C é similar aos nanopólipos de partículas magnéticas derivados da agregação de nanobarras [79].

A adição simultânea dos dois polímeros (Figuras 13D e 13E) leva a um perfil que, de certo modo, combina as estruturas observadas com os revestimentos apenas por CS ou por P407. Observam-se agregados semelhantes aos obtidos nas NP+P407 (Figuras 13B e 13C), embora com uma forma mais globular, possivelmente revestidos pelo CS. Ao contrário das NP+CS (Figura 13A), não acontece a formação de uma rede de polímero que aprisiona as NP, facto este que pode dever-se à presença do P407 que impede de alguma forma a associação reticular do CS, eventualmente dispondo-se entre a

superfície da NP e as moléculas de CS. Além daquelas estruturas de maiores dimensões, encontram-se também NP individualizadas; algumas estarão revestidas – as de cor mais escura e que correspondem a um material de densidade semelhante ao observado nas NP+CS e NP+407 – e outras estarão não revestidas – as mais claras e que correspondem a materiais menos densos (proteínas).

Na tentativa de contornar estes artefactos introduzidos pelo processo de desidratação e que promovem a agregação de polímeros, fez-se um tratamento de coloração negativa para preparação das formulações para análise por crio-microscopia eletrónica.

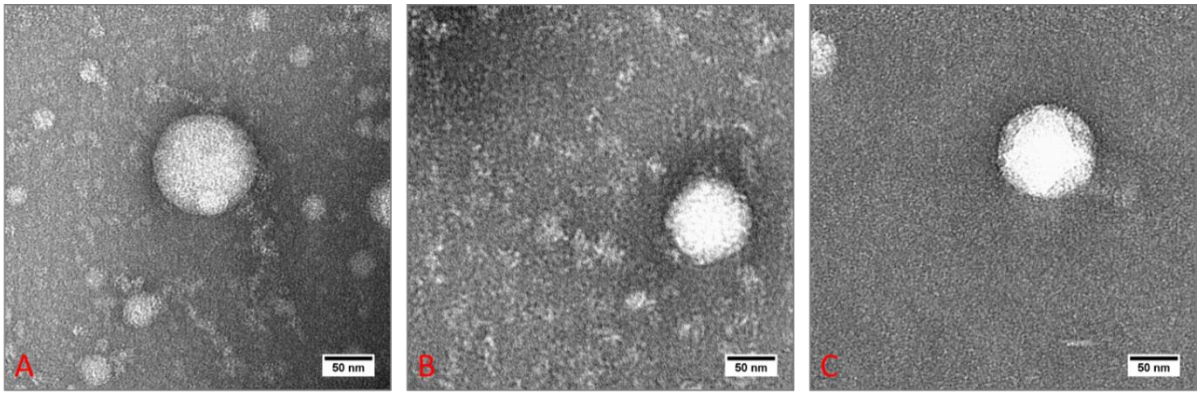

Figura 14: Coloração negativa das NP (A), NP+CS (B) e NP+[CS+P407] (C).

Na figura 14 não é possível verificar alterações nas partículas presentes em solução, contudo verificam-se algumas alterações no meio envolvente destas. Na figura 14A, correspondente às NP sem revestimentos, é possível verificar pequenas partículas na periferia da NP central. Na figura 14B (NP+CS) verifica-se uma distorção da NP resultado da difração da luz no fluído envolvente desta, este resultado apresenta-se assim possivelmente devido ao CS presente em solução. O CS com as suas longas cadeias poliméricas confere uma elevada viscosidade ao fluído envolvente criando as estrias presentes no fluído envolvente da NP na figura 14B. Quando é analisada a figura 14C (NP+[CS+P407]) podemos verificar uma desaparecimento total de corpos estranhos no fluído envolvente da partícula. Este fenómeno poderá resultar da associação do CS com o P407, que permitirá uma diminuição da viscosidade do fluído logo numa diminuição do índice de refração do fluído envolvente. Contudo apresenta-se na mesma como uma proteção, visto quando correlacionado com os resultados anteriormente descritos apresenta variações de tamanho e potencial ζ. Para além destes fatores verifica-se ainda uma inexistência de partículas de menor tamanho como as que se encontram presentes na figura 14 A. Nesta análise não foi possível recolher resultados da formulação NP+P407.

1.3. Microscopia confocal

Para possibilitar a análise da localização dos revestimentos nas esferas proteicas recorreu-se a microscopia confocal. Foram produzidas MPs fluorescentes revestidas por polímeros também fluorescentes (Figura 15). Para isso, incorporou-se BSA-FITC na estrutura da esfera proteica e recorreu-se à conjugação química do P407 e do CS com os marcadores fluorescentes rodamina B (Rho B) e Alexa Fluor 647 (AF647), respetivamente (Anexo I).

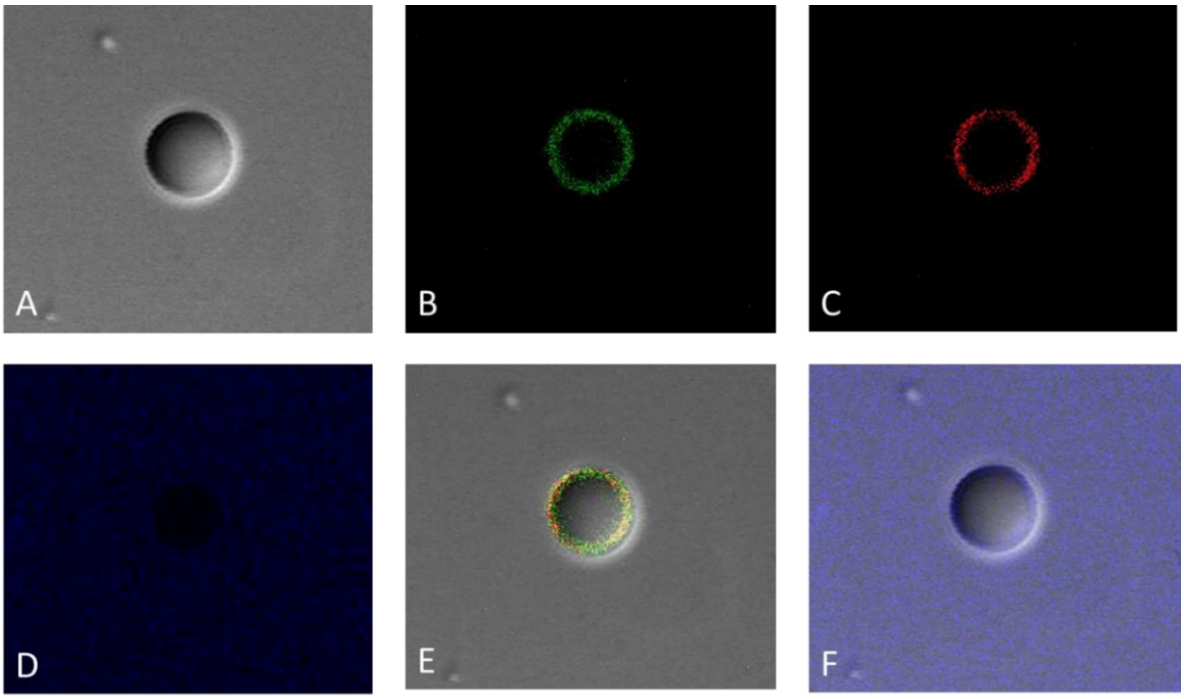

Figura 15: Microscopia confocal das MP+[CS+P407]. Campo claro (A); canal verde, mostrando BSA-FITC (B); canal vermelho, mostrando P407-Rho B (C); canal laranja , mostrando CS-AF647 (D); sobreposição das micrografias A, B e C (E); e sobreposição das micrografias A e D (F).

As imagens obtidas por microscopia confocal permitiram observar que as MP têm forma esférica (Figuras 15A e 15B) e que o P407 se localiza à superfície da partícula (Figuras 15C e 15E). A ausência de carga do polímero não impede a sua deposição e interação com a BSA ou outro componente das partículas. Possivelmente, o P407 usado no revestimento poderá interagir com o P407 utilizado como tensioativo na produção das esferas proteicas. Já o CS encontra-se disperso em todo meio envolvente das MP, não se encontrando marcação na constituição das esferas (Figuras 15D e 15F). Este resultado poderá dever-se à capacidade do CS de gelificação e formação de filmes e fibras [76]. Por outro lado, não foi aplicado nenhum processo de purificação das MP/NP após o revestimento polimérico, uma vez que os polímeros dissolvidos na fase aquosa da emulsão também podem ser úteis no processo de proteção gástrica e aumento da mucoadesividade e permeabilidade intestinal. Por esta razão, e dado

que o CS utilizado tem cadeias poliméricas muito longas (≈150 kDa) e protonadas a pH neutro, poderá não ser possível a deposição de uma camada definida à superfície das esferas.

A reconstrução 3D das imagens obtidas por microscopia confocal permitiu esclarecer a localização do CS na formulação NP+[CS+P407]. Conforme apresentado na figura 16, é possível verificar que o CS se encontra disperso no fluído envolvente da partícula, estando ausente da própria cápsula da partícula e do seu núcleo oleoso (zona a negro na Figura 16C). Pudemos ainda confirmar a presença do P407 na periferia da partícula (Figuras 16B e 16D), tal como já tinha sido evidenciado na figura 15.

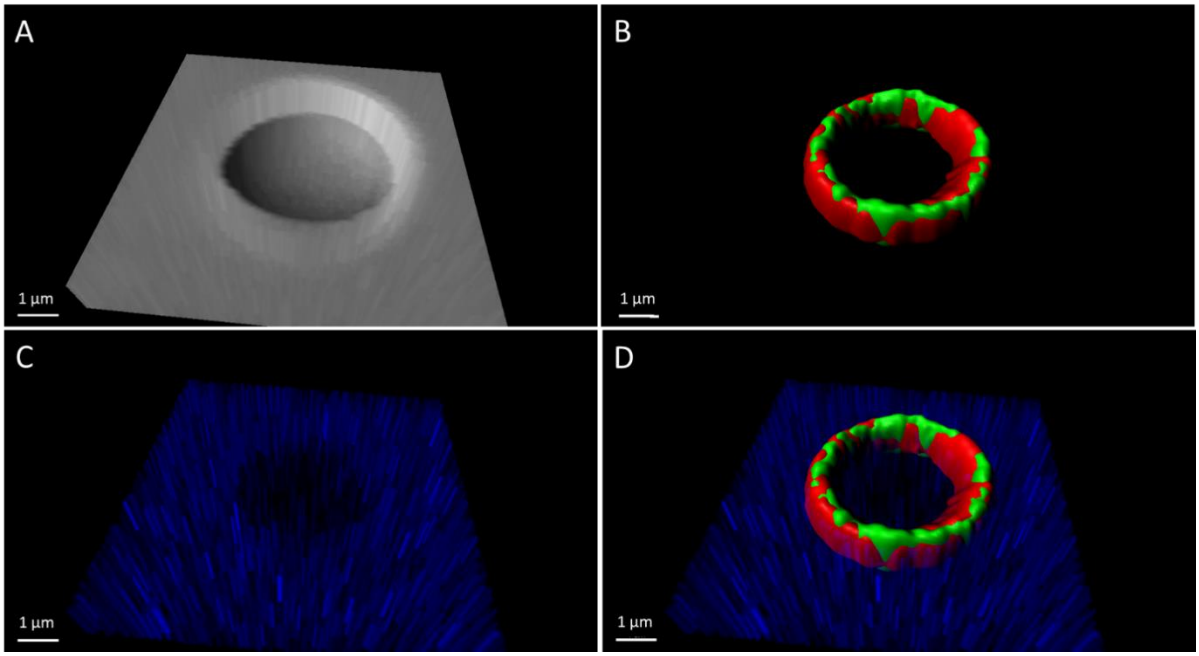

Figura 16: Reconstrução 3D das MP-FITC+[CS-AF647+P407-Rho B] das imagens obtidas por microscopia confocal apresentadas na figura 15. Campo claro (A), BSA-FITC e P407-Rho B (B), CS-AF647 (C) e BSA-FITC+P407-Rho B +CS-AF647 (D).

2. Avaliação da toxicidade das NP

A presença de CS nas formulações desenvolvidas vem acompanhada de um decréscimo do pH devido ao ácido acético necessário à sua dissolução. Desta forma é necessário verificar se a variação de pH causada pelo ácido acético não causaria toxicidade celular.

Na avaliação da citotoxicidade das NP com os diversos revestimentos foi necessário verificar se a presença das NP e revestimentos alterariam o pH do meio de cultura. A existência de uma variação do pH poderia afetar o crescimento da linha celular, causando alterações da sua viabilidade.

O gráfico da figura 17 apresenta os resultados da variação do pH do meio utilizado para cultivar a linha celular *Caco-2* com o aumento da percentagem (v/v) de NP+CS e NP+[CS+P407]. Devido à presença de bicarbonato de sódio como agente tamponador do meio de cultura DMEM, o pH ácido das formulações não afeta significativamente, o pH do meio de cultura.

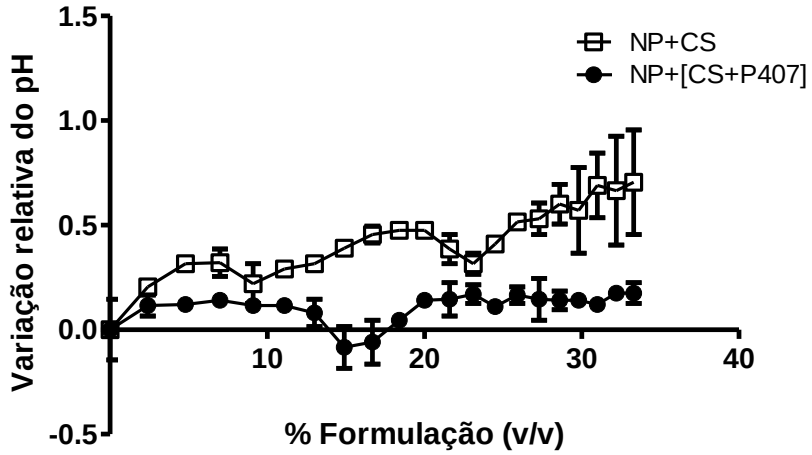

Figura 17: Variação relativa do pH do meio de cultura da linha celular *Caco-2* com o aumento da percentagem das formulações NP+CS e NP+[CS+P407] (v/v) (n=2). Valores normalizados com o pH inicial do meio de cultura.

Seguidamente, procedeu-se à avaliação do possível efeito citotóxico das formulações na linha celular *Caco-2* de epitélio intestinal humano. Por observação das culturas celulares ao microscópio ótico, verificou-se que após a incubação das células com as partículas NP+CS e NP+[CS+P407) (Figura 18E e 18F) ocorreu a formação de uma película que cobria todas a área dos fracos de cultura, correspondendo à deposição das partículas sobre as células. O mesmo não ocorreu com as restantes formulações (Figura 18B e 18C) nem com os controlos (Figura 18A e 18D). Esta deposição das formulações em que está presente o CS poderá ocorrer devido à viscosidade deste polímero que, com o tempo, tem tendência a depositar-se e formar um filme polimérico, cobrindo a monocamada de células *Caco-2*. É de salientar que, apesar da formação deste filme, não se detetou qualquer alteração na

viabilidade celular (Figura 19), ou seja, os nutrientes do meio de cultura conseguiram atingir as células, apesar desta interface aparentemente presente entre o meio de cultura e a monocamada celular.

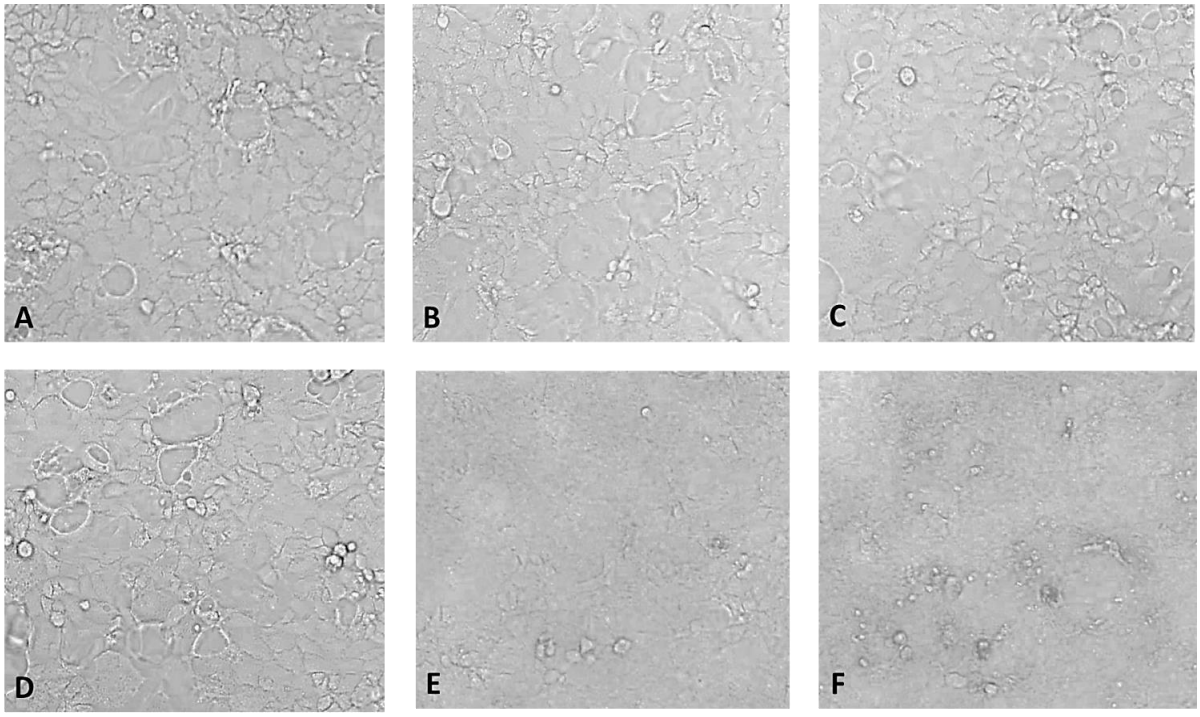

Figura 18: Imagens da linha celular *Caco-2* após incubação com 25% (v/v) das diferentes formulações e respetivos controlos. Sem formulação (A); NP (B); NP+P407 (C); PBS (D); NP+CS (E); NP+[CS+P407] (F). Ampliação 80x.

Os valores de viabilidade celular da linha *Caco-2* na presença de 10%, 20% e 25% (v/v) das NP com e sem os revestimentos e das soluções de revestimento estão apresentados no gráfico da figura 19. Neste gráfico estão também incluídos o controlo positivo (vida), o controlo negativo (morte) e um controlo de limitação de meio de cultura celular (PBS 25%), cuja função é verificar se o volume máximo de formulação utilizada (25% do volume total do meio de cultura) não afetará a viabilidade celular devido à depleção de meio de cultura, potencialmente inibindo a proliferação celular.

Com os resultados presentes na figura 19 é possível afirmar que nenhuma das formulações tem efeito citotóxico em células *Caco-2*. Contudo, podemos verificar uma pequena diminuição da viabilidade quando as células estão na presença de todas as formulações de NP (NP, NP+P407, NP+CS e NP+[CS+P407]) o que não se sucede com as soluções dos polímeros de revestimento (CS, P407 e CS+P407). Podemos assim, extrapolar que as alterações da viabilidade celular verificadas nas diferentes formulações são da responsabilidade das próprias NP e não dos seus revestimentos.

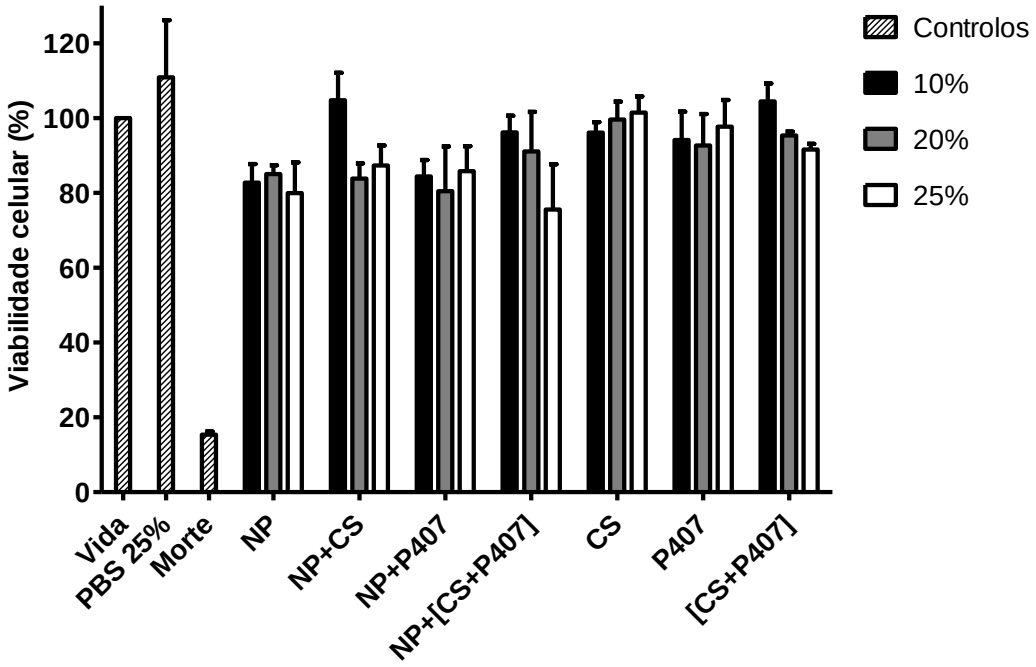

Figura 19: Viabilidade celular das células *Caco-2* após 48 horas de incubação com 10, 20 e 25% (v/v) das diferentes formulações. As barras de erro representam desvios padrão de n=2 de triplicados para cada situação em cada experiência.

3. Ensaios em condições simuladas do trato gastrointestinal

3.1. Estabilidade das NP em pH gástrico e intestinal

Para verificar a influência da variação do pH do trato G no tamanho das partículas estas foram sujeitas sequencialmente aos diversos fluídos simulados sem enzimas (gástrico (FGS) → duodenal (FDS) → intestinal (FIS) → intercelular dos enterócitos (FIES)) [69, 70](Figura 20).

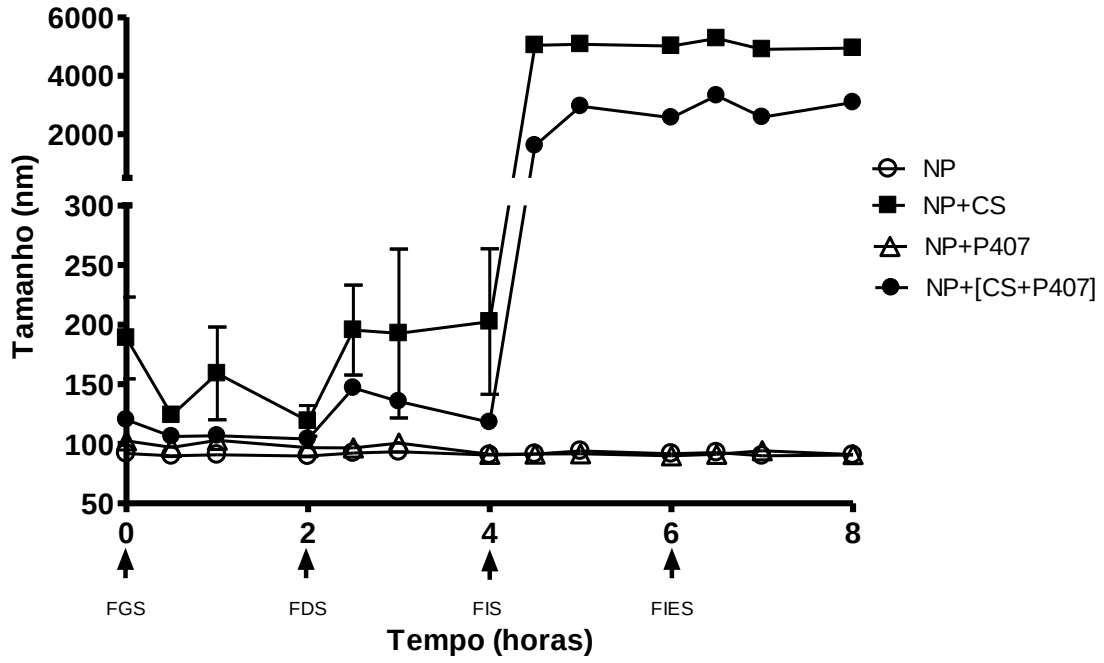

Figura 20: Variação do tamanho das formulações de NP em função do tempo e do pH gastrointestinal em fluídos simulados com média e desvios padrão de triplicados. As setas verticais indicam a mudança das formulações para o fluído seguinte. 0→2 – FGS; 2→4 – FDS; 4→6 – FIS; 6→8 – FIES.

De acordo com os resultados apresentados, as formulações NP e NP+P407 não sofrem qualquer alteração no seu tamanho ao longo da passagem pelos vários fluídos digestivos. Podemos desta forma afirmar que o revestimento das NP com P407 é inerte às variações de pH do trato GI, e as próprias partículas também são resistentes àquelas alterações.

Pelo contrário, na análise das NP revestidas com CS verifica-se uma oscilação do tamanho das partículas ao longo dos diferentes fluídos. A formulação NP+CS apresenta-se instável ao longo do tempo, mesmo enquanto permanece no mesmo fluído. Nas 2 horas de incubação em FGS, esta formulação mostrou uma oscilação de tamanhos entre aproximadamente 125 e 190 nm, o que reflete que a interação do CS com a NP em meio ácido provavelmente apresenta-se num estado transitório de

associação/desassociação. Na passagem para o FDS ocorre um aumento de tamanho das NP+CS que estabiliza nos ≈200 nm. Esta variação acompanha o aumento de pH do meio de 1,2 para 6,0. Sendo o CS um polímero catiónico (pka = 6,5) [50], no FGS vai estar na sua forma protonada o que leva a uma grande tendência de se associar à partícula de forma mais compacta. Quando passa para o FDS, com pH próximo do seu pka, parte das moléculas de CS ficam desprotonadas, levando ao relaxamento da capa de revestimento e, por isso as NP+CS aumentam de tamanho. Este fenómeno torna-se ainda mais evidente ao transferir a formulação NP+CS para o FIS (pH = 7,5), onde o tamanho médio das partículas passou para ≈5 μm. Possivelmente as moléculas de CS interagem mais fortemente entre si através de pontes de hidrogénio, o que leva à formação de redes poliméricas que aprisionam as partículas, de forma semelhante ao registado das imagens de STEM (Figura 13 A). A passagem para o FIES não causa mais alterações nas dimensões das NP+CS uma vez que o pH sofre apenas uma redução de 1 décima, de 7,5 para 7,4. Outra possibilidade para este fenómeno é a possível agregação das partículas associada à interação das cadeias poliméricas do CS com a variação do pH ao longo do trato GI.

De forma interessante, a formulação NP+[CS+P407] apresentou oscilações de tamanho com a mudança de fluído seguindo um perfil semelhante às NP+CS, embora de forma menos acentuada. Quando colocadas em FGS mantiveram as suas dimensões iniciais, tendo o seu tamanho aumentado um pouco ao serem transferidas para o FDS. Aquando da incubação das NP+[CS+P407] no FIS observou-se um aumento abrupto do tamanho das partículas para ≈2-3 μm. A menor variação de tamanho das NP+[CS+P407] face às NP+CS deve-se possivelmente à presença do P407 na formulação que de alguma forma dificultará a interação intermolecular do CS, conferindo estabilidade à formulação.

As imagens de microscopia confocal apresentadas nas figuras 15 e 16 mostravam uma fluorescência difusa do CS-AF647, não sendo claro se realmente o polímero apenas se encontrava associado à superfície da NP ou disperso no meio envolvente. Com os resultados apresentados na figura 20 podemos inferir que apesar do CS se encontrar no fluído envolvente da partícula, também se deposita à sua superfície e, de alguma forma, consegue criar uma rede entre todas as partículas que ficam aprisionadas pelo polímero presente no fluído envolvente.

3.2. Degradação das NP no trato gastrointestinal

A alteração de pH a que as formulações são sujeitas durante o seu trajeto pelo trato GI, além de induzir algumas modificações no seu tamanho, pode levar à degradação das NPs, especialmente considerando que têm natureza proteica. Assim, antes de prosseguir com os ensaios *ex vivo* de permeabilidade em

intestino de porco, analisou-se a degradação das formulações após passagem pelo FGS e FDS, simulando o estado das NP à chegada ao intestino.

A degradação das NP no trato GI foi determinada pela quantificação da BSA libertada para o meio após incubação das formulações nos fluídos GI simulados. Usaram-se NP produzidas com BSA-FITC e revestidas ou não com CS e P407. Colocaram-se as formulações numa membrana de diálise com MWCO de 100kDa, incubou-se sequencialmente no FGS e FDS, como anteriormente, e mediu-se fluorescência do FITC. A BSA-FITC detetada nos fluídos permite avaliar a perda de proteína durante este ensaio, correspondente à degradação das partículas. Estes resultados encontram-se representados na figura 21 e anexo I (curva padrão de fluorescência de FITC para a determinação da concentração de BSA).

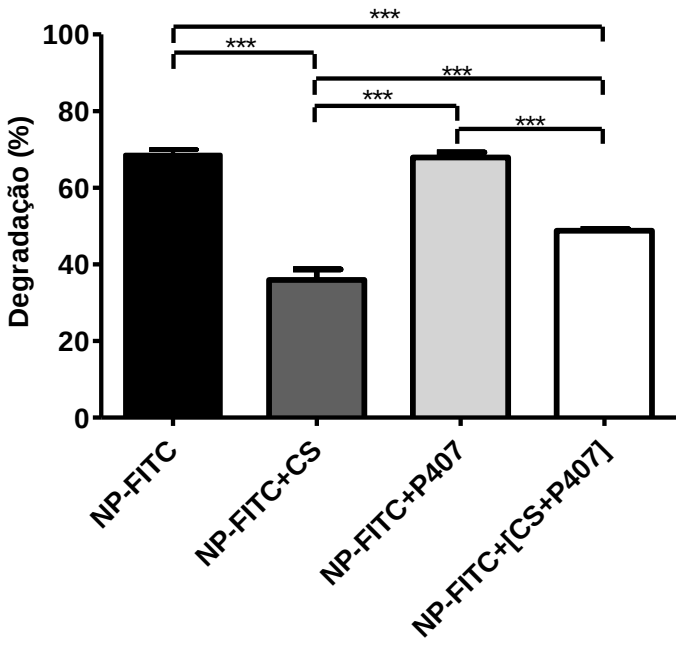

Figura 21: Degradação das NP após incubação sequencial nos fluídos digestivos FGS e FDS (ensaio representativo de n=2, com média e desvios padrão de triplicados). As diferenças estatisticamente significativas entre as diversas formulações estão assinaladas com *** em que p<0,001.

Da análise do gráfico da figura 21 é possível concluir que a passagem pelos fluídos digestivos FGS e FDS leva a uma elevada degradação das partículas. As formulações NP-FITC e NP-FITC+P407 são as que sofrem a maior degradação, sendo que cerca de 70% da BSA constituinte da partícula foi detetada no fluído digestivo. O P407 não confere qualquer efeito protetor às NP quando apenas este polímero é usado no revestimento das partículas, uma vez não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre NP-FITC e NP-FITC+P407. Pelo contrário, o CS parece proteger parcialmente as partículas da degradação devida à passagem pelos fluídos digestivos, já que a formulação NP-FITC+CS apresenta metade da percentagem de partículas degradadas (≈35%), relativamente às NP não

revestidas. Curiosamente, o revestimento com ambos os polímeros piora o efeito protetor do CS, tendo-se detetado uma degradação de ≈50% das partículas NP-FITC+[CS+P407].

4. Ensaios *ex vivo* de permeabilidade em intestino de porco

Como referido no capítulo III secção 2.7.3, para a avaliação da permeabilidade das formulações em intestino de porco foram abordadas diversas estratégias que, apesar de não fornecerem resultados inequívocos quanto à passagem das partículas através do intestino para a corrente sanguínea, analisando o seu conjunto conseguimos inferir algumas conclusões.

Todas as formulações preparadas com 10% de BSA-FITC foram primeiramente incubadas em FGS e FDS, de forma a simular a administração oral (Capítulo III, secção 2.4). Depois, foram colocadas em contacto com a mucosa intestinal durante 4 horas e recolheu-se o fluído da câmara recetora de uma célula de Franz para deteção das partículas que permearam o intestino.

4.1. Quantificação da BSA

De forma semelhante ao ensaio anterior, quantificou-se a fluorescência do FITC correspondente à BSA presente no fluído recetor. A existência de fluorescência neste compartimento permitirá afirmar a passagem de proteína resultante da constituição das partículas.

Após a incubação de todas as formulações com a mucosa intestinal foi possível detetar fluorescência nos fluídos recetores, tal como apresentado na figura 22 e tabela 8 do anexo III. Estes resultados demonstram que a BSA-FITC das NP sem qualquer revestimento consegue atravessar o intestino de porco, de forma semelhante à das formulações NP-FITC+P407 e NP-FITC+[CS+P407] (≈35%). A presença do CS, apesar de ter demonstrado conferir proteção à degradação pelos fluídos digestivos FGS e FDS (Figura 21), por si só não concede nenhuma vantagem ao nível da permeabilidade intestinal, visto as NP-FITC+CS serem a formulação com menor capacidade de difusão (≈18%). Este facto pode dever-se, por um lado, ao aprisionamento das NP-FITC na rede polimérica criada pelo CS em solução. Por outro lado, a menor degradação destas partículas nos fluidos digestivos simulados, poderá manter a estabilidade da estrutura das NP-FITC, dificultando o acesso da BSA ao epitélio. Em contrapartida, a presença concomitante do P407 com CS como revestimento das partículas NP-FITC+[CS+P407] que, nos testes anteriores até piorava o benefício do CS a nível de proteção da degradação, no que toca à permeabilidade o P407 apresenta-se como um composto capaz de melhorar os valores de permeabilidade das NP-FITC+CS. Esta particularidade deve-se ao possível efeito do P407 como indutor da libertação das partículas da rede polimérica formada pelo CS. Estes fenómenos podem estar associados à capacidade do CS e do P407 serem respetivamente mucoadesivos e mucopenetrantes [60].

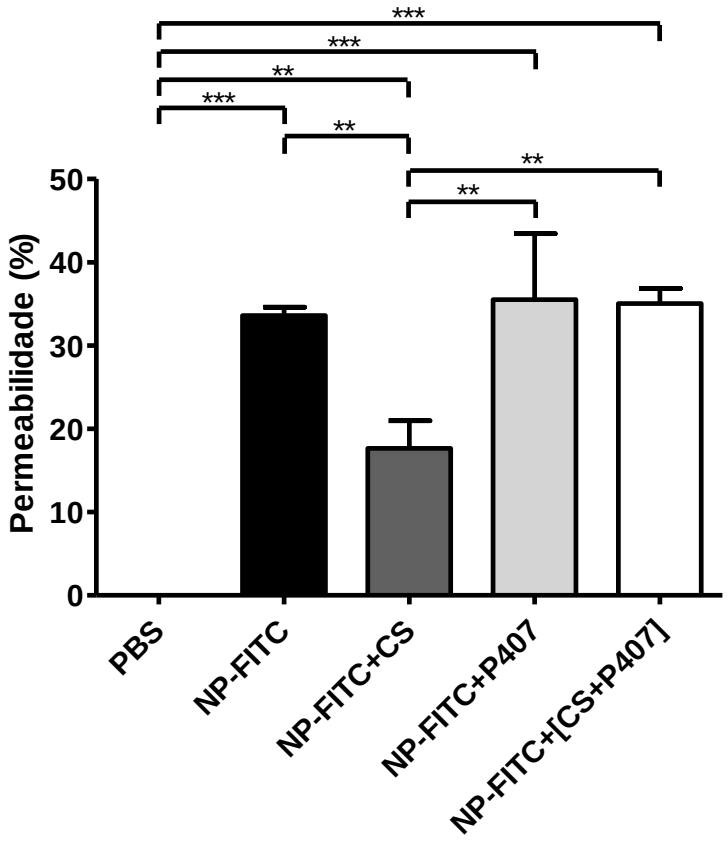

Figura 22: Permeabilidade das diferentes formulações intestino de porco quantificada pela relação da variação da massa de BSA-FITC inicial e final (ensaio representativo de n=2, com média e desvio padrão de triplicados). As diferenças estatisticamente significativas entre as diversas formulações estão assinaladas com ** em que p<0,01 e*** em que p<0,001.

Apesar de se ter detetado fluorescência nos fluídos recetores, é necessário salvaguardar que este sinal provém das moléculas de FITC utilizadas na constituição da partícula (NP-FITC). Com a realização deste ensaio não é possível afirmar que as NP-FITC estão a atravessar a mucosa intestinal; pode apenas estar a ocorrer a permeação do conjugado BSA-FITC resultante da degradação da partícula ou até mesmo só do fluoróforo que poderá ter-se libertado do conjugado BSA-FITC.

4.2. Deteção de partículas

Mais informativo do que a quantificação de BSA no fluído recetor da célula de Franz será quantificar o número de partículas. Apesar de não gerarem resultados inequívocos, utilizaram-se duas estratégias para a quantificação de partículas: citometria de fluxo para análise das partículas por fluorescência e análise do seguimento de partículas (*nanoparticle tracking analysis* – NTA) para deteção do tamanho das partículas.

4.2.1. Citometria de fluxo

Os resultados apresentados na figura 23 mostram as formulações após a sua produção. Ao analisar o controlo PBS, ausente de NP, podemos verificar que as NP-FITC possuem o mesmo tamanho que os detritos dos sistemas de fluxo do citómetro. Assim, a população FITC negativa corresponderá não a NP que não estejam marcadas (uma vez que o método de produção utilizado incorpora de forma homogénea a mesma quantidade de fluoróforo nas partículas), mas aos detritos do citómetro. Para todas as formulações, é bem evidente a marcação com FITC antes dos ensaios biológicos. Espera-se que, após incubação com os fluídos FGS e FDS e subsequente contacto com a mucosa intestinal se consiga detetar algum sinal no canal do FITC nos fluídos recetores da célula de Franz. Estes resultados estão apresentados nas figuras 24 e 25.

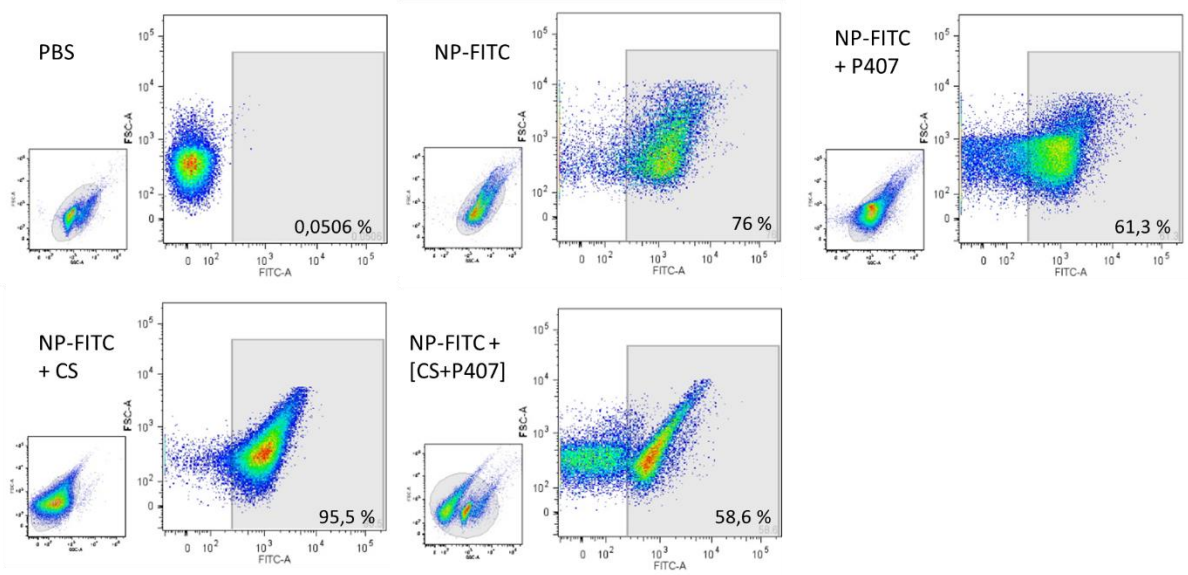

Figura 23: Gráficos de densidade obtidos por análise por citometria de fluxo das formulações antes do ensaio de permeabilidade intestinal. Para cada situação mostra-se a população analisada através dos parâmetros de tamanho e complexidade (FSC *vs* SSC) (quadrado pequeno) e tamanho em função da fluorescência do FITC (quadrado grande), em que a área sombreada corresponde à percentagem de partículas fluorescentes. Experiência representativa de n=2.

Com a análise da figura 24 podemos verificar a presença de eventos fluorescentes nos fluídos recetores das formulações NP-FITC, NP-FITC+CS e NP-FITC+[CS+P407]. A formulação NP-FITC é a que apresenta maior número de eventos fluorescentes, com diferenças estatisticamente significativas, comparando com as restantes formulações. As NP-FITC+CS e NP-FITC+[CS+P407] têm menos de metade de eventos fluorescentes relativamente às NP-FITC, sem diferenças estatisticamente significativas entre elas. Já a formulação NP+P407, apresenta apenas um valor residual no número de eventos fluorescentes.

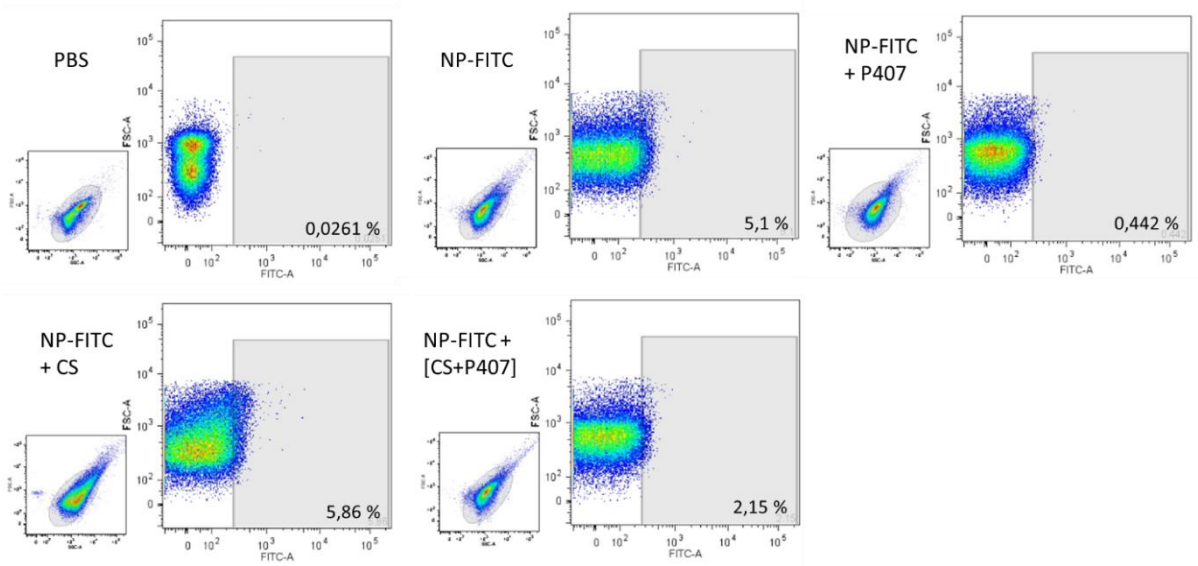

Figura 24: Gráficos de densidade obtidos por análise por citometria de fluxo dos fluídos recetores após incubação das formulações com mucosa intestinal. Para cada situação mostra-se a população analisada através dos parâmetros de tamanho e complexidade (FSC *vs* SSC) (quadrado pequeno) e tamanho em função da fluorescência do FITC (quadrado grande), em que a área sombreada corresponde à percentagem de partículas fluorescentes. Experiência representativa de n=2.

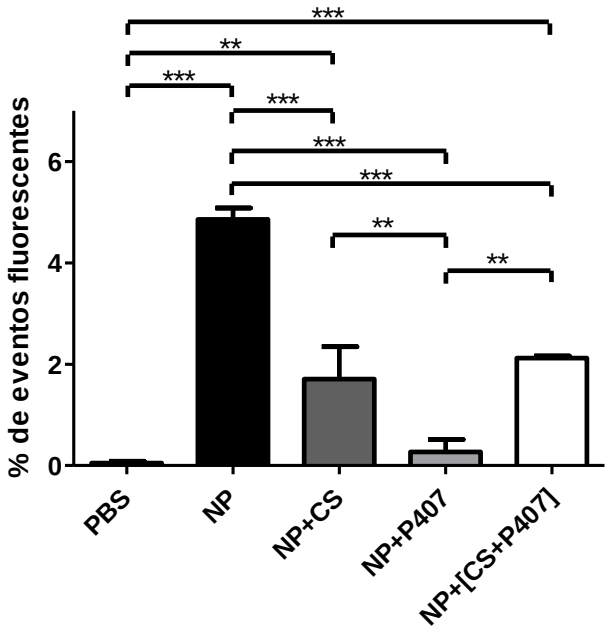

Figura 25: Formulações de NP presentes nos fluídos recetores após a incubação em intestino de porco durante 4 horas. Experiência representativa de n=2, com média e desvio padrão de triplicados.

Como referido relativamente ao ensaio de permeabilidade de partículas, a existência de fluorescência não significa a presença de partículas intactas. O fluoróforo livre ou conjugado com BSA libertada da partícula pode adsorver aos detritos dos sistema de fluxo do citómetro e dar um sinal equivalente aos

das NP-FITC. No entanto, interrelacionando os resultados obtidos pela fluorescência detetada na quantificação de BSA (Figura 22) e estes resultados de citometria, poderá conseguir-se desambiguar algumas situações.

Por exemplo, no ensaio de quantificação de BSA (Figura 22), a elevada fluorescência detetada para a formulação NP-FITC+P407 deverá ser proveniente do FITC derivado da degradação da partícula, visto os resultados de citometria para esta formulação mostrarem um menor número de eventos fluorescentes. Nas restantes formulações permanece a mesma dúvida acerca da presença de partículas fluorescentes nos fluídos recetores que poderão ser resultados falso-positivos, como referido anteriormente.

Na tentativa de esclarecer esta situação, analisaram-se os fluídos recetores através de uma técnica que permita a visualização das partículas.

4.2.2. Análise do seguimento de partículas – NTA

Com o objetivo de detetar as NP nos fluídos recetores após incubação com a mucosa intestinal, fez-se uma análise de seguimento de partículas com o NanoSight NS 500.

Esta técnica utiliza o seguimento do movimento Browniano de cada partícula para determinar as suas dimensões, segundo a equação de Stokes-Einstein: quanto mais rápida a partícula se mover, menor o seu raio hidrodinâmico. A dispersão da luz pelas partículas permite a sua visualização através de uma câmara instalada no equipamento. Os resultados destes ensaios estão apresentados nas figuras 26 e 27.

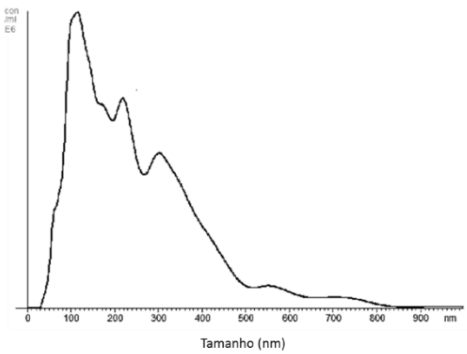

Figura 26: Análise de seguimento das NP-FITC após produção (ensaio representativo de n=2).

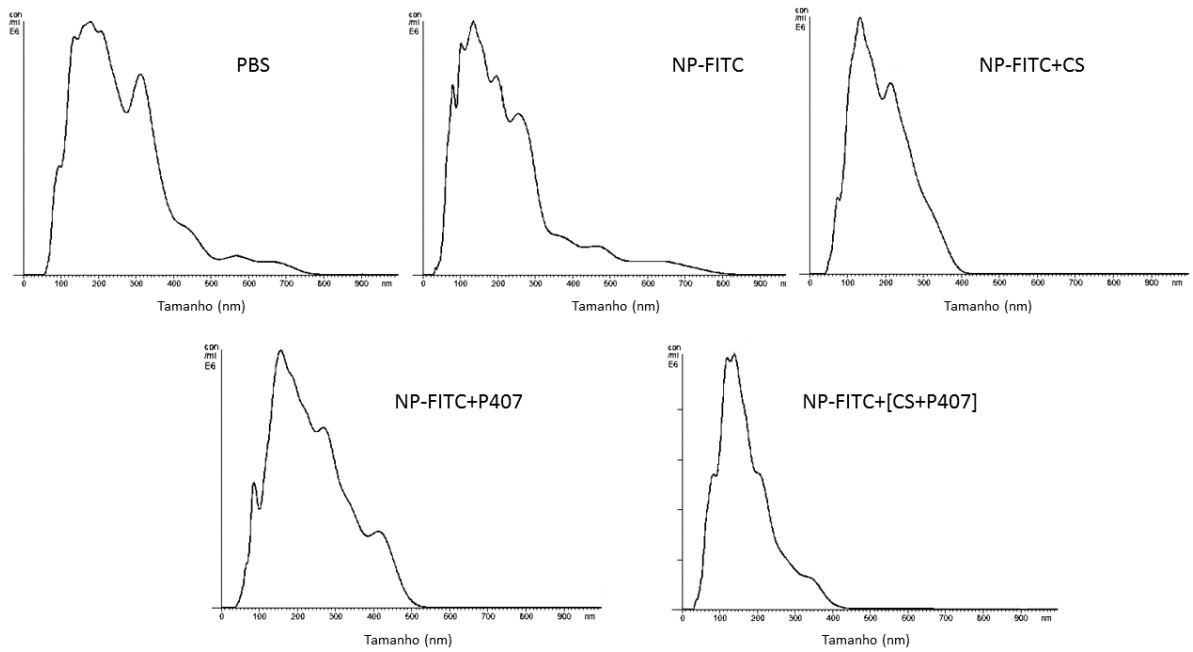

Figura 27: Análise de seguimento das partículas nos fluídos recetores das células de Franz após incubação das diferentes formulações e controlo negativo (PBS) com a mucosa intestinal (ensaio representativo de n=2).

Infelizmente, com esta técnica não nos foi possível retirar uma conclusão acerca da permeabilidade do intestino às partículas, visto que no fluído controlo PBS (Figura 27) encontram-se corpúsculos de detritos celulares com tamanhos próximos das NP-FITC em análise (≈115 nm; Figura 26) e os perfis dos fluídos recetores de cada formulação são semelhantes entre si (Figura 27).

Capítulo V

Conclusões e Trabalho Futuro

1. Conclusões

A análise global do trabalho desenvolvido permite verificar que é possível revestir micro- e nanopartículas de BSA por adsorção com os polímeros quitosano (CS) e poloxamer 407 (P407) à sua superfície. A indicação de sucesso dos revestimentos com CS e CS+P407 aconteceu logo após a sua síntese, uma vez que se determinou uma variação do tamanho das NP antes e após a adição das soluções de polímeros. Em contrapartida, o revestimento das NP com o P407 apenas foi possível de confirmar com recurso a microscopia confocal e eletrónica de varrimento em transmissão.

A variação de tamanho das partículas associado às imagens obtidas por microscopia permitiram compreender melhor a interação dos dois polímeros com a partícula, inferindo-se que a mistura dos polímeros gera um revestimento organizado com a NP, em que o P407 se localiza na sua periferia, em contacto íntimo com a cápsula de BSA, e o CS predomina no fluído envolvente.

Os testes de citotoxicidade realizados permitiram concluir que as formulações não provocam qualquer tipo de alteração da viabilidade celular nas células de carcinoma colo-rectal *Caco-2*, pelo que são seguras para a execução de ensaios biológicos.

Os ensaios realizados em condições simuladas do trato GI mostraram que os diferentes pH encontrados no trajeto das formulações após administração oral leva a alterações nos tamanhos das partículas. Estas alterações poderão estar associadas a uma instabilidade no empacotamento do CS ao redor das NP, relacionada com a modificação do grau de protonação do polímero, com a variação entre os pH dos fluídos gástricos, duodenal e intestinal. No fluído intestinal simulado, as partículas revestidas por CS (NP+CS e NP+[CS+P407]) ficarão aprisionadas numa rede formada por interações inter e intramoleculares, o que não se verifica nas restantes formulações. Outra possível hipótese é baseada numa redução do número de contagens de partículas (dados não apresentados). Associando o aumento de tamanho das partículas com uma redução de contagens podemos sugerir que está a ocorrer o aprisionamento de várias NP aquando a passagem pelas condições simuladas do trato GI.

A presença dos diferentes revestimentos, com a exceção da formulação NP+P407, confere às partículas um efeito protetor dos fluídos gástrico e duodenal, permitindo o alcance de um maior número de partículas intactas ao intestino, local onde as NP serão absorvidas.

Nos ensaios de permeabilidade intestinal, usaram-se NP marcadas com um fluoróforo, de forma a permitir quantificar, idealmente, as partículas que foram absorvidas pela mucosa. No entanto, a deteção de fluorescência nos fluídos recetores não nos permite afirmar a presença de NP, mas apenas que parte da composição das partículas conseguiu atravessar a membrana epitelial do intestino. Não excluímos, por isso, a possibilidade do sinal detectado se dever a NP que se dissociaram.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo permitem afirmar que os dados de fluorescência carecem de inequivocidade. Conjuntamente, estes resultados demonstram que, apesar da elevada permeabilidade apresentada pela formulação NP-FITC+P407, a fluorescência detetada não se encontra associada a partículas fluorescentes mas a um sinal difuso possivelmente proveniente da BSA-FITC ou do FITC isolado resultantes da degradação das NP. Contudo, os resultados de citometria também não são suficientes para demonstrar que as restantes formulações permitem a absorção de NP pela mucosa intestinal, visto os detritos dos sistema de fluxo do citómetro serem do mesmo tamanho que as partículas em análise. Aditivamente, os ensaios executados no NanoSight NS 500 também não esclareceram os nossos resultados. Embora, a população de partículas presente nos fluídos recetores das formulações têm dimensões da gama das NP desejadas, os artefactos presentes no fluído controlo (PBS) apresentam um perfil com tamanhos muito próximos dos das NP em análise, o que não nos permite confirmar a presença de NP no fluído recetor.

É necessário salientar que os resultados obtidos ao longo deste trabalho são promissores no sentido em que formulação NP+[CS+P407] consegue associar uma boa conjugação entre proteção dos fluídos digestivos e absorção intestinal. Já a formulação NP+CS apresenta-se como a que confere a maior proteção às partículas mas também como a que possui menor permeabilidade pelo intestino. A formulação NP+P407 é a que menor efeito surte no revestimento das NP. Contudo, é uma mais valia continuar a sua análise como controlo que permita compreender melhor a variação da presença do P407 no revestimento constituído pelos dois polímeros.

2. Trabalho futuro

Na continuidade deste trabalho é necessário desenvolver um método capaz de detetar a presença inequívoca de NP nos fluídos recetores, na sua forma intacta sem alteração da morfologia e/ou função. Uma possível abordagem é a avaliação da presença de partículas fluorescentes em cortes da mucosa intestinal onde as partículas estão a ser incubadas. Se estas se encontrarem numa zona mais profunda da mucosa existe uma maior possibilidade destas serem absorvidas para a corrente sanguínea. Contudo a visualização de fluorescência nos cortes da mucosa pode continuar associada a BSA-FITC degradada da partícula e não da partícula na sua estrutura funcional.

A marcação das NP com fluoróforos capazes de serem detetados pelo NanoSight NS 500 é uma estratégia a abordar. Para isto, será necessário conjugar quimicamente a BSA, constituinte estrutural da partícula, com um fluoróforo detetável com o par laser/filtro existente no equipamento.

Outra possível abordagem será a utilização de uma técnica como transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) [80], em que, com recurso a dois fluoróforos será possível a marcação do núcleo hidrofóbico da partícula e da cápsula de BSA. A associação destes fluoróforos permitirá compreender se nos fluídos recetores estão presentes NP íntegras (manutenção da fluorescência) ou degradadas (alteração do comprimento de onda do máximo de emissão).

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

1. Sonaje, K., et al., *Self-Assembled pH-Sensitive Nanoparticles: A Platform for Oral Delivery of Protein Drugs.* Advanced Functional Materials, 2010. **20**(21): p. 3695-3700.
2. Schiller, J.H., et al., *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer.* New England Journal of Medicine, 2002. **346**(2): p. 92-98.
3. Zhong, R., et al., *Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2011. **60**(10): p. 1497-1502.
4. Jordan, A., et al., *Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. **201**(1–3): p. 413-419.
5. Haley, B. and E. Frenkel, *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment.* Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2008. **26**(1): p. 57-64.
6. Goldberg, M. and I. Gomez-Orellana, *Challenges for the oral delivery of macromolecules.* Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(4): p. 289-295.
7. Banting, F., et al., *The effect of pancreatic extract (insulin) on normal rabbits.* Am J Physiol, 1922. **62**: p. 162-176.
8. McLean, J., *The thromboplastic action of cephalin.* Am J Physiol, 1916. **41**(250): p. 57.
9. Camenisch, G., et al., *Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight.* European journal of pharmaceutical sciences, 1998. **6**(4): p. 313-319.
10. Rhoades, R.A. and R.G. Pflanzer, *Human Physiology (with CD-ROM and Infotrac)*. 2003: Brooks/Cole Publishing Company.
11. des Rieux, A., et al., *Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery.* Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(6): p. 833-844.
12. Lodish, H., *Molecular cell biology*. 2008: Macmillan.
13. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.* Cell, 1996. **84**(3): p. 345-357.
14. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(4): p. 285-293.

15. Bartsch, U., *Neural CAMS and their role in the development and organization of myelin sheaths.* Front Biosci, 2003. **8**: p. d477-d490.
16. Winterhager, E., *Gap junctions in development and disease*. 2005: Springer.
17. Banan, A., et al., *θ Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **313**(3): p. 962-982.
18. Neutra, M.R., A. Frey, and J.-P. Kraehenbuhl, *Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization.* Cell, 1996. **86**(3): p. 345-348.
19. Kelsall, B. and W. Strober, *Gut-associated lymphoid tissue: antigen handling and T-lymphocyte responses.* Mucosal immunology, 1999. **293**.
20. Neutra, M.R., E. Pringault, and J.-P. Kraehenbuhl, *Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses.* Annual review of immunology, 1996. **14**(1): p. 275-300.
21. Kraehenbuhl, J.-P. and M.R. Neutra, *Epithelial M cells: differentiation and function.* Annual review of cell and developmental biology, 2000. **16**(1): p. 301-332.
22. Deplancke, B. and H.R. Gaskins, *Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer.* The American journal of clinical nutrition, 2001. **73**(6): p. 1131S-1141S.
23. Van den Mooter, G. and R. Kinget, *Oral colon-specific drug delivery: a review.* Drug delivery, 1995. **2**(2): p. 81-93.
24. Yang, L., J.S. Chu, and J.A. Fix, *Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation.* International Journal of Pharmaceutics, 2002. **235**(1–2): p. 1-15.
25. Woodley, J.F., *Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery.* Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 1993. **11**(2-3): p. 61-95.
26. TOZAKI, H., et al., *Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: implications in peptide delivery to the colon.* Journal of pharmacy and pharmacology, 1997. **49**(2): p. 164-168.
27. Dive, A., et al., *Effect of dopamine on gastrointestinal motility during critical illness.* Intensive care medicine, 2000. **26**(7): p. 901-907.
28. Charman, W.N., et al., *Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH.* Journal of pharmaceutical sciences, 1997. **86**(3): p. 269-282.

29. Kimura, Y., et al., *Degradation of azo-containing polyurethane by the action of intestinal flora: its mechanism and application as a drug delivery system.* Polymer, 1992. **33**(24): p. 5294-5299.
30. Bernkop-Schnürch, A., *The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins.* Journal of controlled release, 1998. **52**(1): p. 1-16.
31. Bernkop-Schnurch, A. and G. Walker, *Multifunctional matrices for oral peptide delivery.* Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2001. **18**(5).
32. Mathiowitz, E., et al., *Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.* Nature, 1997. **386**(6623): p. 410-414.
33. Yeh, T.-H., et al., *Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening.* Biomaterials, 2011. **32**(26): p. 6164-6173.
34. Jung, T., et al., *Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 147-160.
35. Florence, A.T. and N. Hussain, *Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas.* Advanced drug delivery reviews, 2001. **50**: p. S69-S89.
36. Kompella, U.B. and V.H. Lee, *Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations.* Advanced drug delivery reviews, 2001. **46**(1): p. 211-245.
37. Allen, T., et al., *Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1991. **1061**(1): p. 56-64.
38. Ilium, L., *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.* Pharmaceutical research, 1998. **15**(9): p. 1326-1331.
39. Ravi Kumar, M.N., *A review of chitin and chitosan applications.* Reactive and functional polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.
40. Rouget, C., *Des substances amylacees dans le tissue des animux, specialement les Articules (Chitine).* Compt Rend, 1859. **48**: p. 792.
41. Hoppe-Seyler, F., *Ueber chitin und cellulose.* Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1894. **27**(3): p. 3329-3331.
42. Roelofsen, P.A. and I. Hoette, *Chitin in the cell wall of yeasts.* Antonie van Leeuwenhoek, 1951. **17**(1): p. 297-313.

43. Anderson, J., R. Nicolosi, and J. Borzelleca, *Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy.* Food and Chemical Toxicology, 2005. **43**(2): p. 187-201.

44. Blair, H.S., et al., *Chitosan and modified chitosan membranes I. Preparation and characterisation.* Journal of Applied Polymer Science, 1987. **33**(2): p. 641-656.

45. Vårum, K.M., et al., *In vitro degradation rates of partially< i> N</i>-acetylated chitosans in human serum.* Carbohydrate Research, 1997. **299**(1): p. 99-101.

46. Huang, M., E. Khor, and L.-Y. Lim, *Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation.* Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 344-353.

47. Errington, N., et al., *Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation.* International Journal of Biological Macromolecules, 1993. **15**(2): p. 113-117.

48. Dodane, V. and V.D. Vilivalam, *Pharmaceutical applications of chitosan.* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(6): p. 246-253.

49. Lehr, C.-M., et al., *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers.* International journal of Pharmaceutics, 1992. **78**(1): p. 43-48.

50. He, P., S.S. Davis, and L. Illum, *In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres.* International Journal of Pharmaceutics, 1998. **166**(1): p. 75-88.

51. Illum, L., N.F. Farraj, and S.S. Davis, *Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs.* Pharmaceutical research, 1994. **11**(8): p. 1186-1189.

52. Artursson, P., et al., *Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2).* Pharmaceutical research, 1994. **11**(9): p. 1358-1361.

53. Thanou, M., J. Verhoef, and H. Junginger, *Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **50**: p. S91-S101.

54. Matter, K. and M.S. Balda, *Signalling to and from tight junctions.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(3): p. 225-237.

55. Sheth, P., et al., *Protein phosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers.* Biochem. J, 2009. **421**: p. 59-70.

56. Kabanov, A.V., E.V. Batrakova, and V.Y. Alakhov, *Pluronic< sup>®</sup> block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery.* Journal of Controlled Release, 2002. **82**(2): p. 189-212.

57. Takats, Z., K. Vekey, and L. Hegedüs, *Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001. **15**(10): p. 805-810.

58. Dumortier, G., et al., *Rheological study of a thermoreversible morphine gel.* Drug development and industrial pharmacy, 1991. **17**(9): p. 1255-1265.

59. Dumortier, G., et al., *A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.* Pharmaceutical research, 2006. **23**(12): p. 2709-2728.

60. Chen, D., et al., *Comparative study of Pluronic< sup>®</sup> F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats.* International journal of pharmaceutics, 2013.

61. Li, X., et al., *Novel mucus-penetrating liposomes as a potential oral drug delivery system: preparation, in vitro characterization, and enhanced cellular uptake.* International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 3151.

62. Nogueira, E., et al., *Liposome and protein based stealth nanoparticles.* Faraday Discussions, 2013. **166**(0): p. 417-429.

63. Suslick, K.S. and M.W. Grinstaff, *Protein microencapsulation of nonaqueous liquids.* Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(21): p. 7807-7809.

64. Silva, R., et al., *Protein microspheres as suitable devices for piroxicam release.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **92**: p. 277-285.

65. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.

66. Prochazkova, S., K.M. Vårum, and K. Ostgaard, *Quantitative determination of chitosans by ninhydrin.* Carbohydrate polymers, 1999. **38**(2): p. 115-122.

67. Neises, B. and W. Steglich, *Simple method for the esterification of carboxylic acids.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1978. **17**(7): p. 522-524.

68. Mao, Y., et al., *Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **35**(5): p. 1127-1142.

69. 30, U., *United States Pharmacopoeial Convention*, 2007, Mack Printing Rockville.

70. Feng, C., et al., *Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery:< i> In vitro</i> and< i> in vivo</i> evaluation.* International journal of pharmaceutics, 2013. **457**(1): p. 158-167.

71. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.* Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1–2): p. 55-63.

72. Medical, C. *Where do SIS products come from?* [cited 2014 23/9/2014]; Available from: http://www.cookbiotech.com/Tech_wherebiodesignfrom.php.

73. Nogueira, E., et al., *Liposome and protein based stealth nanoparticles.* Faraday discussions, 2013. **166**: p. 417-429.

74. Mohanraj, V. and Y. Chen, *Nanoparticles-a review.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2007. **5**(1): p. 561-573.

75. Instruments, M., *Zetasizer Nano Series User Manual* 2004, Malvern Instruments Ltd: England. p. 6.

76. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications.* Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.

77. Pandit, N.K. and D. Wang, *Salt effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407 gels.* International journal of pharmaceutics, 1998. **167**(1): p. 183-189.

78. Silva, R., et al., *Insights on the Mechanism of Formation of Protein Microspheres in a Biphasic System.* Molecular Pharmaceutics, 2012. **9**(11): p. 3079-3088.

79. Tzitzios, V., et al., *Synthesis and Characterization of 3D CoPt Nanostructures.* Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(40): p. 13756-13757.

80. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer.* Current opinion in biotechnology, 1995. **6**(1): p. 103-110.

Capítulo VII

Anexos

Anexo I – Curvas padrão

Curva padrão de BSA

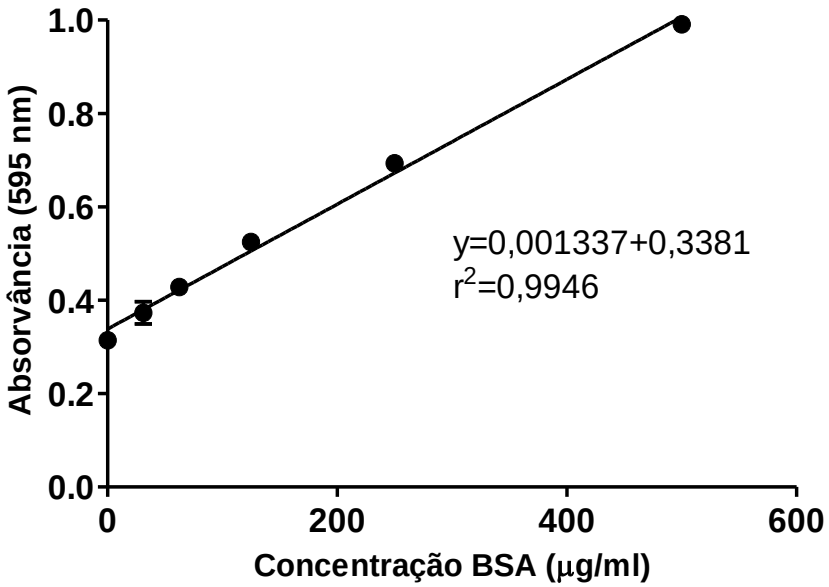

Figura 28: Curva padrão de concentrações de BSA (µg/ml) realizada com padrões de 0,00; 31,25; 62,5;125; 250; 500 µg/ml e leitura da absorvância a 595 nm.

Curva padrão de quitosano

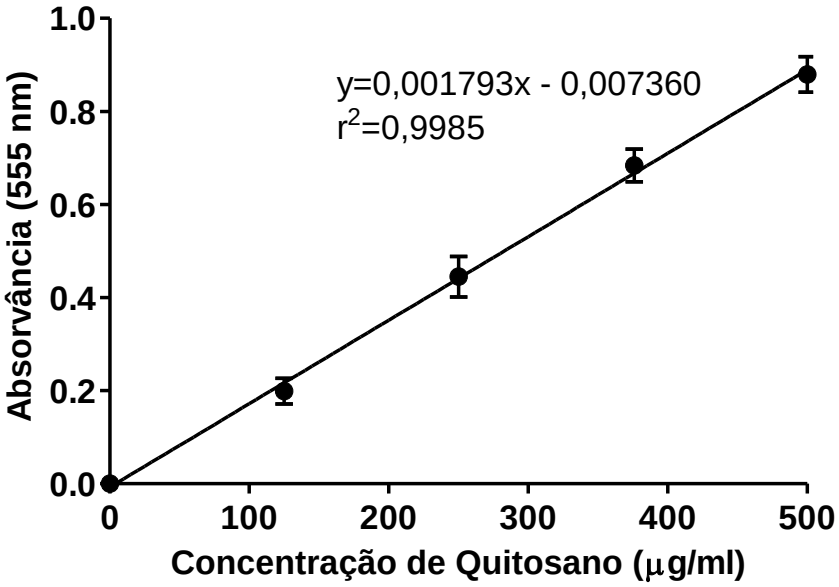

Figura 29: Curva padrão de concentrações de quitosano (µg/ml) realizada com padrões 0; 125; 250; 376; 500 µg/ml e leitura da absorvância a 555 nm.

Curva padrão de poloxamer 407

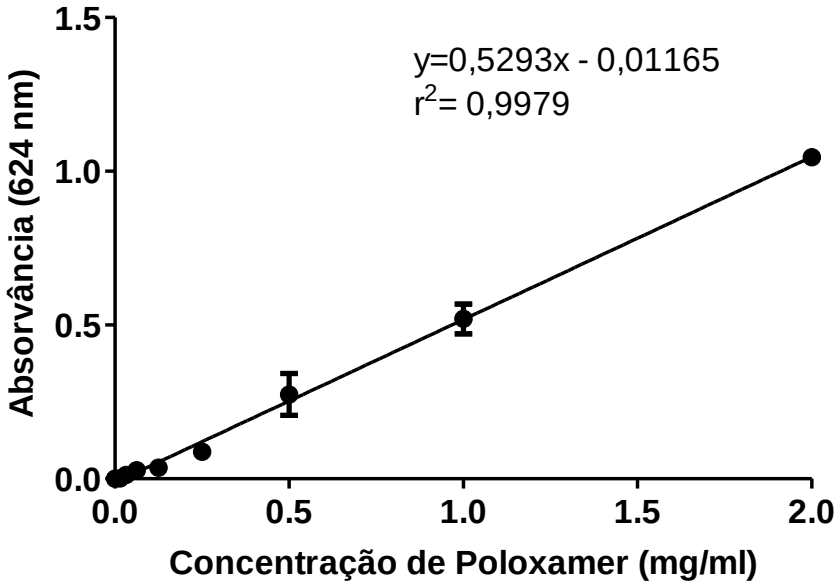

Figura 30: Curva padrão de concentrações de poloxamer 407 (mg/ml) realizada com padrões 0; 0,015; 0,032; 0,0625; 0125; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/ml e leitura da absorvância a 624 nm.

Curva padrão de Alexa Fluor 647

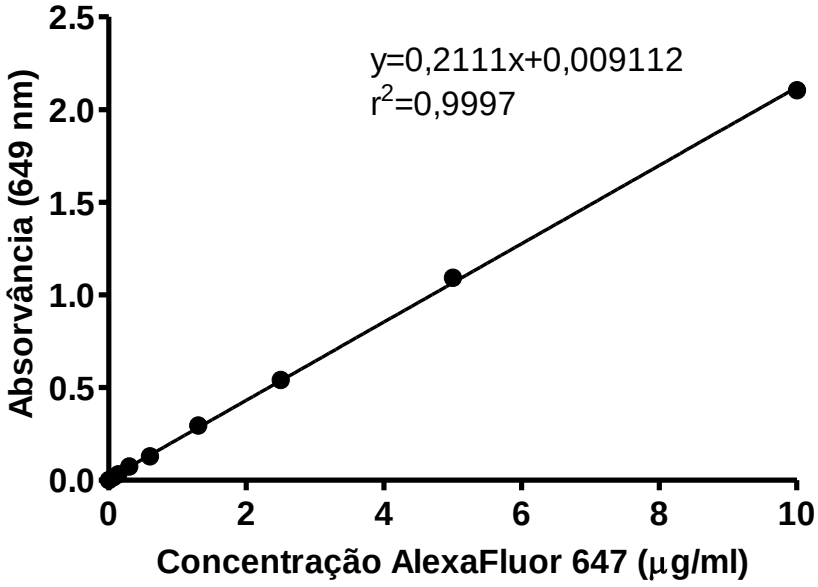

Figura 31: Curva padrão de concentrações de Alexa Fluor 647 (µg/ml) realizada com padrões 0; 0,07; 0,14; 0,3; 0,6; 1,3; 2,5; 5; 10 µg/ml e leitura da absorvância a 649 nm.

Curva padrão de rodamina B

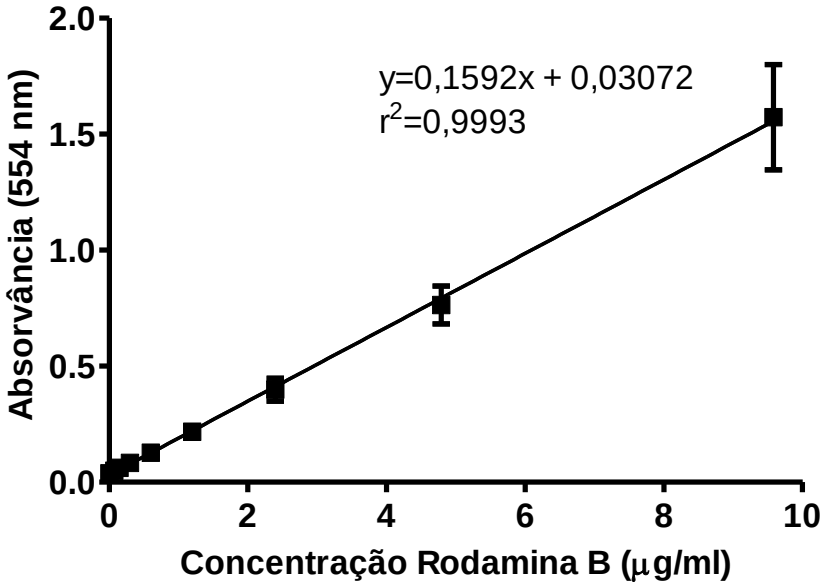

Figura 32: Curva padrão de concentrações de rodamina B (µg/ml) realizada com padrões 0; 0,75; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6 µg/ml e leitura da absorvância a 554nm.

Curva padrão BSA-FITC

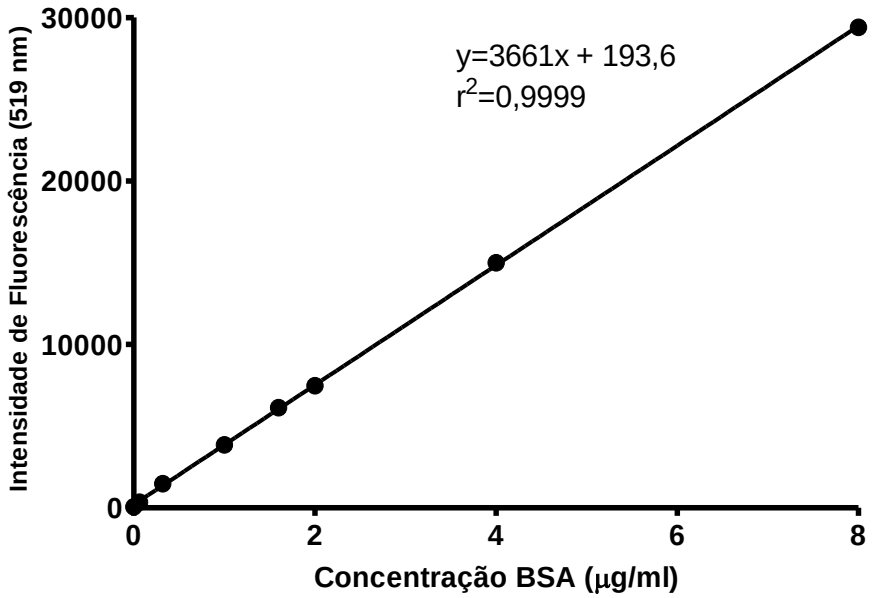

Figura 33: Curva padrão de concentrações de BSA-FITC (µg/ml) realizada com padrões de 0; 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5µg/ml e leitura da intensidade de fluorescência a 519 nm.

Anexo II – Soluções e reagentes

Soluções *stock* dos polímeros de revestimento

A solução *stock* de P407 foi preparada por dissolução do polímero (Sigma-Aldrich, Espanha) em PBS pH 7,4 para uma concentração final de 30 mg/ml.

A solução *stock* de CS foi preparada por dissolução de CS low MW (Sigma-Aldrich, Espanha) em 1% de ácido acético (Sigma-Aldrich, Espanha) para uma concentração final de 20 mg/ml. Para a solubilização total do polímero esta solução permaneceu em agitação durante a noite a cerca de 40-50 °C. E depois de arrefecida foi filtrada por membrana de 0,45 μm.

As soluções dos polímeros foram posteriormente armazenadas a 4 °C.

Solução *stock* de tiocianato de cobalto II

A solução *stock* de Tiocianato de Cobalto II resulta da dissolução de 3 mg de cobalto II (Sigma-Aldrich, Espanha) e 20 g de tiocianato de amónia (Sigma-Aldrich, Espanha) em 100 ml de água desionizada (dH_2O).

Fluídos digestivos simulados

Os fluídos digestivos simulados foram preparados de acordo com o publicado por Feng *et al.*[70]

- FGS – 0,03 M NaCl (Sigma-Aldrich, Espanha), pH 1,2
- FDS – 30% FGS e 70% FIS, pH 6
- FIS – 0,05 M KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Espanha), pH 7,5
- FIES – FIS ajustado a pH 7,4

Anexo III – Resultados suplementares

Imagem das MP-FITC obtida por microscopia eletrónica de varrimento em transmissão

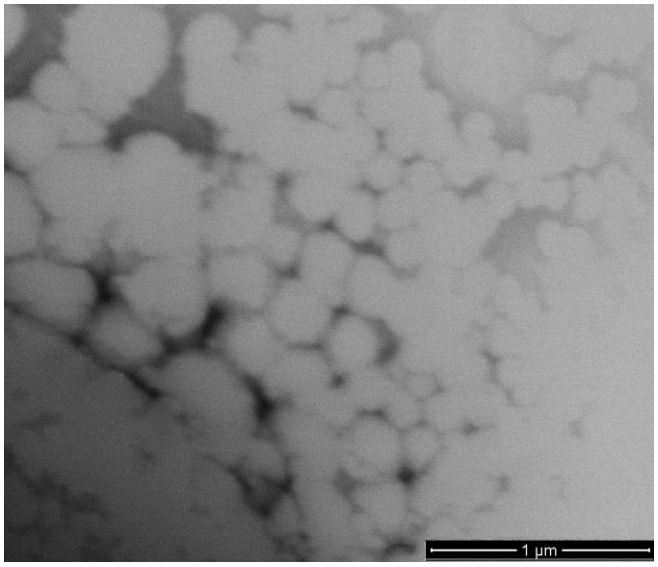

Figura 34: Microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão das MP-FITC.

Grau de conjugação dos polímeros com os marcadores fluorescentes

Tabela 6: Grau de conjugação dos polímeros com os marcadores fluorescentes.

	Grau de conjugação
P407	0,168 mol Rho B/mol P407
CS	3,61 mol AF647/mol CS

Degradação das NP nos fluídos digestivos FGS e FDS

Tabela 7: Degradação (%) das NP nos fluídos digestivos FGS e FDS pela variação da concentração de BSA-FITC (ensaio representativo de n=2, com média e desvios padrão de triplicados).

Formulação	Degradação NP (%)
NP-FITC	68,58 ± 1,13
NP-FITC + CS	35,94 ± 2,25
NP-FITC + P407	67,86 ± 1,09
NP-FITC + [CS+P407]	48,78 ± 0,37

Permeabilidade das diferentes formulações em ensaios *ex vivo* em intestino de porco

Tabela 8: Permeabilidade (%) das diferentes formulações em intestino de porco quantificada pela relação da variação da massa de BSA-FITC inicial e final (ensaio representativo de n=2, com média e desvio padrão de triplicados).

Formulação	Permeabilidade (%)
PBS	0,00 ± 0,00
NP-FITC	33,61 ± 0,81
NP-FITC + CS	17,65 ± 2,35
NP-FITC + P407	35,52 ± 5,60
NP-FITC + [CS+P407]	35,05 ± 1,48

Formulações de NP presentes nos fluídos

Tabela 9: Eventos fluorescentes presentes nos fluídos recetores. Experiência representativa de n=2, com média e desvio padrão de triplicados.

Formulação	% Eventos Fluorescentes
PBS	0,05 ± 0,03
NP-FITC	4,86 ± 0,18
NP-FITC + CS	1,71 ± 0,46
NP-FITC + P407	0,27 ± 0,18
NP-FITC + [CS+P407]	2,12 ± 0,03