



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZ CLÁUDIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLISSACARÍDICAS COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Rio de Janeiro

2012

LUIZ CLÁUDIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLISSACARÍDICAS COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Priscilla Vanessa Finotelli
Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Rio de Janeiro

2012

S586d Silva, Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da.
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas polissacarídicas com atividade anticoagulante/ Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva; orientadores Lucio Mendes Cabral, Priscilla Vanessa Finotelli, Leonardo Paes Cinelli. -- Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2012.

xvii, 74f. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3. Fucoïdan. 4. Anticoagulante.
5. Caco-2. I. Cabral, Lucio Mendes. II. Finotelli, Priscilla Vanessa.
III. Cinelli, Leonardo Paes. IV. Título.

CDD 615.718

LUIZ CLÁUDIO RODRIGUES PEREIRA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLISSACARÍDICAS COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de julho de 2012.

Orientador:

Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ailton de Souza Gomes
Instituto de Macromoléculas Professora Heloisa Mano -UFRJ

Prof. Dr. Luiza Rosaria Sousa Dias
Faculdade de Farmácia – UFF

Prof^a. Dr^a. Ana Luisa Palhares de Miranda
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Aos meus pais, Luiz Augusto e Magna.

Aos meus irmãos.

À minha namorada, Marcela.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lucio Mendes Cabral, pela orientação no trabalho realizado. Agradeço pela amizade, pelos MUITOS ensinamentos, pela confiança em mim depositada e por todo o apoio.

A Prof^a. Dr^a. Priscilla Vanessa Finotelli, por me acolher tão gentilmente em seu laboratório, sendo sempre solícita.

Ao Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli, pela orientação no trabalho, pelos conselhos e ensinamentos sobre o trabalho com polissacarídeos.

Aos meus pais Luiz Augusto e Magna, pelo investimento esforçado feito ao longo de muitos anos, para que, dentro das possibilidades, eu sempre pudesse desfrutar das melhores condições de estudo. Este trabalho é dedicado à vocês!

Aos meus irmãos, por me aconselharem em momentos de dúvida e por terem acreditado no caminho que escolhi.

À Marcela, minha amiga, companheira, namorada, minha força. Muito obrigado por ter cruzado meu caminho, mostrando-se carinhosa, atenciosa e sincera. Obrigado por me amar e ter suportado um oceano de distância.

Às **Professoras Carla Caramella, Maria Cristina Bonferoni, Silvia Rossi e Franca Ferrari**, por receberem-me em seus laboratórios, pela ajuda em minha chegada à Itália, e pelos muitos ensinamentos passados ao longo do ano de 2011.

A **Dr^a. Giuseppina Sandri**, e às doutorandas **Eleonora Dellerà e Michela Mori**, pelo auxílio na realização dos experimentos, pela amizade e pelo acolhimento em território italiano.

À pesquisadora **Caterina Temporini (Università Degli Studi di Pavia)**, pela confiança e amizade ao longo de minha permanência na Itália.

Aos meus grandes amigos **Antônio, Carla, Daniel, Fernanda Greco, Heric, Marcello e Vitor**. Irmãos que escolhi há mais de 10 anos.

Aos eternos “amigos de faculdade”, **Carlos Rezende, Eduardo Rodrigues, Guilherme Barbieri, Leonardo Serra e Ricardo Borges**. Obrigado pela companhia ao longo dos anos de graduação e pós-graduação!

Aos amigos (que já passaram e que permanecem) do Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica (LabTIF) e Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ): **Alex, Alice, Aline, Arídio, Carol Pupe, Carol Escudini, Daniel Marinho, Eduardo, Gabi, Giovanni, Helvécio, Jaqueline, Karla, Letícia, Lilian, Luisa, Máira, Maísa, Marina, Michele Villardi, Patrícia, Pedro, Professora Rita, Thiago Garcia (muito obrigado!), Thiago Honório, Túlio, Vinícius**. Espero ter ajudado tanto o quanto me ajudaram! Muito obrigado!

A **Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa**, do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ – UFRJ), por permitir a realização das análises de infravermelho em seu laboratório e por aceitar participar de minha banca de acompanhamento, apresentando-se sempre disponível para esclarecimento de dúvidas.

A Dr^a. Maria Elizabeth Ferreira Garcia, do Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM - COPPE), por permitir a utilização do analisador de tamanho de partículas (Horiba LB-550).

Ao professor da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior, pela disponibilidade e por todo o auxílio desde 2009.

A banca examinadora, que gentilmente aceitou o convite de participar da defesa desta tese.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A CAPES pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa no Brasil (Edital CAPES Nanobiotecnologia 2008) e Itália (processo número 6711/10-3).

“A ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário”.

(Albert Einstein)

RESUMO

DA SILVA, Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas polissacarídicas com atividade anticoagulante**. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Durante os últimos anos, o setor das ciências farmacêuticas tem exibido interesse especial na aplicação de nanopartículas (Np) poliméricas para a liberação de moléculas bioativas. Diversos estudos apontam o uso de quitosana (QT) e alguns polissacarídeos sulfatados para a produção de nanossistemas, que podem apresentar atividade anticoagulante.

O objetivo do trabalho foi produzir e caracterizar Np através da combinação de sulfato de condroitina (SC) ou fucoidan (FC) com quitosana. As Np foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), determinação de potencial zeta (PZ), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), perfil de separação por centrifugação e medidas de mucoadesividade. Além destes, foram realizados testes biológicos de determinação de atividade anticoagulante, citotoxicidade e permeabilidade em monocamada de células Caco-2.

Os resultados de DLS, PZ e MET mostraram-se satisfatórios em relação ao diâmetro médio de partícula, carga superficial e formato, respectivamente. A solução de FC não afetou o tempo de coagulação comparada às nanopartícula de FC, as quais aumentaram esse tempo em duas vezes, mesmo em concentrações reduzidas. Testes de citotoxicidade e permeabilidade exibiram, respectivamente, efeito não tóxico às células e maior permeabilidade de Np em relação à solução de FC.

Nesse trabalho Np de FC foram preparadas, exibindo alta viabilidade para terapia anticoagulante via oral, quando comparadas com soluções de FC.

Palavras-chave: nanopartículas, condroitin sulfato, fucoidan, aPTT, células Caco-2.

ABSTRACT

DA SILVA, Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva. **Preparation and characterization of polysaccharide based nanoparticles with anticoagulant activity**. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

During the last years, pharmaceutical sciences exhibit interest in the application of polymeric nanoparticles (Np) for bioactive molecules release. Many studies of nanosystems formation are focusing on chitosan and some sulfated polysaccharides which can show anticoagulant activity in some cases.

The aim of this study was to produce and characterize Np using chondroitin sulfate (CS) or fucoidan (FC) combined to chitosan (CT). Np were characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP) determination, transmission electronic microscopy (TEM), small angle X-ray scattering (SAXS), separation profile by centrifugation and washability measurements. In addition, biological tests were performed by anticoagulant activity assay, cytotoxicity and permeability tests using Caco-2 cells monolayer.

DLS measurements, PZ determination and TEM showed satisfactory results of mean diameter, superficial charge and shape, respectively. FC solution did not affect coagulation compared to FC Np, which increased it up to two-fold even at a lower concentration. Cytotoxicity and permeability tests exhibited, respectively, no toxic effect on cells and higher permeability of Np2 than FC solution.

In this study Np containing CT and FC were prepared showing high feasibility to oral administration in anticoagulant therapy in comparison to FC solution.

Keywords: nanoparticles, chondroitin sulfate, fucoidan, aPTT, Caco-2 cells.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii	
LISTA DE TABELAS	xv	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi	
1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Hemostasia e doenças cardiovasculares	18
1.2	Coagulação e trombose	18
1.3	Moléculas com atividade anticoagulante	22
1.4	Sistemas nanométricos de liberação de moléculas bioativas	23
1.5	Nanopartículas poliméricas	25
1.6	Biomateriais	27
1.7	Permeabilidade intestinal e biodisponibilidade oral	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Material	35
3.1.1	Equipamentos e utensílios	35
3.1.2	Matéria-prima, Soluções e Reagentes	36
3.2	Métodos	38
3.2.1	Preparo de nanopartículas polissacarídicas	38
3.2.2	Caracterização do sistema	39
3.2.2.1	Determinação de Diâmetro Médio de Partícula	39

3.2.2.2	Determinação de Potencial Zeta (PZ)	40
3.2.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	40
3.2.2.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	40
3.2.2.5	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Small angle X-ray scattering – SAXS)	41
3.2.2.6	Estudo de separação de partículas por centrifugação	41
3.2.2.7	Quantificação dos polissacarídeos sulfatados	42
3.2.2.8	Medidas de lavabilidade	42
3.2.3	Ensaio biológicos	44
3.2.3.1	Ensaio de coagulação <i>in vitro</i>	44
3.2.3.2	Estudos de citotoxicidade	45
3.2.3.2.1	Em células Caco-2	45
3.2.3.2.2	Em células endoteliais vasculares de cordão umbilical de humanos – Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	46
3.2.3.3	Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2	47
3.2.3.4	Ensaio de permeabilidade intestinal em jejuno de ratos	49
3.2.4	Análise estatística	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Preparo de nanopartículas polissacarídicas	50
4.2	Determinação de diâmetro médio de partículas	54
4.3	Determinação de potencial zeta (PZ)	57
4.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	57
4.5	Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho (EIV)	62
4.6	Análises por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (Small angle X-ray scattering – SAXS)	64
4.7	Estudo de separação de partículas por centrifugação	67
4.8	Quantificação dos polissacarídeos sulfatados nas nanopartículas	70

4.9	Ensaio de coagulação	71
4.10	Medidas de lavabilidade	74
4.11	Estudo de citotoxicidade em células Caco-2	75
4.12	Estudo de citotoxicidade em células endoteliais vasculares de cordão umbilical de humanos – Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	76
4.13	Ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2	77
4.14	Ensaio de permeabilidade intestinal em jejuno de ratos	82
4.15	Características gerais de Np2 nos ensaios biológicos	84
5	CONCLUSÕES	86
6	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de coagulação.	19
Figura 2: Estrutura dos seguintes dos polissacarídeos (A) Condroitin Sulfato; (B) Quitosana; (C) monômero de fucose em meio aquoso.	30
Figura 3: Esquema comparativo entre a barreira intestinal in vivo e a monocamada celular gerada in vitro, pelas quais os fármacos devem atravessar para atingir a circulação sanguínea.	32
Figura 4: Esquema representativo do preparo das nanopartículas através da técnica de gotejamento.	39
Figura 5: MET de Np1 (campo A), com aumento de 22000 vezes.	58
Figura 6: MET de Np1 (campo B), com aumento de 22000 vezes.	58
Figura 7: MET de Np1, com aumento de 89000 vezes.	59
Figura 8: MET de Np2, com aumento de 36000 vezes.	60
Figura 9: MET da mistura física de CS e QT (1:1), com aumento de 8900 vezes.	61
Figura 10: MET da mistura física de FC e QT (1:1), com aumento de 36000 vezes.	61
Figura 11: Espectros de infravermelho de: Mistura física de QT + CS (I); CS (II); FC (III); Mistura física de QT + FC (IV); Np1 (V); Np2 (VI); QT (VII).	63
Figura 12: Análises por SAXS das misturas físicas entre FC e QT.	65
Figura 13: Análises por SAXS de nanopartículas contendo FC e QT.	65
Figura 14: Representação esquemática das nanopartículas de quitosana e polissacarídeos sulfatados com núcleos de condensação dispersos na matriz polimérica de quitosana e seu comportamento diante de diferentes valores de pH.	66
Figura 15: Estudo de centrifugação de Np1 (representações do eixo do diâmetro de partícula em escalas de: 0 a 6 μm e 0 a 2 μm).	68
Figura 16: Estudo de centrifugação de Np2 (representações do eixo do diâmetro de partícula em escalas de: 0 a 5 μm e 0 a 1 μm).	69
Figura 17: Curva de calibração de CS em tampão fosfato pH 7,4.	70
Figura 18: Curva de calibração de FC em tampão fosfato pH 7,4.	71

Figura 19: Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) de amostras contendo FC.	73
Figura 20: Tempo de recalcificação de amostras contendo FC.	73
Figura 21: Percentual de Fucoïdan lavado, a partir das nanopartículas Np2, durante lavagem de membrana de mucina.	74
Figura 22: Estudo de citotoxicidade de amostras contendo FC (soluções, misturas físicas com quitosana e nanopartículas) em diferentes concentrações, controles positivo (HBSS pH 6,8) e negativo (Tryton 10%).	76
Figura 23: Estudo de citotoxicidade de amostras contendo FC (solução e nanopartículas) na concentração de 1000 µg / mL e controle positivo (HBSS pH 7,4) em células HUVEC.	77
Figura 24: Percentual de fucoïdan permeado, a partir de Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL, através de monocamada de células Caco-2 durante 180 minutos de experimento.	79
Figura 25: Medidas de resistência transepitelial em percentual, ao longo de 180 minutos, em poços contendo monocamada de células Caco-2 contendo Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL. Grupo controle utilizado = HBSS 6,8.	79
Figura 26: Representações gráficas, entre 0 e 30 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm / s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2.	80
Figura 27: Representações gráficas, entre 0 e 120 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm / s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2.	81
Figura 28: Representações gráficas, entre 0 e 180 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm / s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2.	81
Figura 29: Percentual de fucoïdan permeado, a partir de Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL, através do jejuno de ratos, durante 180 minutos de experimento.	83
Figura 30: Representações gráficas, entre 30 e 180 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm / s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg / mL no ensaio de permeabilidade em jejuno de ratos.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições clínicas que levam ao desenvolvimento de trombose.	21
Tabela 2: Combinação de soluções de polissacarídeos em tampão bórax, em diferentes concentrações, para a produção de oito diferentes suspensões de Np.	52
Tabela 3: Medições de pH dos solventes, soluções e suspensões de nanopartículas.	53
Tabela 4: Resultados de diâmetros médios de partículas, potencial zeta e índice de polidispersividade, por espalhamento dinâmico de luz das nanopartículas.	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	área de difusão nos experimentos de permeabilidade
aPTT	<i>activated partial thromboplastin time</i> – tempo de tromboplastina parcial ativada
C ₀	concentração inicial de polissacarídeo sulfatado nos experimento de permeabilidade
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CS	condroitin sulfato
d.p.	desvio padrão
DM	diâmetro médio
DMB	<i>dimethylmethylen blue</i> – azul de dimetilmetileno
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> – Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
EGM-2	<i>endothelial cell growth medium-2</i> – meio de crescimento tipo 2 de células endoteliais
EIV	espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho
FC	fucoïdan
HBPM	heparina de baixo peso molecular
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> – solução salina equilibrada de Hank
HNF	heparina não fracionada
IP	índice de polidispersividade
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MF	mistura física
MTT	<i>thiazolyl blue tetrazolium bromide</i> - brometo tiazolil azul de tetrazólio
Np CS-QT	nanopartículas de condroitin sulfato e quitosana
Np FC-QT	nanopartículas de fucoïdan e quitosana
Np	nanopartícula(s)

Papp	coeficiente de permeabilidade aparente
PS	polissacarídeos sulfatados
PS ^{t⁰} _{apical}	quantidade de polissacarídeo sulfatado presente no compartimento apical no início do experimento de permeação
PS ^{t³} _{apical}	quantidade de polissacarídeo sulfatado que permaneceu no compartimento apical ao final do experimento de permeação
PS ^{t³} _{basolateral}	quantidade de polissacarídeo sulfatado recuperado no compartimento basolateral ao final do experimento de permeação
PT	<i>prothrombin time</i> – tempo de protrombina
PZ	potencial zeta
QT	quitosana
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i> – espalhamento de raios-X a baixo ângulo
TEER	<i>transepithelial electric resistance</i> – resistência elétrica transepitelial
TGI	trato gastro-intestinal

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEMOSTASIA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O sistema sanguíneo é o responsável pelo transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos, além de controlar o extravasamento de fluidos, solutos, hormônios e macromoléculas para os tecidos. Para que o sangue circule normalmente através dos vasos é necessário que ele esteja na forma fluida, livre de coágulos, mas que também tenha a capacidade de interromper o sangramento, caso haja uma injúria vascular. A manutenção dessas funções em perfeito funcionamento é chamada de hemostasia (DAVIE, FUJIKAWA & KISIEL, 1991; FURIE & FURIE, 1995; ANDREWS & BERNDT, 2004). Esse estado fisiológico é fundamental para o organismo humano, pois a perda de quantidades significativas de sangue, em um extravasamento vascular, e a interrupção do fluxo sanguíneo, no caso de um quadro de hipercoagulação, não permitem a manutenção do equilíbrio da coagulação sanguínea. A desregulação de determinados inibidores de proteases no sangue pode prejudicar a hemostasia, levando à trombose, onde há a formação patológica de um tampão hemostático, composto por um agregado de células anucleadas discóides (plaquetas) e cadeias poliméricas de fibrina, no interior do vaso sanguíneo, na ausência de sangramento (DAVIE, FUJIKAWA & KISIEL, 1991; FURIE & FURIE, 1995; ANDREWS & BERNDT, 2004; MELO, 2005; MANN *et al.*, 2006).

1.2 COAGULAÇÃO E TROMBOSE

As plaquetas atuam no controle do sangramento quando ocorre uma injúria na parede vascular e as células endoteliais rompidas expõem a matriz extracelular. O agregado de plaquetas ativado, trombo, acelera o início da cascata de coagulação levando à estabilização do coágulo pela fibrina (ANDREWS & BERNDT, 2004).

O sistema de coagulação pode ser representado por organogramas bifurcados em duas vias, as quais convergem a um ponto comum em um dado momento dos eventos sequenciais da coagulação. Essa cascata, composta de seguidas reações enzimáticas (representada na Figura 1), onde participam diversos fatores plasmáticos da coagulação, culmina na formação de trombina, a qual provoca a reação final da transformação de fibrinogênio em monômeros

de fibrina. Estes, por sua vez, se complexam através de reações eletrolíticas, formando polímeros de importância vital na formação do coágulo (DAVIE, FUJIKAWA & KISIEL, 1991).

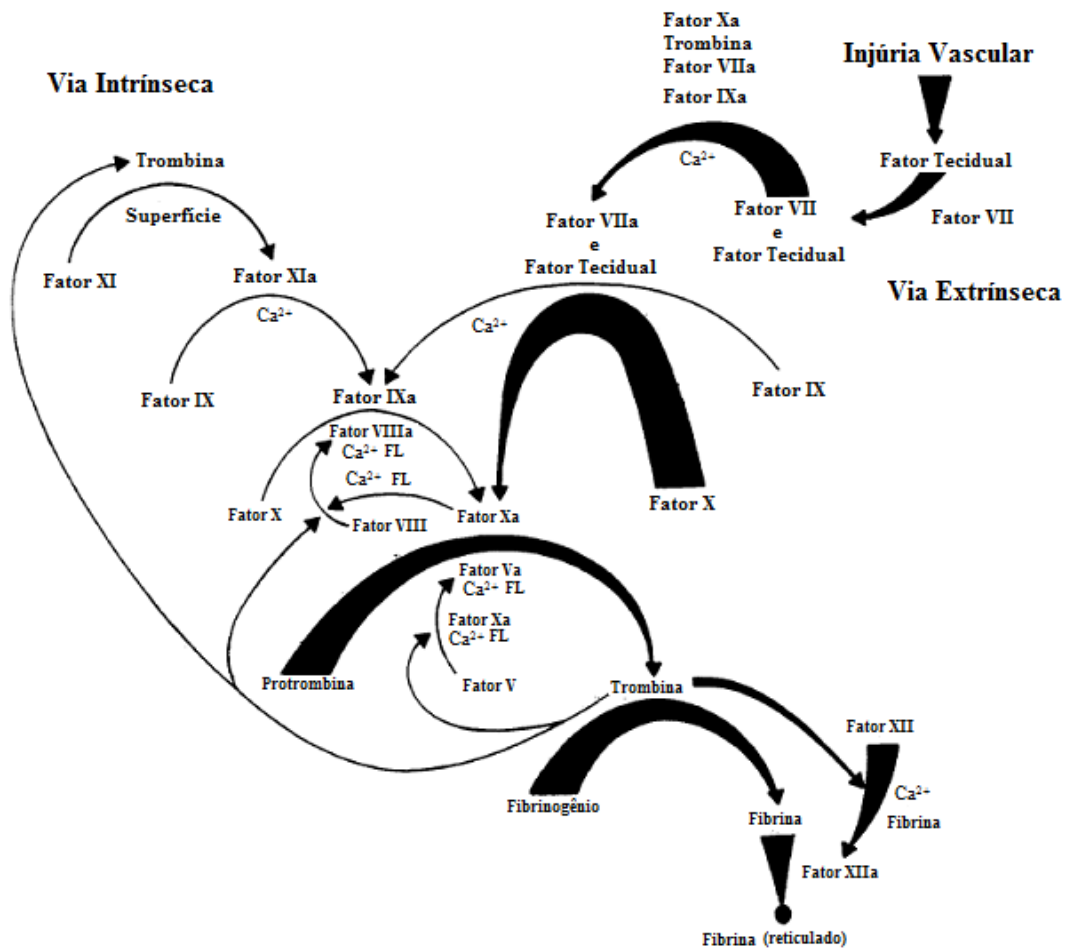


Figura 1: Sistema de coagulação. Adaptado de Davie, Fujikawa & Kisiel (1991).

A formação de fibrina em excesso dentro dos vasos sanguíneos causa a oclusão dos mesmos levando à trombose. Essencialmente, as plaquetas possuem o mesmo papel na formação de trombos nas condições fisiológicas normais (hemostase) e nas condições que levam ao surgimento de doenças trombóticas, como grande parte dos problemas cardiovasculares. Além disso, as plaquetas promovem interação dos leucócitos com as paredes vasculares, contribuindo para o desenvolvimento da placa aterosclerótica, que pode, eventualmente, originar eventos trombóticos (ANDREWS & BERNDT, 2004).

Muitos desses pacientes apresentam condições clínicas óbvias que levaram ao evento trombótico, sendo de 50 a 80% dos indivíduos portadores de alguma deficiência (hereditária ou adquirida) nas proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação ou nas plaquetas. Algumas das condições clínicas que elevam o risco de desenvolvimento de trombose arterial ou venosa e tromboembolismo estão apresentadas na Tabela 1 (BICK & KAPLAN, 1998).

Tabela 1: Condições clínicas que levam ao desenvolvimento de trombose.

Condições clínicas arteriais	Condições clínicas venosas	Falhas proteicas / plaquetárias
Aterosclerose	Cirurgia geral	Plasminogênio
Tabagismo	Cirurgias ortopédicas	Fator XII
Hipertensão	Artroscopia	Proteína C
Diabetes mellitus	Trauma	Inibidor do ativador de plasminogênio
Hipertrigliceridemia	Obesidade	Co-fator II de heparina
Histórico familiar positivo	Sepse	Proteína S
Falha no ventrículo esquerdo	Veias varicosas	Síndrome de plaquetas de Sticky
Anticoncepcionais orais	Anticoncepcionais orais	Antitrombina
Estrogênios	Estrogênios	Síndrome antifosfolípídeo

Adaptado de Bick & Kaplan (1998).

1.3 MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Dentre as diversas estruturas estudadas e utilizadas para tratamento da trombose, podemos citar uma classe de macromoléculas, os polissacarídeos sulfatados (PS), presentes em muitos tecidos animais e vegetais (algas), exibindo uma grande variedade estrutural de natureza polianiónica, devido à presença de ésteres de sulfato e, em alguns casos, de resíduos de ácido hexurônico. Estas estruturas poliméricas são abundantes em tecidos de vertebrados, onde se apresentam sob a forma de glicosaminoglicanos. Nos organismos invertebrados,

podem ser encontrados PS simples de estrutura linear e unidades oligossacarídicas repetitivas, ou como polímeros ramificados de estrutura mais complexa (MOURÃO *et al.*, 1996; MELO, 2005).

A heparina, por exemplo, um glicosaminoglicano anticoagulante, é um agente terapêutico de referência usado na profilaxia e tratamento da trombose. Os agentes inibidores de agregação plaquetária (aspirina, por exemplo) e os anticoagulantes, como a heparina e a varfarina, possuem limitações consideráveis no seu uso, ainda que tenham proporcionado extraordinário progresso no tratamento de doenças tromboembólicas. Dentre as limitações encontradas podemos destacar as complicações associadas à hemorragia. A necessidade de monitoramento laboratorial contínuo com o uso de heparina ou varfarina é, também, considerada uma desvantagem no tratamento com essas substâncias (HIRSH *et al.*, 1998)

A heparina não fracionada (HNF) e seu derivado de baixo peso molecular, heparina de baixo peso molecular (HBPM), são os anticoagulantes de escolha quando é necessário um rápido efeito anticoagulante, por conta da ação imediata da via intravenosa. Ambos os tipos de heparina são administrados em baixas doses na profilaxia primária e tratamento de trombose venosa. A HNF possui limitações farmacocinéticas, as quais não são compartilhadas pela HBPM. Este fato limita a HNF ao uso hospitalar, por conta da necessidade de monitoramento e ajuste contínuo da dose, de acordo com a resposta de cada indivíduo. (HIRSH *et al.*, 1998).

Por outro lado, formulações contendo HBPM podem ser utilizadas fora do regime hospitalar, por serem administradas via subcutânea e não necessitarem de monitoramento contínuo, como a HNF. Embora a HBPM apresente inúmeras vantagens diante da HNF, ainda assim, é uma molécula de origem animal, podendo transmitir doenças quando usadas em humanos. Além disso, assim como a HNF, causa o aumento do tempo de sangramento durante o uso continuado e não possui regularidade no tamanho de cadeias, por conta dos diferentes protocolos de fragmentação de heparina, causando variabilidade de respostas terapêuticas (HIRSH *et al.*, 1998).

Diante dos problemas relacionados ao uso dos anticoagulantes citados anteriormente, torna-se importante a busca por alternativas de baixo custo, que apresentem segurança e eficácia. A recente descoberta de polissacarídeos anticoagulantes de origem vegetal e sua

incorporação em formulações de tecnologia avançada podem representar uma nova opção no tratamento e profilaxia de distúrbios pró-coagulantes.

Dessa forma, os problemas originados pela extração de PS a partir de animais que apresentem doenças que comprometam a segurança do medicamento; a ausência de níveis plasmáticos adequados de PS após administração via oral e o alta taxa de depuração após administração intravenosa, poderiam ser contornados com a formulação de PS com atividade anticoagulante em sistemas nanométricos.

1.4 SISTEMAS NANOMÉTRICOS DE LIBERAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Atualmente, a nanotecnologia é um campo em rápida expansão devido ao suporte multidisciplinar acadêmico em setores públicos e privados. Dentre as áreas inseridas na nanotecnologia podemos citar os processos e fenômenos em nanoescala, nanomateriais, nanodispositivos, nanosistemas, normas para uso da nanotecnologia e estudos sociais sobre riscos e benefícios da nanotecnologia. Ela desempenha um papel importante nas terapias do futuro através dos nanosistemas de liberação de moléculas bioativas, que podem ser administrados por via intravenosa, sem entupimento de agulhas e capilares, por conta dos seus tamanhos subcelulares (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005) ou administradas via oral (GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003). Atualmente, existe uma “corrida” científica em busca do desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de ativos com perfil farmacocinético e propriedades biofarmacêuticas ideais. Esse cenário, sustentado no conceito da vetorização de fármacos, foi desenvolvido com o objetivo de gerar sistemas capazes de distribuir terapêuticamente a molécula biologicamente ativa no local de ação sem afetar os órgãos e tecidos saudáveis (PINTO-ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000). Embora haja diversas linhas de pesquisa em torno dos sistemas de liberação sustentada de moléculas bioativas, a maioria destes não apresenta todas as características necessárias e desejáveis de um nanosistema ideal (BRAYDEN, 2003; KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005).

Existem diversos tipos de nanosistemas de liberação, dentre eles temos: os lipossomas, dendrímeros, nanoemulsões, nanogéis, nanopartículas lipídicas ou poliméricas. Todos esses

sistemas podem apresentar características desejáveis, para o direcionamento de uma molécula bioativa, como: aumentar sua biodisponibilidade por determinada via de administração, aumento do tempo de circulação sanguínea, melhorar a farmacocinética voltada aos alvos, elevando a eficácia do tratamento; reduzir os efeitos adversos por conta do acúmulo preferencial em locais específicos, provocando baixas concentrações em tecidos saudáveis; liberação direcionada aos tecidos tumorais e inflamados, visto que essas patologias exibem espaçamentos entre células dos capilares sanguíneos maiores do que o normal; direcionar o ativo, aumentando o índice terapêutico e diminuindo as doses necessárias para que haja o efeito esperado; aumentar a solubilidade aquosa de compostos hidrofóbicos, possibilitando administração parenteral; aumentar a estabilidade de uma variedade de agentes terapêuticos, como pequenas moléculas, peptídeos e oligonucleotídeos; servir como alternativa aos veículos farmacêuticos existentes, pois são nanosistemas compostos de biomateriais, apresentando biocompatibilidade e biodegradabilidade. (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005; MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Os sistemas de liberação, também denominados de vetores de liberação, podem ser classificados em diferentes gerações de acordo com seus mecanismos de direcionamento, estruturas e vias de administração. Os de primeira geração são aqueles que liberam a substância no tecido alvo, sendo necessária uma via de administração específica, dependendo do local de liberação. Como exemplo, temos as microesferas e microcápsulas para quimioembolização. Os de segunda geração incluem lipossomas e nanopartículas (vetores coloidais passivos), além dos vetores coloidais ativos (nanopartículas magnéticas, lipossomas termo- ou pH-sensíveis). Esses vetores não necessitam de uma via especial de administração e transportam o ativo até o alvo visado. Por último, temos os vetores de terceira geração, que reconhecem em nível molecular o alvo, através de anticorpos monoclonais, não necessitando, também, de uma via especial de administração (PUISIEUX; ROBLOT-TREUPEL, 1988).

1.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas (Np) poliméricas são partículas em escala nanométrica, na faixa de 10 a 1000 nm (1 μm), podendo ser compostas por polímeros naturais ou sintéticos. Em nanobiotecnologia, um fármaco ou material biologicamente ativo pode estar dissolvido, incorporado, encapsulado e/ou adsorvido ou aderido às nanopartículas (KREUTER, 2001; MOHANRAJ & CHEN, 2006; KREUTER, 2007). As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em duas classes: Nanocápsulas e Nanoesferas. A primeira caracteriza Np ocas, com o núcleo da partícula sendo revestido pelo polímero, delimitando de forma bem definida o material encapsulado, onde pode estar contido um fármaco. A segunda classe define uma partícula esférica e sólida no interior, com uma matriz constituída por polímero contendo o material a ser incorporado, disperso por toda a esfera, e não só aprisionada no núcleo (KUMARI; YADAV; YADAV, 2009)

As Np podem ser preparadas a partir de uma variedade de materiais, como proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos. A seleção do material depende de alguns fatores que incluem: tamanho desejado de partícula; propriedades inerentes ao fármaco (por exemplo, solubilidade em água e estabilidade); características de superfície (carga e permeabilidade); grau de biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade; método utilizado para produção dessas nanopartículas. Essas partículas poliméricas têm sido produzidas, mais frequentemente, por três métodos diferentes: dispersão de polímeros pré-formados, polimerização de monômeros e gelificação iônica/coacervação de polímeros hidrofílicos (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

A dispersão de polímeros pré-formados engloba diversas técnicas, uma das mais utilizadas é a emulsificação simples e evaporação do solvente, onde um polímero e um fármaco hidrofóbico são solubilizados em um solvente orgânico (diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila, por exemplo). Essa mistura de polímero e fármaco é adicionada à uma solução aquosa contendo agente emulsificante formando uma emulsão o/a, que é levada à evaporação sob pressão reduzida e agitação para retirada do solvente orgânico (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Na polimerização de monômeros, há formação de nanopartículas em meio aquoso, onde o fármaco pode ser dissolvido no meio de polimerização ou adsorvido às nanopartículas após

a polimerização ter sido completada. A suspensão de Np resultante pode ser purificada, a fim de remover os estabilizantes e surfactantes empregados na polimerização, por ultracentrifugação com posterior ressuspensão das partículas em meio isotônico puro (MOHANRAJ & CHEN, 2006).

Muitos relatos científicos apontam para a produção de nanopartículas utilizando polímeros hidrofílicos biodegradáveis como quitosana (QT), gelatina e alginato de sódio (MOHANRAJ & CHEN, 2006). Em 1997, Calvo e colaboradores desenvolveram um método de preparo de nanopartículas de quitosana por geleificação iônica. Essa técnica envolveu a adição de duas fases aquosas, uma delas contendo quitosana (policátion) junto com um copolímero (óxido de etileno) e a outra contendo o poliânion, tripolifosfato de sódio. Dessa forma, as cargas positivas dos grupos amino da quitosana interagiram com o tripolifosfato carregado negativamente, formando coacervatos na faixa de nanômetros. Os coacervatos são formados como resultado da interação eletrostática entre duas fases aquosas de cargas opostas, enquanto que a geleificação iônica envolve a transição do material líquido para o gel devido às interações de cargas em temperatura ambiente (CALVO *et al.*, 1997-a).

1.6 BIOMATERIAIS

Tanto os polímeros sintéticos quanto os polímeros biológicos (naturais) têm sido extensivamente estudados como materiais biodegradáveis. A biodegradação de biomateriais poliméricos envolve clivagem de ligações suscetíveis, levando à erosão do polímero. Dependendo do modo de degradação, os biomateriais poliméricos podem ser classificados de acordo com o processo de degradação, enzimático ou hidrolítico não enzimático. A maioria dos polímeros naturais são biodegradados enzimaticamente (NAIR & LAURENCIN, 2007).

Polímeros naturais podem ser considerados como os biomateriais biodegradáveis de primeira escolha usados clinicamente. Entretanto, a taxa de degradação enzimática desses polímeros *in vivo* varia significativamente de acordo com o local onde se encontram no organismo e também dependendo da disponibilidade e concentração de enzimas. Modificações químicas desses polímeros também podem afetar significativamente suas taxas de degradação. Polímeros naturais possuem diversas vantagens inerentes, como uma possível bioatividade, a capacidade de apresentar ligantes aos receptores celulares e a susceptibilidade

à degradação proteolítica disparada pelas células (NAIR & LAURENCIN, 2007).

Muitos pesquisadores têm usado polímeros orgânicos específicos em vários sistemas de liberação de fármacos por serem naturais (biocompatíveis) e biodegradáveis.

A quitosana (Figura 2B) é um polissacarídeo linear composto de unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, com propriedades antimicrobianas (MUZZARELLI & MUZZARELLI, 2005) e com caráter catiônico em pH ácido. Esse polissacarídeo pode ser obtido a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*. Algumas aplicações farmacêuticas da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. (SILVA *et al.*, 2006; RINAUDO, 2006). As suas duas mais importantes propriedades são: a natureza catiônica e a alta densidade de cargas positivas em soluções ácidas. Assim, consegue formar complexos iônicos insolúveis com espécies polianiônicas solúveis em água, em condições neutras ou alcalinas. Desse modo, a QT pode reagir, por exemplo, com alginato, carboximetilcelulose, xantana e sulfato de condroitina (SC), para formar complexos polieletrólíticos (VASILIU *et al.*, 2005; RINAUDO, 2006).

O sulfato de condroitina (Figura 2A) é um glicosaminoglicano encontrado nos ossos, cartilagens e tecidos conectivos, composto de n-acetilgalactosamina e resíduos de ácido glurônico ligados alternadamente um ao outro por ligações 1-4 e 1-3, respectivamente. O SC é um mucopolissacarídeo ácido, o que lhe confere a capacidade de formar complexos iônicos com substâncias carregadas positivamente, como por exemplo, a quitosana. (SUI *et al.*, 2008). Esse polissacarídeo é um glicosaminoglicano importante fisiologicamente, presente em grande quantidade na superfície das células e na matriz extracelular (LEE, HUANG & LEE, 2007). O SC em meio fisiológico (pH = 7,4) e em meio básico, pH até 11, consegue ser fortemente ionizado, já a partir de valores de pH acima de 11, a dissociação dos grupos hidroxil ocorre de maneira exacerbada, gerando um ânion fraco. Em valores de pH entre 9 e 10, o sulfato de condroitina comporta-se como um poliânion, possibilitando a interação com a quitosana catiônica (OEFNER & CHIESA, 1994; HONDA, 1996; PARK & NA, 2009).

A fucana sulfatada comercialmente presente no fucoidan (FC) (KARIYA *et al.*, 2004;

LI *et al.*, 2008), extraída de algas pardas (*Fucus vesiculosus*), possui atividade anticoagulante por conta da potencial inibição da trombina pela antitrombina ou co-fator II de heparina. A conformação estrutural, em meio aquoso, do monômero de fucose, presente no produto da extração de algas pardas, é exibida na Figura 2C (MOURÃO *et al.*, 1996; MULLOY; MOURÃO; GRAY, 2000; BECKER *et al.*, 2007). Em 1993, Pankter e colaboradores sugeriram um modelo estrutural para FC, no qual a cadeia principal seria composta por monômeros de fucose unidos através de ligações α -(1→3) (Figura 2C). A posição dos grupos sulfato determinam de forma crucial a atividade anticoagulante do FC. A alta atividade está relacionada à concentração de sulfato em C-2 e C-2,3 dissulfato.

O fucoidan (FC), um polissacarídeo contendo percentuais expressivos de L-fucose e grupamentos ésteres de sulfato, está presente não só em algas pardas, mas também em alguns invertebrados marinhos, como os ouriços e os pepinos do mar. O polissacarídeo foi nomeado como “fucoidin” após o seu primeiro isolamento a partir de algas pardas em 1913 por Kylin. Atualmente é chamado de fucoidan, seguindo as regras estabelecidas pela IUPAC, porém, alguns autores ainda citam os nomes de fucana, fucosana ou fucana sulfatada para nomear esse polissacarídeo.

O fucoidan preparado a partir de *Fucus vesiculosus* é encontrado na forma comercial, e composto aproximadamente por 44% de fucose, 26% de grupos sulfato e 30% de aminoglicose e resíduos minerais (LI *et al.*, 2008).

Na última década o FC tem sido isolado e estudado a partir de diferentes espécies por conta da variabilidade de atividades biológicas encontradas, incluindo efeitos anticoagulante e antitrombótico, antiviral, imunomodulador, anti-inflamatório, antioxidante, gastro-protetor, dentre outros. Comparado a outros polissacarídeos sulfatados, o fucoidan é amplamente disponível, a partir de diversas fontes de baixo custo. Assim, pode-se explicar o crescente interesse nesse tipo de PS no desenvolvimento de novos medicamentos.

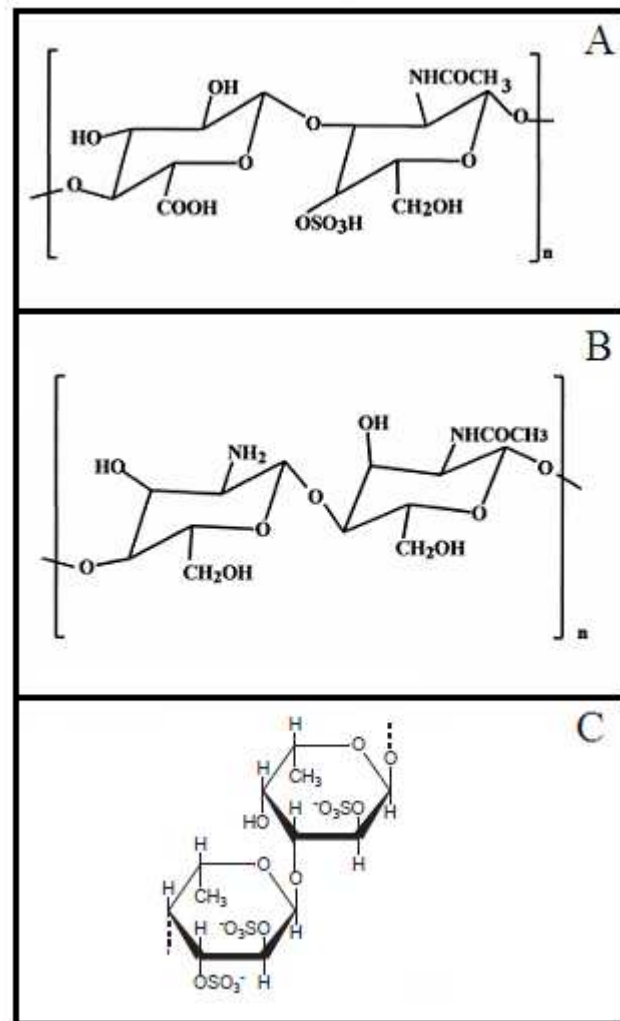


Figura 2: Estrutura dimérica dos polissacarídeos (A) Sulfato de condroitina; (B) Quitosana; (C) Fucoidan. (A) e (B) Retirado de Ganza-González *et al.* (1999); (C) Retirado de Berteau & Mulloy (2003).

1.7 PERMEABILIDADE INTESTINAL E BIODISPONIBILIDADE ORAL

A absorção de fármacos, administrados oralmente, pelo trato gastrointestinal (TGI) é essencial para um tratamento por via oral eficaz. Dentre as propriedades que influenciam o grau de facilidade com que um fármaco pode ser absorvido podemos citar o coeficiente de permeabilidade aparente (Papp), a taxa de dissolução e solubilidade. Estas duas últimas propriedades determinam o quão rápido o componente ativo farmacologicamente pode alcançar sua concentração máxima no fluido intestinal. Por outro lado, o coeficiente de

permeabilidade aparente leva em consideração a proporção e velocidade com que o fármaco atravessará a parede intestinal e alcançará a circulação sanguínea (YAMASHITA *et al.*, 2000; GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003; YAUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; LAU *et al.*, 2011).

Durante a elaboração de estratégias terapêuticas efetivas, novos fármacos e formulações devem exibir propriedades farmacocinéticas favoráveis. Ao se realizar testes exploratórios sobre características de permeabilidade, a escolha da sistemática do teste deve sempre representar uma harmonização entre velocidade na obtenção dos resultados e potencial de predição. Para indústrias farmacêuticas, a ênfase é dada para o primeiro caso, que fornece um prévio entendimento sobre a biodisponibilidade oral de um fármaco, rendendo informações importantes para o planejamento experimental de quais amostras devem seguir testes mais refinados (YAMASHITA *et al.*, 2000; GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003; YAUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; LAU *et al.*, 2011).

Dentre os sistemas *in vitro*, empregados para a predição de biodisponibilidade oral em humanos, as monocamadas de células Caco-2 têm se mostrado o modelo que produz o melhor equilíbrio entre velocidade e confiabilidade dos testes, sendo extensamente empregado para o estudo do potencial de absorção oral na triagem de candidatos a novos fármacos (YAMASHITA *et al.*, 2000; GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003; YAUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; LAU *et al.*, 2011).

Um dos inconvenientes de muitos estudos *in vitro*, que examinam a permeabilidade de fármacos, é que os procedimentos experimentais utilizados nem sempre mimetizam as condições fisiológicas. Nesse contexto, em algumas ocasiões, o pH do tampão, o uso de proteínas e co-solventes e a influência da camada de água são negligenciados. A Figura 3 demonstra as barreiras que os fármacos devem atravessar para atingir a superfície apical de células endoteliais ou epiteliais. Assim, fica evidente que com a utilização de células Caco-2, para a obtenção de informações sobre permeabilidade de fármacos através do intestino, as condições experimentais apresentam similaridade às condições observadas *in vivo* (YAMASHITA *et al.*, 2000; GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003; YAUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; LAU *et al.*, 2011).

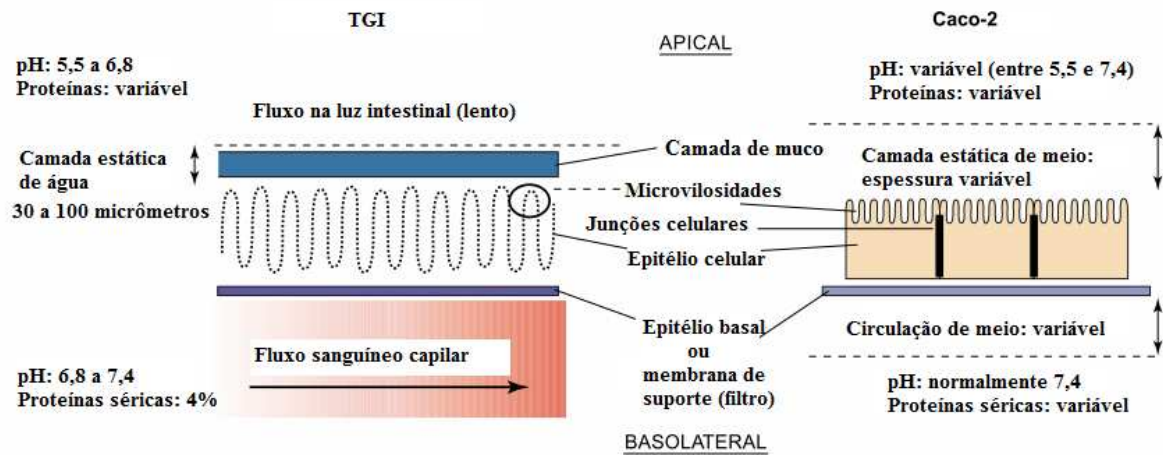


Figura 3: Esquema comparativo entre a barreira intestinal *in vivo* e a monocamada celular gerada *in vitro*, pelas quais os fármacos devem atravessar para atingir a circulação sanguínea. Adaptada de Youdim, Avdeef & Abbott (2003).

As características físico-químicas de um determinado fármaco também influenciam no seu próprio grau de permeabilidade e a via pela qual poderá ocorrer a permeação. Essas vias podem ser divididas em: transcelular (por difusão através das células), por transporte mediado por carreador (transcitose), via paracelular (por difusão através das junções celulares entre as células) ou através de estruturas diferenciadas do sistema linfático, as células-M situadas nas placas de Peyer (YAMASHITA *et al.*, 2000; GOLDBERG, GOMEZ-ORELLANA, 2003; YODIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; LAU *et al.*, 2011).

Diante de todos os fatos expostos anteriormente observou-se a necessidade de investigar alternativas para a terapia anticoagulante atual com a investigação de novos polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante e possível inclusão destes em sistemas nanométricos de liberação. Com isso poderiam ser observadas melhorias na cinética do anticoagulante assim como uma diminuição nos seus efeitos adversos e até mesmo uma terapia anticoagulante via oral de modo eficaz e seguro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de preparo de Np polissacarídicas com atividade em ensaios de coagulação e permeação em modelos epiteliais intestinais, a nível celular e tecidual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanopartículas de Sulfato de condroitina/Quitosana (Np SC-QT), Fucoidan/Quitosana (Np FC-QT) pelo método de gotejamento e coacervação de polieletrólitos;
- Determinar o diâmetro médio e índice de polidispersividade das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico;
- Avaliar a estabilidade nas Np através de medidas de potencial zeta;
- Investigar a composição dos materiais por espectroscopia de absorção no infravermelho;
- Estudar a morfologia das estruturas por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Estudar o método de separação das nanopartículas através da construção do perfil de separação por centrifugação;
- Quantificar os PS nos nanosistemas, auxiliando as avaliações quantitativas dos testes biológicos;
- Determinar a atividade anticoagulante do nanosistema contendo FC-QT, através de ensaios *in vitro*.
- Avaliar o percentual de mucoadesividade do nanosistema anticoagulante diante de membranas de mucina;
- Avaliar o percentual de toxicidade do nanosistema anticoagulante em células

epiteliais intestinais.

- Determinar a permeabilidade do fucoidan a partir de nanopartículas em monocamadas de células Caco-2 e jejunos de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos e Utensílios

Agulhas BD Precision Glide[®] 0,45X13 26G½ .

Balança analítica - Mettler Toledo AG 204.

Banho maria W.80 – Siena, Itália.

Célula de difusão do tipo Franz - Permeagear[®], EUA.

Detector espectrofotométrico UV/Vis – Perkin Elmer 785 A.

Espectrofotômetro Infravermelho IR Prestige-21 Shimadzu[®] A210045, Japão.

Fluxo laminar Minifluo DUE 120 – PBIinternational, Itália.

Gotejador Automático Cole-Parmer[®] 74900-00,-05 Syringe Pump.

Horiba LB-550[®] Dynamic Light Scattering Nano-Analyzer.

ID02 High Brilliance Beamline – SAXS (Grenoble, França)

Incubadora HF 160 WIR – Siena, Itália.

Liofilizador L101 LioTop[®].

Microplate Absorbance Reader iMARK[®] Bio-Rad Laboratories S.r.l. Milão, Itália.

Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Morgani.

Millicell ERS-meter Millipore[®] Corp., Bedford, MA, USA.

Nanosizer Malvern[®].

pHmetro Quimis[®] modelo Q-400M.

Pipeta ajustável- Eppendorf.

Placa de 96 poços CELLSTAR[®], Greiner Bio-one[®] GmbH, Frickenhausen, Alemanha.

Placa de agitação magnética IKA[®] C-MAG HS7.

Placas de 12 poços com filtros de policarbonato Greiner Bio-one, PBIintern., Itália.

Seringa Descartável Descarpac[®] sem agulha 5 mL.

Software SigmaPlot 11.0.

Sonicador Hielscher[®] UP-100H Ultrasonic Processor.

Ultracentrífuga Sorvall[®] SuperSpeed RC2-B.

3.1.2 Matéria-prima, Soluções e Reagentes

Ácido acético P.A. (Glacial) VETEC[®].

Aminoácidos não essenciais Sigma Aldrich[®].

Anasedan (Xilazina) Agribrands - Rio de Janeiro, Brasil.

Anfotericina Sigma Aldrich[®].

Azul de dimetilmetileno- DMB (*Dimethylmethylene blue*) Sigma-Aldrich[®].

Borato de sódio decahidratado Merck[®] K.G.A. (Bórax[®]).

DiaCelin –DiaMed Latino América S.A. – Minas Gerais, Brasil.

Cloreto de sódio P.A. – Spectrum.

Condroitin-4-Sulfato bovina, BioChemika, Fluka[®].

Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich[®], Milão, Itália.

Dopalen (cetamina) Agribrands - Rio de Janeiro, Brasil.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Bioindustries[®], Israel.

Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2), BD Biosciences, Italy.

Fucoidan de *Fucus vesiculosus* Sigma Aldrich[®].

Fosfato de potássio monobásico P.A. – Vetec.

Hidróxido de sódio P.A. – Vetec.

Hank's Ballanced Salt Solution (HBSS) Sigma Aldrich[®].

Mucina estomacal suína tipo II Sigma Aldrich[®].

Penicilina/Estreptomicina Bioindustries[®], Israel.

Quitosana de Baixo Peso Molecular Sigma Aldrich[®].

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, reagente de MTT, Sigma Aldrich[®], Milão, Itália.

Tripsina Sigma Aldrich[®], Milão, Itália.

DiaPlastin-E - DiaMed Latino América S.A. – Minas Gerais, Brasil.

Triton 10%, Sigma Aldrich[®], Milão, Itália.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo de nanopartículas polissacarídicas

O preparo das nanopartículas baseou-se na complexação de dois polieletrólitos de cargas opostas (LIU *et al.*, 2008). Nesse método, apresentou-se a quitosana como polieletrólito positivo e sulfato de condroitina ou fucoidan como os negativos, utilizados em combinação com a quitosana. Seguindo, de forma adaptada, os métodos descritos anteriormente por Ganza-González *et al.* (1999), De & Robinson (2003), Sui *et al.* (2008) e Lee *et al.* (2009), com o auxílio de seringa, agulha e gotejador automático, 30 mL de uma solução de polieletrólito negativo (solubilizado em tampão bórax pH 9,18 ou água MilliQ), foram gotejados sobre 30 mL de solução de quitosana em ácido acético 1% (v/v) sob agitação magnética, sonicação e banho de gelo. A sonicação foi realizada a 100% de amplitude do equipamento, de forma constante e sob agitação magnética a 700 rpm. A agulha foi posicionada a uma distância de 10 cm da solução de quitosana (Figura 4). Em seguida, as dispersões foram submetidas à centrifugação prévia a 548,51 x g durante 30 minutos, tendo o *pellet* descartado e o sobrenadante centrifugado a 28435,21 x g durante 30 minutos. Enquanto o novo sobrenadante foi separado, o respectivo *pellet*, dependendo da natureza da análise de interesse, foi ressuspensionado em meio adequado ou liofilizado.

As amostras de nanopartículas em dispersão foram secas utilizando liofilizador L101 LioTop[®]. As dispersões foram submetidas ao congelamento instantâneo em nitrogênio líquido e acondicionadas no equipamento a - 60°C e 80 µHg.

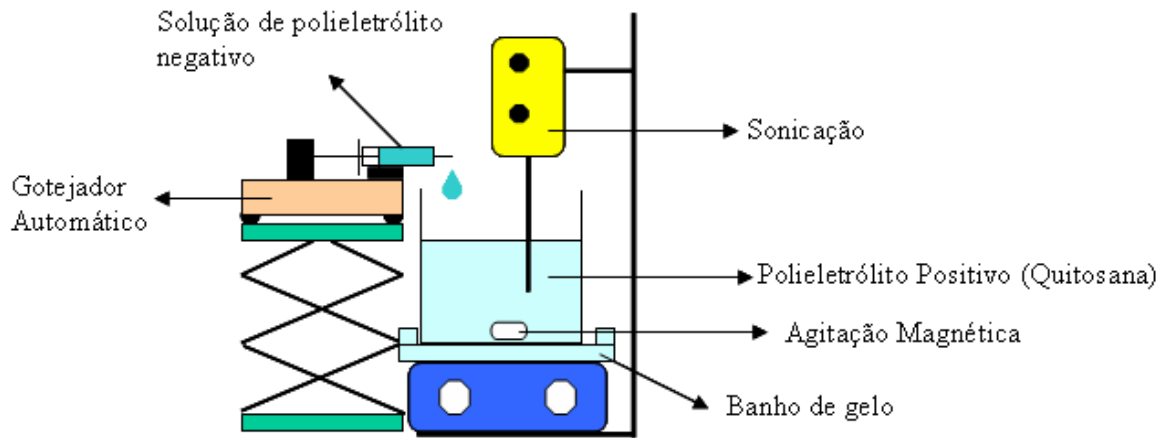


Figura 4: Esquema representativo do preparo das nanopartículas através da técnica de gotejamento.

3.2.2 Caracterização do sistema

3.2.2.1 Determinação de Diâmetro Médio de Partícula

As medidas de diâmetro médio das nanopartículas foram realizadas no aparelho Horiba-LB-550 e Nanosizer Malvern[®], com ângulo de detecção de 90°, 100 varreduras ao longo de dois minutos cada para cada amostra, com índice de refração igual a 1,330 e temperatura de 22°C (CALVO *et al.*, 1997-a; 1997-b; AULTON, 2005; COOPER, 2005; XU, 2008). Simultaneamente às análises de distribuição de diâmetro médio de partícula, obtiveram-se resultados do índice de polidispersividade, que avalia a variância relativa (homogeneidade) dos diâmetros de partículas em dispersão (NIST - NCL Method PCC-1 Version 1.0, 2007).

3.2.2.2 Determinação de Potencial Zeta (PZ)

Através desse método determinou-se a carga da nuvem elétrica acima da superfície da partícula, aferida através do software Nanosizer Malvern (CALVO *et al.*, 1997-a; 1997-b; ANDRADE, 2008; XU, 2008). As determinações foram adotadas com três leituras para cada amostra, com pH, índice de refração e diâmetro médio de partículas previamente obtidos, para inclusão desses parâmetros no software do equipamento.

3.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O estudo morfológico por MET revela os formatos e tamanhos das partículas nos campos observados, demonstrando a existência ou não de aglomerados de nanopartículas. As amostras foram depositadas por 5 minutos em grades de cobre de 400 mesh cobertas com filme de formvar e previamente vaporizadas com carbono. As grades foram secas com papel de filtro e contrastadas em acetato de uranila aquoso 5% por 1 minuto. Em seguida, foram observadas no microscópio FEI Morgani operando em 80 KV (COOPER, 2005).

3.2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por EIV revela bandas características dos componentes de um material em um espectro, possibilitando a identificação dos mesmos. Foram determinados os espectros para as seguintes amostras: QT, SC, FC, mistura física (1:1) entre QT e SC, mistura física (1:1) entre QT e FC, liofilizados de Np1 e Np2. Para a execução do método foram produzidas pastilhas de brometo de potássio (KBr), em prensa mecânica com 12 toneladas de pressão, por 5 minutos, contendo 1% do analito, previamente homogeneizado em 300 mg de KBr com auxílio de gral e pistilo. A pastilha foi acomodada em suporte e levada ao equipamento para leitura e obtenção dos espectros (COOPER, 2005; SUI *et al.*, 2008).

3.2.2.5 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*Small angle X-ray scattering* – SAXS)

Com o intuito de esclarecer a distribuição espacial dos polissacarídeos nas misturas físicas e nas nanopartículas, fez-se uso de uma ferramenta ainda pouco explorada, mas que nos fornece resultados valiosos para o entendimento de estruturas nanoparticuladas, o SAXS (COOPER *et al.*, 2005). Os experimentos de SAXS foram conduzidos em Grenoble (França) no European Synchrotron Radiation Facility (ESRF).

Os espectros foram obtidos posicionando-se o detector SAXS a duas distâncias diferentes (5 ou 1 m), com a finalidade de atingir uma faixa mais ampla de “q”, onde $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin(\theta/2)$, λ é o comprimento de onda utilizado e θ é o ângulo de espalhamento (CHEN *et al.*, 2009).

Foram avaliadas somente as nanopartículas presentes na amostra Np2, compostas por QT e FC. Além dessa amostra, a mistura física entre os dois polímeros presentes na nanopartículas também foi avaliada, apresentando a proporção idêntica entre os polissacarídeos (1:1) nas mesmas concentrações (0,1%). A seleção dessas amostras teve como finalidade detectar a influência do processamento por sonicação e gotejamento, realizado no item 3.2.1, na organização estrutural das cadeias poliméricas, em comparação à simples mistura física de duas soluções.

3.2.2.6 Estudo de separação de partículas por centrifugação

As dispersões de nanopartículas foram centrifugadas a rotações crescentes, onde seus respectivos sobrenadantes de cada etapa foram centrifugados a rotações cada vez mais altas. As rotações utilizadas foram: 87,76; 548,51; 2194,07; 4936,66; 19746,67 e 28435,21 x g. Os seis *pellets* recolhidos foram ressuspensos em 500 μ L de água MilliQ, com auxílio de sonificador por 30 minutos. Tanto os *pellets* ressuspensos quanto o sobrenadante final tiveram seus diâmetros médios de partículas aferidos para construção gráfica do perfil de separação de nanopartículas.

3.2.2.7 Quantificação dos polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados possuem a propriedade de complexarem com azul de dimetilmetileno, a qual é amplamente utilizada e difundida na rotina de quantificação bioquímica dessa classe de moléculas. Esse tipo de complexação é conhecido como reação de metacromasia (SABISTON, ADAMS & HO, 1985; JONG *et al.*, 1989)

Os PS estudados (SC e FC) foram quantificados através de reação de metacromasia por complexação com DMB (azul de dimetilmetileno) através de leitura espectrofotométrica ($\lambda = 525$ nm) (LEE; KUNG; LEE, 2005). Uma reta de calibração foi determinada com o intuito de auxiliar a quantificação dos PS em algumas das metodologias aplicadas. Essa reta foi construída a partir de soluções preparadas com matérias-primas utilizadas no preparo das nanopartículas. As retas de calibração foram construídas a partir da diluição de uma solução-mãe (100 $\mu\text{g/mL}$ de PS em tampão fosfato pH 7,4). As diluições em tampão fosfato pH 7,4 geraram concentrações de 1, 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

A partir da regressão linear da curva de calibração foi gerada uma equação ($y = ax + b$) correspondente à faixa linear de absorvância do material sulfatado. Para a determinação da concentração de PS presentes nas nanopartículas, estas foram solubilizadas em tampão fosfato pH 7,4, com o auxílio de sonicação e agitação, complexadas com DMB na proporção de 1:4 e levadas à medição por espectrofotometria na região da luz visível ($\lambda = 525$ nm). A leitura de absorvância foi aplicada na equação da reta (y) para determinação da concentração do polissacarídeo sulfatado na amostra (x).

3.2.2.8 Medidas de mucoadesividade

Primeiramente, uma membrana foi produzida a partir de uma suspensão contendo 8% de mucina estomacal suína tipo II em tampão fosfato pH 6,8. A suspensão de mucina foi depositada sobre uma membrana plástica impermeável, delimitada por bordas de borracha e submetida à secagem em capela durante 12 horas a 25°C. Após o tempo necessário de secagem foram recortados pequenos discos apresentando 2 cm^2 de área.

Um aparato célula de difusão do tipo Franz com o compartimento doador modificado, como descrito por Bonferoni e colaboradores (1999) foi utilizado nesse experimento. No

compartimento doador, o fluxo de entrada da solução tampão foi mantido através de seus dois orifícios, sendo regulado através de uma bomba de duplo pistão utilizada em equipamentos de CLAE. A solução tampão no orifício de saída do compartimento foi coletada em diferentes frascos em intervalos fixos de tempo (10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos). A membrana de mucina foi posicionada entre os compartimentos doador e receptor da célula de Franz, sobre membrana plástica de Parafilm[®] (impermeável aos fluidos). A câmara receptora foi preenchida com água destilada, em circulação, com a finalidade de manter o sistema termoregulado a 37°C. Duzentos microlitros de suspensão de nanopartículas (200 µL) foram depositados sobre a membrana (área = 2 cm²), e posteriormente HBSS pH 6,8 a 37°C, com fluxo de 0,3 mL/min, mimetizou a ação de lavagem dos fluidos intestinais. Nos intervalos de tempo pré-estabelecidos, cada frasco coletor foi substituído por um novo, coletando o fluido proveniente do compartimento doador modificado. Os frascos foram liofilizados, concentrando o material coletado, e em seguida, este foi solubilizado em solução tampão fosfato pH 7,4 visando a quebra das nanopartículas e a liberação das moléculas sulfatadas. Assim, por método espectrofotométrico descrito anteriormente, os polissacarídeos sulfatados foram quantificados, rendendo uma medida indireta da quantidade de nanopartículas que não foram removidas pelo fluxo de tampão sobre a membrana e que permaneceram aderidas à membrana.

3.2.3 Ensaios Biológicos

3.2.3.1 Ensaios de Coagulação *in vitro*

Esses ensaios foram conduzidos de forma adaptada segundo os métodos descrito por Anderson e colaboradores (1976), Gulliani, Hyun & Litten (1976) e Assafim e colaboradores (2006), utilizando as amostras de nanopartículas Np2 e soluções de FC. A atividade coagulante foi avaliada através dos testes de tempo de recalcificação (TR), tempo de tromboplastina parcial ativada – *activated partial thromboplastin time* (aPTT) e tempo de protrombina – *prothrombin time* (PT). Tais métodos já se apresentam consagrados na pesquisa científica e rotina laboratorial de monitoramento de atividade anticoagulante (VALERIE, 2009).

Ratos Wistar (ambos os sexos) pesando entre 150 e 200 g foram anestesiados com

cetamina (100 mg/kg de peso corporal) seguido de xilazina (16 mg/kg de peso corporal), por via intramuscular, para os procedimentos cirúrgicos. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), Vogel e Vogel, 1998 e *Committee on Animal Research and Ethics* (CARE) e aprovados Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz – CEUA/FIOCRUZ (032/2010). Amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca (5000 µL), em tubo contendo citrato. Os tubos com as amostras foram centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm para obtenção de plasma deficiente em plaquetas, sendo mantido à temperatura ambiente.

Nos ensaios de tempo de recalcificação, 100 µL de plasma foram incubados a 37°C por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 150 µL de amostra e/ou tampão fosfato pH 7,4 e incubou-se por mais 2 minutos a 37°C. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL de cloreto de cálcio 50 mM (previamente aquecido à 37°C) e o tempo de coagulação do plasma foi observado em segundos, através do microcoagulômetro AMELUNG, modelo KC4A, Alemanha (GULLIANI, HYUN & LITTEN, 1976).

Para a realização dos testes de aPTT, 50 µL de plasma com 100 µL de amostra e/ou tampão foram incubados à 37°C por 1 minuto. Em seguida, 50 µL de cefalina ativada (BIOLAB) foram adicionados e incubados por mais 2 minutos à 37°C. A reação foi disparada com a adição de 100 µL de cloreto de cálcio 50 mM (previamente aquecido a 37°C) e o tempo de coagulação do plasma foi observado em segundos, através do microcoagulômetro AMELUNG, modelo KC4A, Alemanha (ANDERSON *et al.*, 1976; ASSAFIM *et al.*, 2006).

Para a execução do ensaio de PT, 50 µL de plasma na presença de 100 µL de amostra e/ou tampão foram incubados à 37°C por 2 minutos. Em seguida, a reação foi disparada com 100 µL de tromboplastina cálcica (BIOLAB) (previamente aquecida à 37°C) e o tempo de coagulação do plasma foi observado em segundos através do microcoagulômetro AMELUNG, modelo KC4A, Alemanha (ASSAFIM *et al.*, 2006).

3.2.3.2 Estudos de citotoxicidade

3.2.3.2.1 Em células Caco-2

Em uma placa de 96 poços foram semeadas 32.000 células / poço, em um volume total de 200 microlitros / poço, utilizando Dulbecco's modified Eagle's médium 10% (DMEM, pH 7,40) como meio de cultura. Em seguida, os substratos celulares foram levados a incubadora a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas para o crescimento celular. Durante a execução dos experimentos as células apresentavam-se na passagem 38 (KONSOULA & BARILE, 2005).

Transcorridas as 24 horas, após ter aspirado o meio de cultura dos poços, as células foram colocadas em contato com as seguintes amostras: soluções de FC em HBSS pH = 6,8 a 500, 1000 e 1500 µg/mL; misturas físicas entre quitosana e fucoidan em HBSS pH = 6,8 nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL e Np2 em HBSS pH =6,8 preparadas em concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. Como controle positivo foi usado HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) pH = 6,8 e como controle negativo uma solução de Triton 10%.

As amostras foram mantidas em contato com as células por 3 horas e em seguida aspiradas. Assim, as células foram tratadas com o reagente MTT a uma concentração de 2,5 mg/mL, adicionando-se 100 µL de HBSS pH = 7,4 e 25 µL de solução de MTT por poço. A placa contendo as células com MTT foi incubada por mais 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Transcorrido o tempo de incubação, a solução de MTT foi aspirada e as células foram lavadas com solução tampão fosfato (pH = 7,4), o qual foi aspirado e então foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), com a finalidade de romper a membrana celular, permitindo a liberação dos cristais de formazam formados, gerando uma coloração violeta mais ou menos intensa de acordo com o grau de viabilidade celular. As leituras de absorbância dos poços foram realizadas em *Microplate Absorbance Reader* iMARK™, a 570 nm com referência a 690 nm, após agitação vigorosa durante 60 segundos (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010).

3.2.3.2.2 Em células endoteliais vasculares de cordões umbilicais humanos – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC)

Em uma placa de 96 poços, foram semeadas 30.000 células / poço, em um volume total de 200 microlitros / poço, utilizando *Endothelial Cell Growth Medium-2* (EGM-2) como meio de cultura. Em seguida, os substratos celulares foram levados a incubadora a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas para o crescimento celular. Durante a execução do experimento as células apresentavam-se durante a passagem de número 4.

Transcorridas as 24 horas, após ter aspirado o meio de cultura dos poços, as células foram colocadas em contato com as seguintes amostras (n = 4): soluções de FC em HBSS pH = 7,4 a 500, 1000 e 1500 µg/mL; misturas físicas entre quitosana e fucoidan em HBSS pH = 7,4 nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL e Np2 em HBSS pH = 7,4 preparadas em concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. Como controle foi utilizado HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) pH = 7,4.

As amostras foram mantidas em contato com as células por 3 horas e em seguida aspiradas. Assim, as células foram tratadas com o reagente MTT a uma concentração de 2,5 mg/mL, adicionando-se 100 µL de HBSS pH = 7,4 e 25 µL de solução de MTT por poço. A placa contendo as células com MTT foi incubada por mais 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Transcorrido o tempo de incubação, a solução de MTT foi aspirada e as células foram lavadas com solução tampão fosfato (pH = 7,4), o qual foi aspirado e então foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), com a finalidade de romper a membrana celular, permitindo a liberação dos cristais de formazam formados, gerando uma coloração violeta mais ou menos intensa de acordo com o grau de viabilidade celular. As leituras de absorbância dos poços foram realizadas em *Microplate Absorbance Reader* iMARK™, a 570 nm com referência a 690 nm, após agitação vigorosa durante 60 segundos (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010).

3.2.3.3 Ensaios de permeabilidade em monocamada de células Caco-2

As suspensões de nanopartículas, preparadas em HBSS pH 6,8, foram submetidas aos testes de permeabilidade através de monocamada de células Caco-2 durante passagem 38. As células foram semeadas sobre filtros de policarbonato (área de 113,1 mm² e diâmetro interno

de 13,85 mm) em placas de 12 poços, a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cm².

O meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, pH 7,40) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de benzilpenicilina (160 UI/mL) - sulfato de streptomicina (100 µg/mL) e 1% de aminoácidos não-essenciais, foi utilizado como meio de cultura. As culturas celulares foram mantidas a 37°C e atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Os filtros contendo as células foram mantidos, com trocas de meio de cultura, durante 21-23 dias após a semeadura, e usados para as medidas de resistência elétrica transepitelial e experimentos de transporte (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010).

Quinhentos microlitros de amostra de solução de FC ou nanopartículas a 1000 µg/mL em HBSS pH 6,8, preparadas como descritas no item 3.2.1., foram acondicionadas no compartimento apical da monocamada de células. No compartimento basolateral, HBSS pH 7,4 (1,5 mL) foi utilizado como meio receptor. Em tempos fixos a 0,5; 1; 2; 3 horas, cada filtro e seu compartimento apical foram reposicionados sobre um novo poço contendo meio basolateral fresco. Todas as soluções receptoras foram coletadas, liofilizadas, ressuspendidas em 500 µL de tampão fosfato pH 7,4 e analisadas por método espectrofotométrico previamente descrito. Após 3 horas, os compartimentos apicais foram esvaziados, e seus respectivos conteúdos foram estocados para quantificação de polissacarídeo sulfatado e cálculo de percentual de recuperação do analito. O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$P_{app} = dQ/dt / (A * 60 * C_0)$$

onde dQ/dt é a taxa de permeabilidade (quantidade de polissacarídeo sulfatado permeado por minuto), A é a área de difusão da monocamada de células, C_0 é a concentração inicial de polissacarídeo sulfatado (YOUDIM, AVDEEF & ABBOTT, 2003; SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010). A divisão por 60 significa a transformação da unidade de tempo de minutos para segundos nos experimentos de permeação.

O percentual de recuperação foi calculado segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ recuperação} = (PS^{t3}_{\text{apical}} + PS^{t3}_{\text{basolateral}}) / PS^{t0}_{\text{apical}} * 100$$

onde PS^{t3}_{apical} é a quantidade de polissacarídeo sulfatado que permaneceu no compartimento apical ao final do experimento de permeação (3 h), $PS^{t3}_{\text{basolateral}}$ é a quantidade de PS recuperado no compartimento basolateral ao final do experimento de permeação (3 h), finalmente, PS^{t0}_{apical} é a quantidade de PS presente no compartimento apical no início do experimento de permeação.

Durante o experimento a integridade da monocamada foi medida através da resistência elétrica transepitelial – *Transepithelial Electric Resistance* (TEER), em intervalos fixos (juntamente com os tempos de coleta), utilizando Millicell ERS-meter (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010).

.

3.2.3.4 Ensaios de permeabilidade intestinal em jejuno de ratos

Previamente à realização dos ensaios foi necessária uma preparação do tecido intestinal removido de ratos Wistar-Harlan machos pesando entre 250 e 350 gramas. Após o processo de indução de anestesia aos animais, estes foram sacrificados de acordo com normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), Vogel e Vogel, 1998 e *Committee on Animal Research and Ethics* (CARE). Em seguida, o segmento intestinal correspondente ao jejuno foi seccionado e removido. Os segmentos foram cortados longitudinalmente, formando tiras de tecido intestinal fresco, que ainda encontravam-se ricas em muco na parte correspondente à luz intestinal.

As amostras (soluções de PS ou suspensões de nanopartículas) em HBSS pH 6,8, à concentração de 1000 µg/mL, foram submetidas aos testes de permeação intestinal em células do tipo Franz com orifícios medindo 2 cm² e termostatizadas a 37°C. Tecidos de jejuno frescos retirados de ratos machos pesando entre 250 e 350 g foram posicionados sobre filtro de papel, entre os compartimentos doador e receptor da célula de difusão de Franz. As amostras (500 µL) foram depositadas no compartimento doador sobre o tecido de jejuno de ratos. Como meio receptor, utilizou-se HBSS pH 7,4, mantendo as condições sink nesse meio durante toda a duração do experimento. Em intervalos fixos de tempo, 700 µL foram

coletados do meio receptor, seguido de reposição com HBSS pH 7,4 (SANDRI *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010). Os PS foram determinados nas frações coletadas por método espectrofotométrico descrito anteriormente. O coeficiente de permeabilidade aparente foi calculado utilizando a equação descrita no item 3.2.3.3.

3.2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste t de Student para comparação de dois grupos ou One-Way ANOVA para comparação de três ou mais grupos ($p < 0,05$), utilizando-se o software SigmaPlot 11.0, Systat Software Inc. (2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DE NANOPARTÍCULAS POLISSACARÍDICAS

A seleção dos polissacarídeos a serem utilizados foi baseada em trabalhos anteriores que buscaram a produção de nanopartículas polissacarídicas ao complexarem QT com diferentes macromoléculas sulfatas. O SC já havia sido explorado anteriormente em forma de micropartículas direcionadas ao encapsulamento e liberação de metoclopramida (GANZA-GONZÁLEZ *et al.*, 1999) ou até mesmo para encapsulamento de HBPM em micropartículas de QT e SC (SUI *et al.*, 2008). Neste trabalho o SC foi complexado com QT gerando uma estrutura nanométrica a partir de um método mais simples e com menor número de reagentes do que os processos utilizados por outros autores. Assim, por não apresentar atividade anticoagulante relevante, o uso de SC permitiu a elaboração de um modelo de baixo custo para a produção de nanopartículas de fucoidan, o qual apresenta um custo comercial mais elevado do que o sulfato de condroitina.

A escolha de FC para utilização neste trabalho envolveu uma extensa busca bibliográfica por um polissacarídeo sulfatado com alta atividade anticoagulante e que ainda não tivesse sido investigado em forma de nanopartículas direcionadas para a terapia anticoagulante via oral.

Após a determinação de quais materiais seriam utilizados foram realizadas investigações a respeito da solubilização de QT em ácido acético 1% e dos PS em tampão bórax e água MilliQ. Constatou-se que nas concentrações de 0,05% e 0,1% esses polissacarídeos são facilmente solúveis nos solventes testados. Por outro lado, a 0,2% e 0,3%, o polissacarídeo catiônico era parcialmente solubilizado, mesmo com o auxílio de agitação magnética e banho de ultrassom durante trinta minutos. Além disso, o aumento da viscosidade da solução de quitosana nas concentrações de 0,2% e 0,3% dificultou o preparo das nanopartículas, visto que o diâmetro da agulha utilizada dificultava a passagem da solução mais viscosa. Os PS apresentaram-se facilmente solúveis em todas as concentrações testadas em ambos os solventes, tampão bórax e água MilliQ.

Dessa forma, seguindo de forma adaptada as metodologias descritas em trabalhos anteriores (SARMENTO *et al.*, 2007; SUI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; YEH *et al.*, 2011), que relataram concentrações de 0,05% e 0,1% no preparo de nanopartículas polissacarídicas

contendo quitosana, optou-se pelo uso dessas concentrações, sempre na razão de 1:1 entre quitosana e o polissacarídeo sulfatado a ser complexado. Assim, elaborou-se uma combinação de concentrações e polissacarídeos que resultaram na Tabela 2.

As nanopartículas resultantes do procedimento puderam ser classificadas em dois grupos (SC, FC), baseado no tipo de polímero complexado com a quitosana. Dentro de cada grupo estão contidas quatro amostras diferentes, dependendo do solvente utilizado na solubilização do polissacarídeo sulfatado, tampão bórax ou água MilliQ.

Tabela 2: Combinação de soluções de polissacarídeos em tampão bórax, em diferentes concentrações, para a produção de oito diferentes suspensões de Np.

Amostra	Solvente	QT	SC	FC
Np1	Tampão Bórax	0,1%	0,1%	
Np2	Tampão Bórax	01%		0,1%
Np3	Água MilliQ	0,1%	0,1%	
Np4	Água MilliQ	0,1%		0,1%
Np5	Tampão Bórax	0,05%	0,05%	
Np6	Tampão Bórax	0,05%		0,05%
Np7	Água MilliQ	0,05%	0,05%	
Np8	Água MilliQ	0,05%		0,05%

* QT = quitosana; SC = sulfato de condroitina; FC = fucoidan

Em uma avaliação de aspecto visual das dispersões de nanopartículas observou-se que nenhuma delas apresentava aglomerados visíveis de partículas ou material polimérico em suspensão. Todas as dispersões apresentaram-se mais turvas do que as soluções iniciais de polissacarídeos. Aquelas que foram preparadas a partir de soluções em concentrações de 0,05% apresentaram-se menos turvas do que as que foram obtidas a partir de soluções a 0,1%, mostrando uma maior carga de nanopartículas nestas.

Os valores de pH encontrados para os solventes, soluções e dispersões de nanopartículas estão demonstrados na Tabela 3, onde pode-se observar que nanopartículas produzidas com tampão bórax possuem pH mais alto do que aquelas onde água MilliQ foi usada para solubilizar o polissacarídeo sulfatado. Assim, ao se utilizar água MilliQ, foram obtidas partículas em meio mais acidificado, dificultando a lavagem das nanopartículas e remoção da acidez, para posterior utilização em testes biológicos.

Tabela 3: Valores médios de pH dos solventes, soluções e suspensões de nanopartículas.

Solução	pH
Ácido acético 1%	2,90 ± 0,14
Quitosana (0,05% ou 0,1%)	3,00 ± 0,14
Tampão bórax	9,16 ± 0,06
Polissacarídeos sulfatados em tampão bórax (0,05% ou 0,1%)	9,10 ± 0,14
Polissacarídeos sulfatados em água MilliQ (0,05% ou 0,1%)	6,35 ± 0,02
Np (SC ou FC) em tampão bórax	4,00 ± 0,12
Np (SC ou FC) em água MilliQ	2,50 ± 0,08

* n = 2; d.p. = desvio padrão

4.2 DETERMINAÇÃO DE DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA

Os diâmetros médios (DM) e índices de polidispersividade de Np1 a Np8 foram medidos e os resultados estão demonstrados Tabela 4. Todas as amostras preparadas apresentam diâmetros médios de partículas satisfatórios para a produção de sistemas nanoestruturados, porém, algumas amostras exibiram valores altos de desvio padrão entre as réplicas, evidenciando uma baixa reprodutibilidade em alguns sistemas, especialmente nas amostras Np6, Np7 e Np8. Os valores de DM encontrados para as três réplicas de Np8 foram 146,3 nm, 332,8 nm e 546,0 nm, exibindo uma faixa de diâmetro diferente para cada replicata, justificando o alto desvio padrão da amostra (200,00 nm), baixa robustez em seu preparo. Por outro lado, os índices de polidispersividade entre as três réplicas apresentaram-se homogêneos e não muito elevados ($n_1 = 0,197$; $n_2 = 0,315$; $n_3 = 0,259$), resultando em uma média de 0,257 e baixo desvio padrão (0,059).

A formulação Np1 apresentou o menor diâmetro médio de partículas ($154,2 \pm 35,77$ nm) e Np7 a maior média de diâmetro médio ($453,37 \pm 369,48$ nm), dentre os sistemas produzidos a partir de quitosana e sulfato de condroitina.

Realizando tratamento estatístico dos valores de DM entre Np1 e Np7 viu-se que não existe diferença significativa entre as duas amostras, porém, deve-se considerar que o valor de d.p. de Np7 é extremamente elevado, prejudicando uma comparação entre as amostras. Assim, mesmo não apresentando valor de $p < 0,05$, tomou-se Np1 como uma melhor escolha do que Np7, por esta apresentar alta heterogeneidade entre as suas réplicas.

Entre Np1 e Np5 a diferença entre o DM das amostras também rendeu um valor de $p > 0,05$, e diferentemente de Np7, Np5 apresentou baixo d.p. entre as amostras. Com isso, Np1 foi selecionada e Np5 descartada por conta da diferença significativa ($p = 0,021$) entre os valores de IP das amostras, que apresentaram médias de 0,207 e 0,109, para Np5 e Np1, respectivamente. O mesmo ocorreu entre os valores de IP de Np1 e Np3 ($p = 0,049$).

Todas as amostras avaliadas apresentaram IP abaixo de 0,265. Ordenando decrescentemente a homogeneidade das amostras, temos que $Np1 > Np2 > Np3 > Np4 > Np5 > Np8 > Np6 > Np7$. Assim, os sistemas analisados foram considerados de baixa polidispersão de DM, quando comparados a outros trabalhos utilizando quitosana associada a outros polímeros negativos (CHEN, ZHANG, HUANG, 2007; TSAI, BAI, CHEN, 2008).

Para as nanopartículas produzidas utilizando fucoidan, percebeu-se que o menor diâmetro médio obtido pertence à Np2 ($198,00 \pm 38,84$ nm), enquanto que Np4 resultou no maior DM ($352,73 \pm 41,46$ nm).

A amostra Np2 foi estatisticamente comparada à Np4, apresentando diferença significativa entre ambas ($p = 0,009$). Quando Np2 foi comparada a Np6 e Np8, não houve diferença significativa entre as amostras, porém, assim como no caso entre Np1 e Np7, a amostra Np2 foi selecionada para dar continuidade aos estudos por conta de sua maior homogeneidade de DM (menor d.p.) em relação à Np6 e Np8.

Há uma indicação que as nanopartículas produzidas a partir de soluções de polissacarídeos sulfatados a 0,1% em tampão bórax apresentaram uma diminuição do DM acompanhada por menores índices de polidispersividade, quando se realiza uma comparação com amostras produzidas a partir de soluções a 0,1% em água MilliQ. Assim, Np1 e Np2 apresentaram-se como as amostras com as melhores características de diâmetro médio e polidispersividade.

De um modo geral, as nanopartículas preparadas a partir de solução de SC ou FC em tampão bórax renderam melhores valores de DM e IP do que as produzidas utilizando água MilliQ como solvente. Essa tendência pode ser observada para as nanopartículas contendo SC comparando-se Np1 e Np5 a Np3 e Np7, respectivamente. Para as Np de FC o mesmo efeito pode ser observado comparando-se Np2 e Np6 a Np4 e Np8, respectivamente.

Tabela 4: Resultados de diâmetros médios de partículas, potencial zeta e índice de polidispersividade, por espalhamento dinâmico de luz das nanopartículas.

Amostras	Diâmetro médio (nm) \pm d.p.	Potencial Zeta (mV) \pm d.p.	Índice de polidispersividade \pm d.p.
Np1	154,20 \pm 35,77	+ 34,50 \pm 0,65	0,109 \pm 0,015
Np2	198,00 \pm 38,84	+ 43,30 \pm 0,48	0,139 \pm 0,019
Np3	189,63 \pm 17,57	+ 41,20 \pm 0,74	0,149 \pm 0,020
Np4	352,73 \pm 41,46	+ 52,50 \pm 1,00	0,203 \pm 0,011
Np5	180,90 \pm 63,04	+ 35,88 \pm 1,74	0,207 \pm 0,044
Np6	269,80 \pm 201,78	+ 35,77 \pm 3,12	0,262 \pm 0,031
Np7	453,37 \pm 369,48	+ 44,94 \pm 0,85	0,265 \pm 0,022
Np8	341,70 \pm 200,00	+ 46,60 \pm 0,67	0,257 \pm 0,059

*d.p. = desvio padrão; n = 3

Segundo Gaumet e colaboradores (2008), nanopartículas com menores tamanhos são menos susceptíveis ao sistema de fagocitose mononuclear, aumentando seu tempo de circulação no organismo e a eficácia da liberação de um ativo, e conseguem penetrar entre lacunas endoteliais com maior facilidade, atingindo os tecidos-alvos. Isso confere uma forte razão para a seleção e Np1 e Np2 como os sistemas de liberação de fármacos no lugar das amostras com maiores DM.

Trabalhos anteriores relataram a produção nanopartículas de quitosana com tripolifosfato (substituto do SC com alto grau de sulfatação e carga negativa) por coacervação na presença de co-polímeros (óxido de polietileno), onde foram obtidos resultados de diâmetro médio entre 263,8 e 745,5 nm, utilizando concentrações de quitosana de 1 a 2,8 mg/mL e de tripolifosfato de 0,21 a 0,43 mg/mL (CALVO *et al.*, 1997-a). Esses resultados comparativos indicam que o processo de gotejamento feito pelo o autor, além de apresentar maior custo final por conta dos reagentes específicos, resultaram em diâmetros médios bem acima daqueles obtidos neste trabalho, como os que foram exibidos na Tabela 4.

4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (PZ)

Os estudos de PZ foram conduzidos para as amostras Np1 a Np8 e os resultados são demonstrados ainda na Tabela 4.

Todos os sistemas avaliados obtiveram densidades elétricas superficiais positivas. Os valores de potencial zeta atingidos nos permitem dizer que as Np exibem boa estabilidade física, pois apresentam valores acima de 30 mV em módulo (MULLER & HEINEMANN, 1992; ANDRADE, 2008).

A estabilidade das nanopartículas foi observada a “olho nu”, visto que durante os experimentos as amostras eram armazenadas a temperatura ambiente e não apresentavam precipitação de material durante os dias de utilização.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Nas Figuras 5 e 6 é possível observar as microscopias eletrônicas de transmissão de Np1 em dois campos diferentes de visualização (A e B). Nesses dois campos observados, confirmamos a presença de nanopartículas com tamanhos nas mesmas faixas de diâmetro médio aferidas pela Determinação de Diâmetro Médio de Partícula (item 4.2.) por espalhamento dinâmico de luz, com formatos esféricos ou ovalados, sem agregados significativos de partículas.

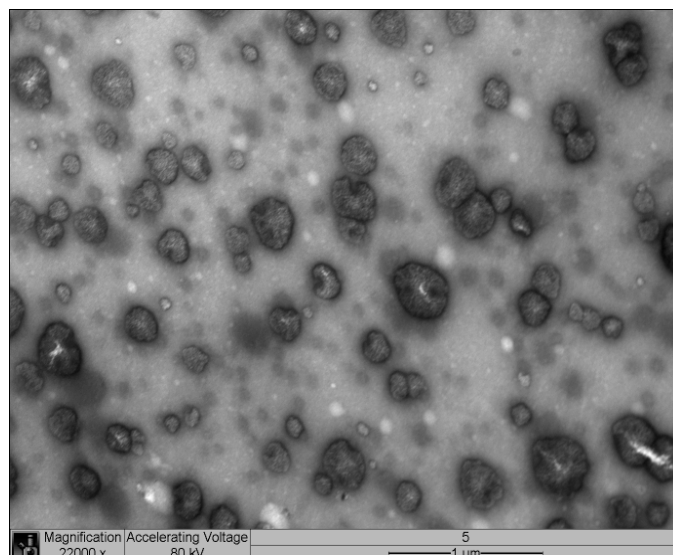


Figura 5: MET de Np1 (campo A), com aumento de 22000 vezes.

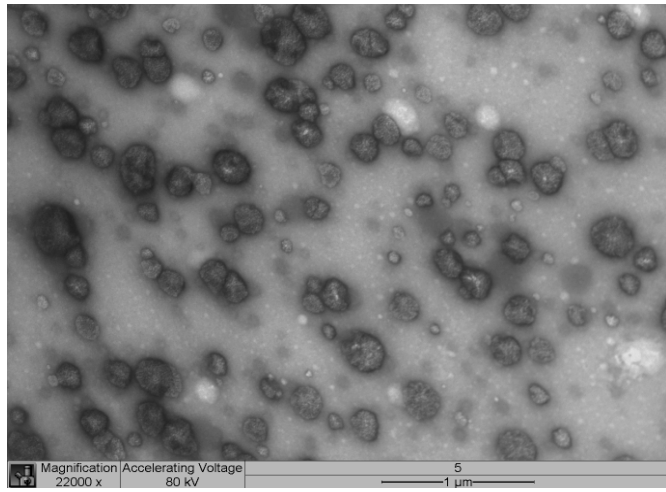


Figura 6: MET de Np1 (campo B), com aumento de 22000 vezes.

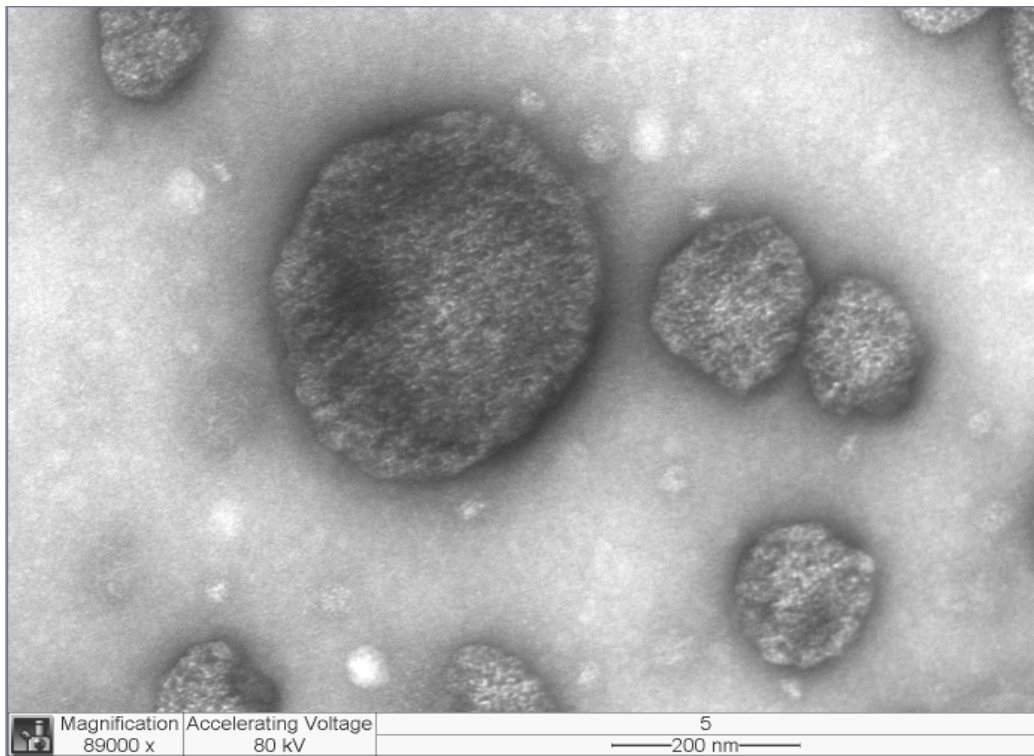


Figura 7: MET de Np1, com aumento de 89000 vezes.

Na Figura 7 pode-se observar com maior proximidade a relação entre o tamanho da partícula e a barra de comparação em escala (200 nm), de modo que algumas delas apresentam diâmetro abaixo de 200 nm, em comparação à escala dada. Esse resultado corrobora, mais uma vez, com as medidas de diâmetros médios de Np1 por espalhamento dinâmico de luz.

O sistema Np2 também foi submetido à análise por MET e o resultado encontra-se logo abaixo, na Figura 8. Nesta imagem pode-se observar, assim como em Np1, nanopartículas com formatos esféricos, regulares e na mesma faixa de tamanho atingida por análise de Determinação de Diâmetro Médio de Partícula (item 4.2.). O campo observado na Figura 8 apresentou-se pouco concentrado e por esse motivo há uma densidade menor de partículas na imagem quando comparada com as imagens 5, 6 e 7.

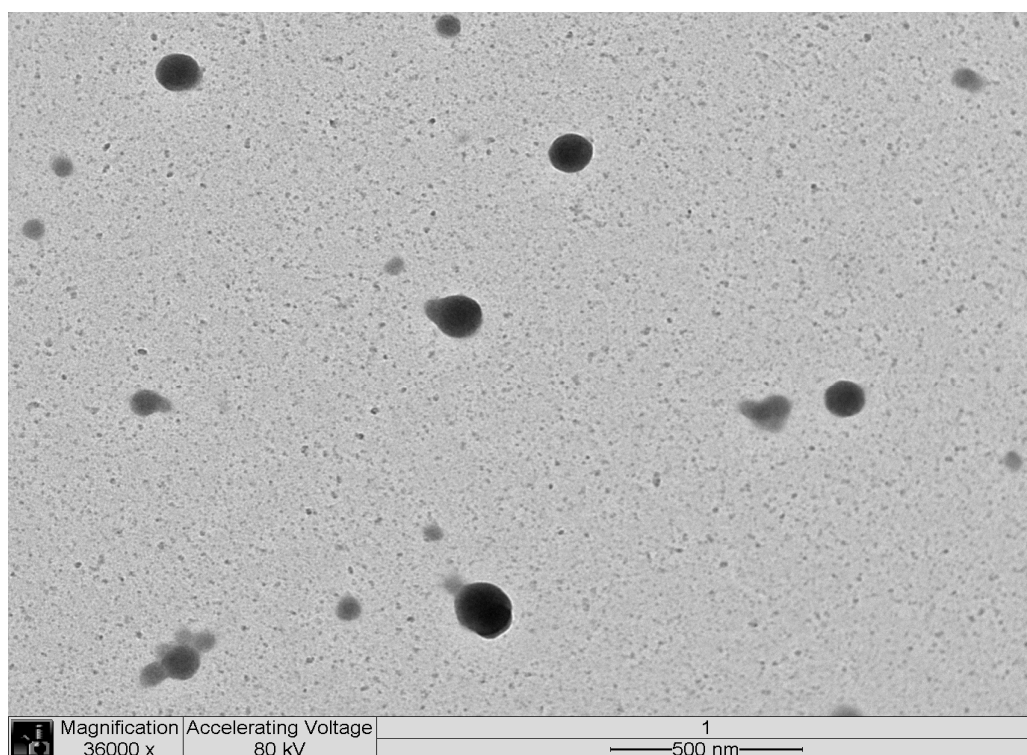


Figura 8: MET de Np2, com aumento de 36000 vezes.

Foram ainda realizadas microscopias eletrônicas de transmissão das misturas físicas entre os polissacarídeos (QT e SC, QT e FC), para investigar se a nanoestrutura esférica é encontrada somente nas amostras processadas por gotejamento e sonicação. As imagens desse

estudo estão demonstradas nas Figuras 9 e 10, onde percebemos uma alta concentração de estruturas com morfologia não muito bem definida, em formato grosseiro de “rede” ou “malha”, sem semelhança com as Np observadas nas Figuras 5, 6, 7, 8.

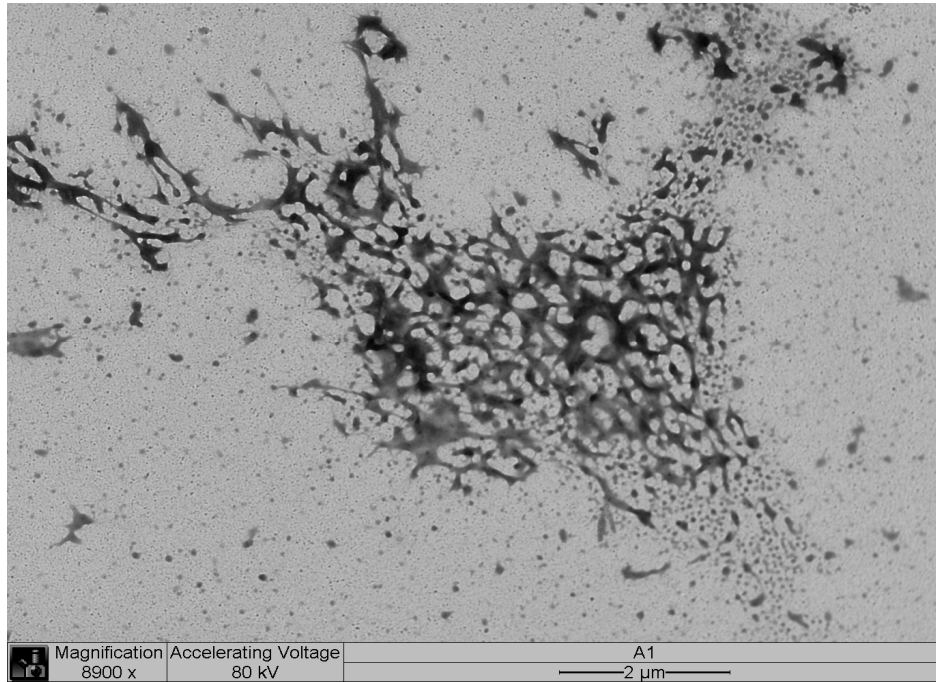


Figura 9: MET da mistura física de SC e QT (1:1), com aumento de 8900 vezes.

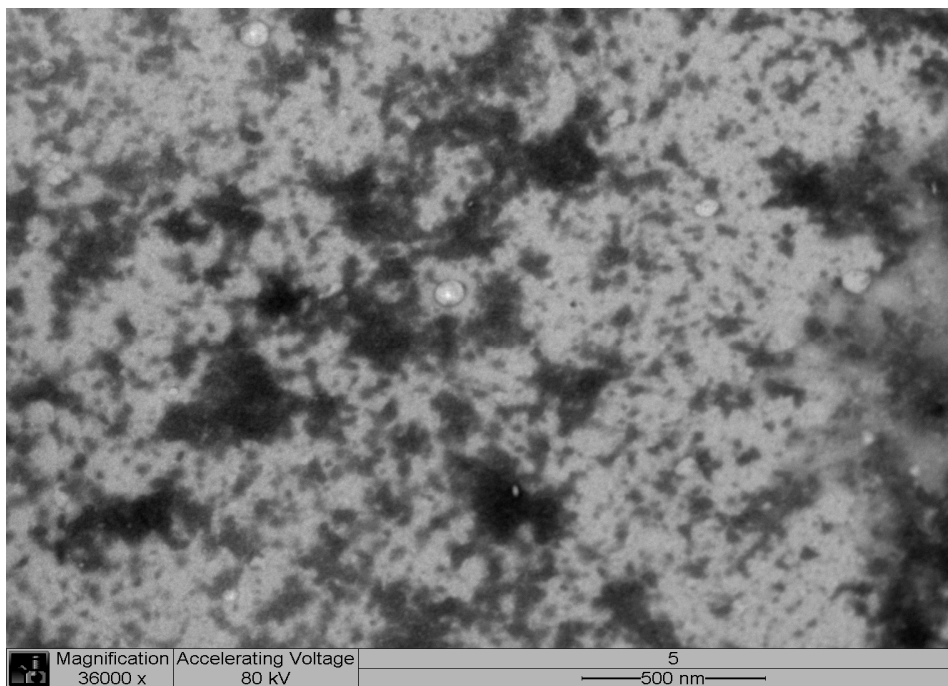


Figura 10: MET da mistura física de FC e QT (1:1), com aumento de 36000 vezes.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Figura 11 demonstra os espectros de infravermelho de QT, SC, FC e respectivas misturas físicas e nanopartículas. No espectro de QT, podem ser confirmadas as presenças das vibrações de estiramento de O–H e N–H em torno de 3400 cm^{-1} aonde a vibração de –OH é sobreposta pela da ligação N–H. A absorção do estiramento do C–H do grupo metil da quitosana é dada em torno de 2900 cm^{-1} ; a banda próxima de 1650 cm^{-1} corresponde à amida, já em 1600 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento simétrico do grupo amino. As vibrações de estiramento de C–O são encontradas em torno de 1000 a 1100 cm^{-1} .

No espectro do SC, pode-se confirmar a presença de vibrações de estiramento de –OH e N–H em cerca de 3400 cm^{-1} aonde o estiramento de –OH é sobreposto pelo de N–H, assim como no espectro de QT. A absorção de C–H do grupo metil é dada próximo de 2900 cm^{-1} ; as vibrações de C–O são encontradas em torno de 1050 cm^{-1} ; a banda em 1650 cm^{-1} corresponde à amida; as bandas em torno de 1400 e 1370 cm^{-1} ocorrem devido à junção da vibração de estiramento de C–O e a vibração angular variável de O–H, indicando a existência de grupos carboxilas livres; a banda em 1250 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento de ligações S–O (SO_4^{2-}), esse é a banda de absorção característica do polissacarídeo sulfatado.

Tanto no espectro de MF SC+QT quanto no de Np1 são visualizadas bandas características de SC e QT. Em aproximadamente 1250 cm^{-1} , há o aparecimento da banda referente ao grupo sulfato, nos espectros de SC, MF e Np1, porém, nesses dois últimos há uma diminuição da intensidade. (CALVO *et al.*, 1997-a; SUI *et al.*, 2008). O mesmo ocorreu para MF de QT e FC e suas respectivas nanopartículas.

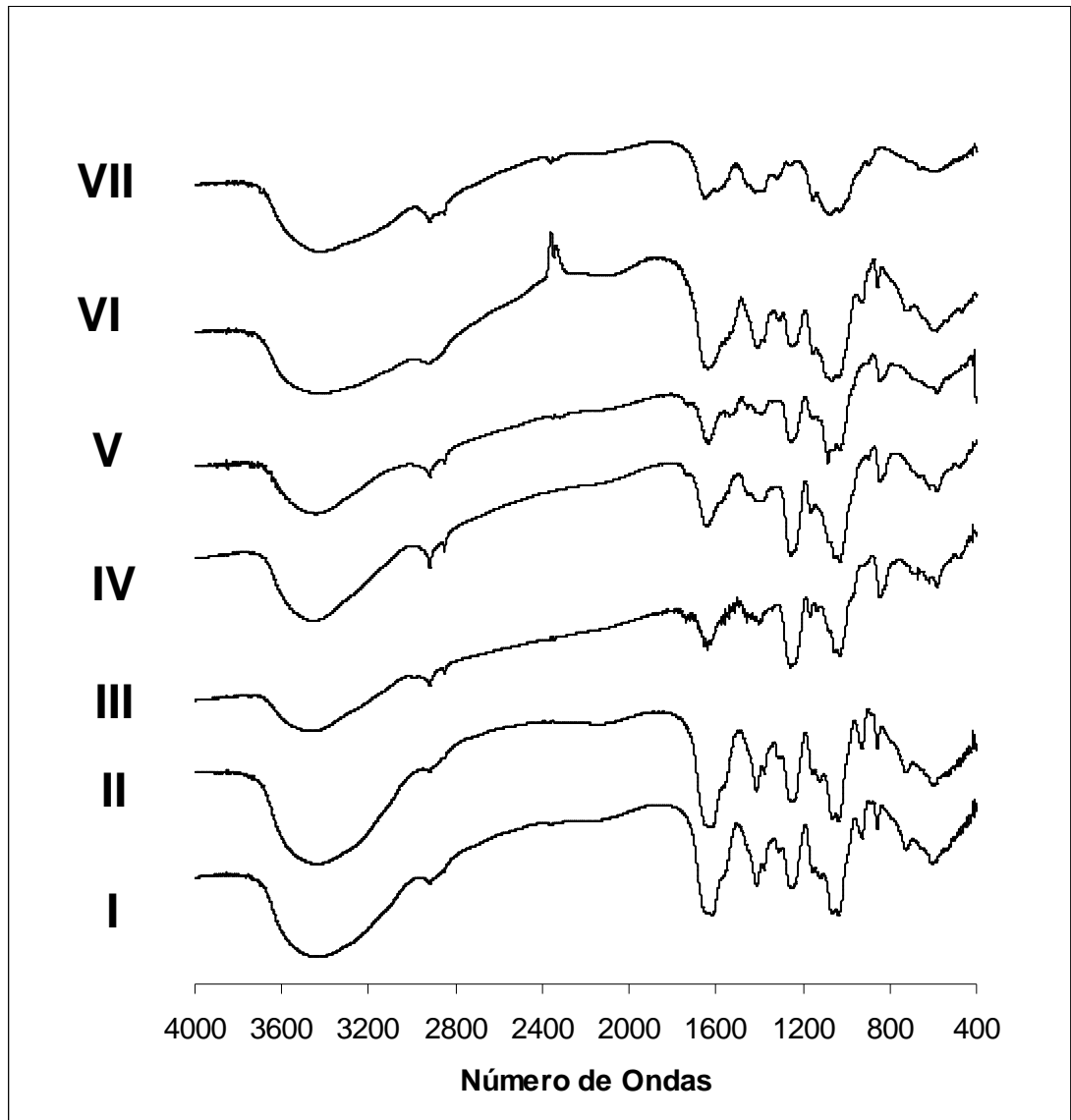


Figura 11: Espectros de infravermelho da mistura física de QT + SC (I); SC (II); FC (III); mistura física de QT + FC (IV); Np1 (V); Np2 (VI); QT (VII).

No espectro referente à FC também observamos o mesmo padrão de bandas encontrados em SC, que caracterizam as vibrações das principais ligações encontradas em estruturas glicosídicas sulfatadas, incluindo bandas em torno de 850 cm^{-1} , referentes às vibrações axiais secundárias do grupo sulfato (C–O–S), também presentes para SC (KARMAKAR *et al.*, 2009).

4.6 ANÁLISES POR ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

Os resultados das análises por SAXS demonstraram que a valores baixos de “q” o espectro da mistura física tornava-se paralelo às retas de pendências típicas das estruturas do tipo malha. Em outras palavras, o espectro à baixos valores de “q” se “dobra” tendendo a zero com uma pendência semelhante às pendências do tipo malha ou rede, - 1,7 e - 2,5. A $q = 1$, uma dimensão característica de 60 Å (6 nm), o espectro da mistura física encontra-se novamente paralelo à pendência de - 1,7, típica dos bastões, o que significa dizer que existem pequenos estruturas longas e estreitas (bastões) em meio a malha de polissacarídeos formada (Figura 12).

Já para as nanopartículas, o espectro de Np2 apresenta pendência plana quando “q” tende a zero. Assim, pode-se dizer que Np2 está organizada em dimensões finitas e bem delimitadas, como uma esfera, por exemplo. Assim como ocorrido nas misturas físicas, à distância de 1 m também foi possível observar estruturas condensadas no interior das nanopartículas, provando a existência de núcleos de condensação em menor escala, na ordem de algumas dezenas de angstroms (Figura 13).

A escolha do tampão bórax como solvente de preparo das soluções de polissacarídeos aniônicos também pode ser explicada de acordo com a teoria dos núcleos de condensação, pois a pH em torno de 9,0 as cadeias de polissacarídeos estariam mais distendidas pela carga negativa excessiva. Assim, exibem maior disponibilidade de interação com as cadeias de quitosana carregadas positivamente, formando mais núcleos de condensação e gerando menores partículas do que aquelas produzidas com água MilliQ.

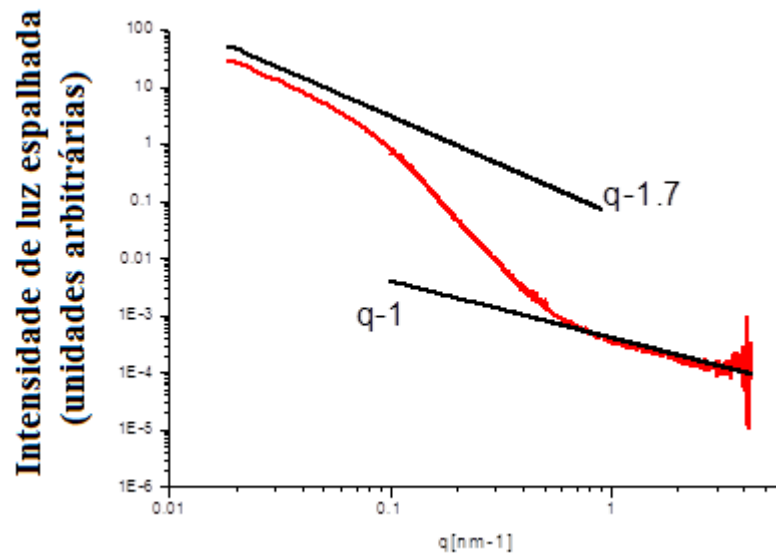


Figura 12: Análises por SAXS da misturas física entre FC e QT.

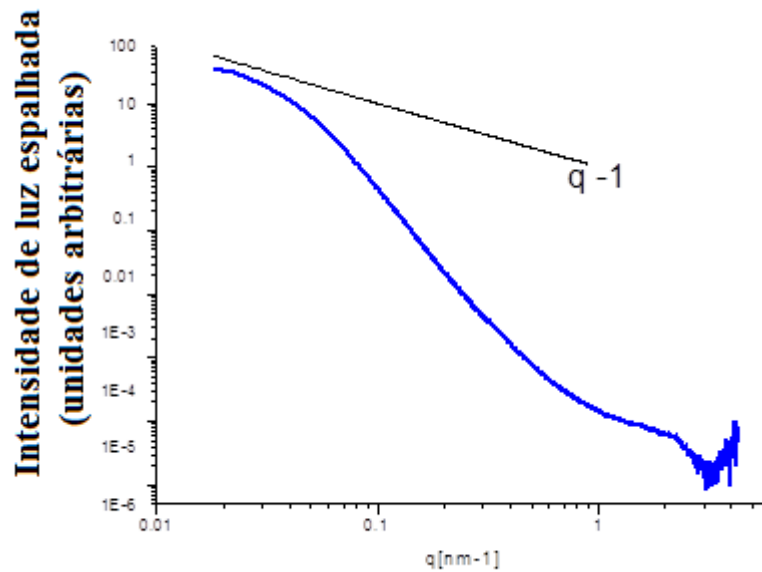


Figura 13: Análises por SAXS de nanopartículas contendo FC e QT.

Desse modo, compreende-se que as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho estão organizadas como uma matriz polimérica de quitosana com pequenos núcleos de condensação de polissacarídeo sulfatado espalhados, vide Figura 14, assim como representado para nanopartículas de quitosana e heparina preparadas por coacervação complexa por Chen e colaboradores (2009). Nesse modelo estrutural das Np polissacarídicas percebe-se o efeito do

pH na desprotonação das cadeias de QT, gerando uma descomplexação e liberação do material sulfatado. Por este mecanismo há a quebra gradual das nanopartículas dependente do pH.

Observando a Tabela 3 e a Figura 14 percebeu-se que as amostras preparadas com PS solúveis em tampão bórax encontravam-se estáveis e condensadas após o preparo, pois estão dispersas em meio acidificado, pH = 4,0.

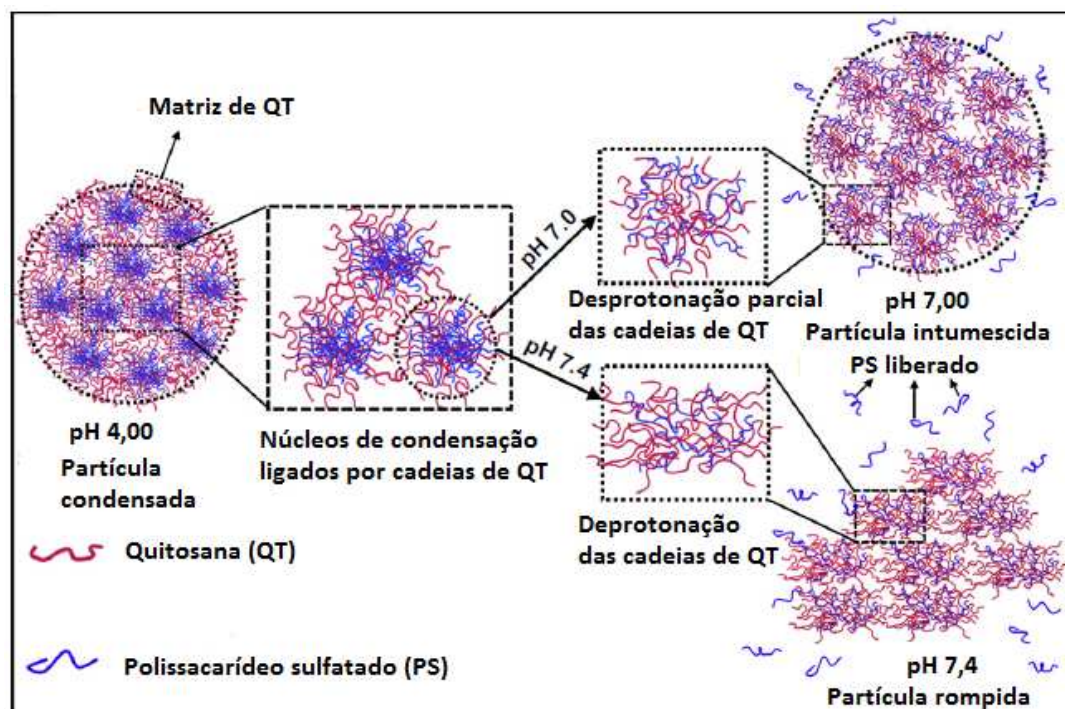


Figura 14: Representação esquemática das nanopartículas de quitosana e polissacarídeos sulfatados com núcleos de condensação dispersos na matriz polimérica de quitosana e seu comportamento diante de diferentes valores de pH. (Adaptado de Chen *et al.*, 2009)

4.7 ESTUDO DE SEPARAÇÃO DE PARTÍCULAS POR CENTRIFUGAÇÃO

Com o intuito de separar exclusivamente partículas na faixa nanométrica (abaixo de 1 μm) para a realização dos ensaios biológicos, delineou-se o estudo de separação de nanopartículas por centrifugação. Assim, todas as respostas biológicas avaliadas seriam devido ao comportamento dos materiais na escala nanométrica, sem sofrer influência de resquícios de polímeros residuais não complexados durante o preparo das Np.

Nesse estudo obteve-se um perfil de DM de partículas em função da centrifugação sequencial realizada para uma mesma amostra, Np1. A dispersão de nanopartículas foi

centrifugada inicialmente a 87,76 x g, onde houve formação de um pequeno *pellet*, que imediatamente foi ressuspenso em 500 µL de água MilliQ e levado à medição por espalhamento dinâmico de luz. O resultado dessa medida indicou a presença de partículas com DM de 3545,8 nm. O sobrenadante foi centrifugado e assim por diante até a última etapa (28435,21 x g), como descrito na metodologia. Os resultados das centrifugações subsequentes estão demonstrados graficamente na Figura 15.

Na Figura 15 foi possível perceber a diminuição brusca de DM de partículas ressuspendidas a partir do *pellet* resultante da centrifugação a 87,76 x g em relação à centrifugação a 548,51 x g, uma redução de 3545,8 nm para 319,1 nm. A partir desta rotação o DM foi reduzido etapa após etapa, até atingir a rotação de 19746,67 x g, onde se encontraram partículas com diâmetro médio de 195,8 nm. Aos 28435,21 x g encontramos DM de 1033,2 nm, porém a apresentação dos dados de distribuição de tamanho de partícula é bimodal, ou seja, existem dois picos em duas faixas diferentes de tamanhos, evidenciando uma aglomeração de partículas menores (em torno de 130 a 500 nm) em grupos de partículas maiores (cerca de 2500 a 3000 nm). Assim, sabe-se que a centrifugação mais intensa provocou uma aglomeração forte sobre as nanopartículas, que apresentaram grande dificuldade de ressusensão para a realização de análises de espalhamento dinâmico de luz.

Dessa forma, o sobrenadante final também fora investigado, onde foram encontradas partículas com 142,9 nm de diâmetro médio, o que revelou que o processo de centrifugação deveria continuar em rotações mais altas, até a separação destas.

Na Figura 16, o perfil de centrifugação comprova que Np2 apresenta o mesmo comportamento de separação das nanopartículas do que Np1.

Diante dos dados obtidos nesse experimento, decidiu-se realizar uma centrifugação prévia, a 548,51 x g, nas preparações obtidas por gotejamento com o objetivo de descartar as maiores partículas, fazendo com que os experimentos mais avançados ocorressem somente com aquelas partículas que realmente encontravam-se na faixa nanométrica entre 100 e 500 nm, aproximadamente.

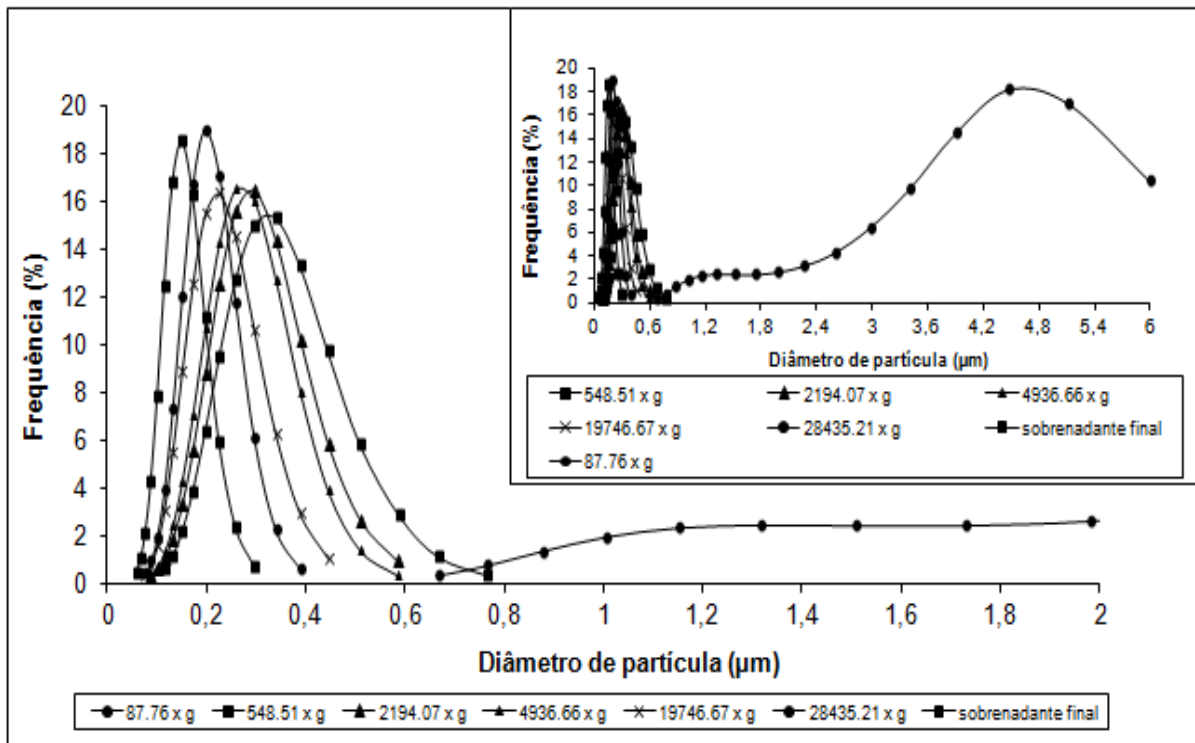


Figura 15: Estudo de centrifugação de Np1 (representações do eixo do diâmetro de partícula em escalas de: 0 a 6 µm e 0 a 2 µm)

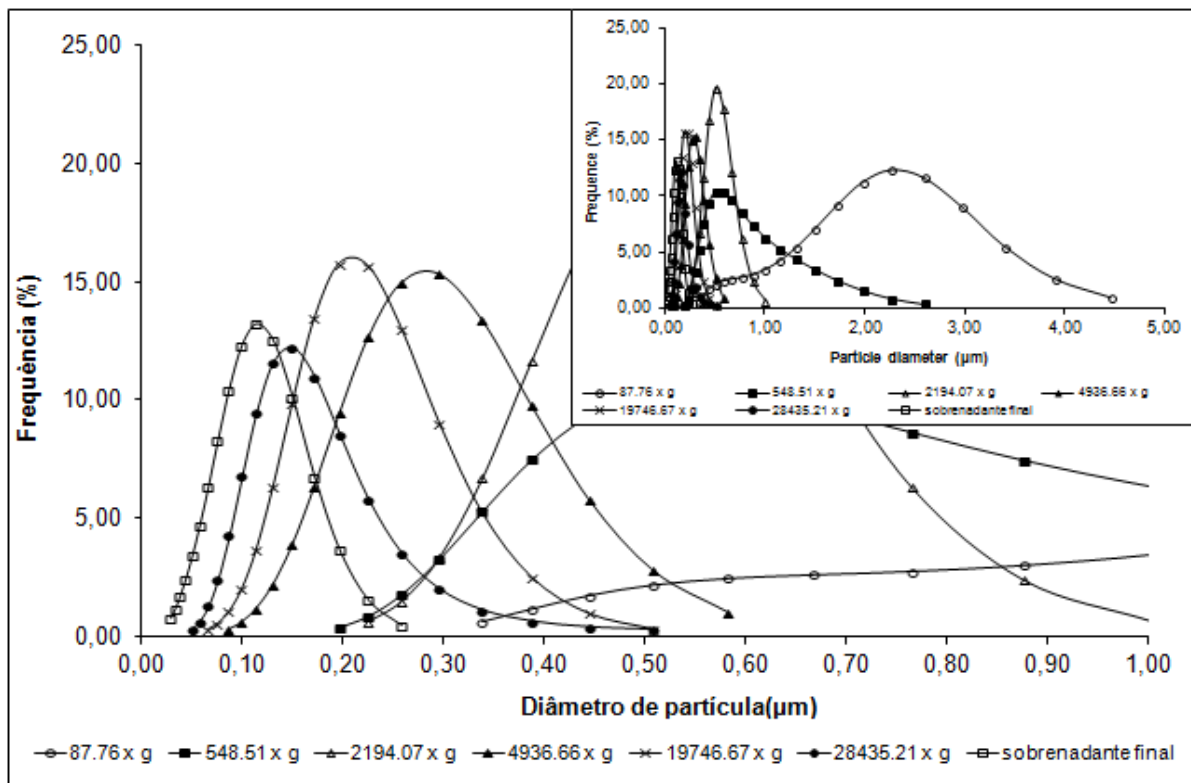


Figura 16: Estudo de centrifugação de Np2 (representações do eixo do diâmetro de partícula em escalas de: 0 a 5 μm e 0 a 1 μm)

A presença de material particulado com diâmetros médios na faixa micrométrica, em ambos os estudos de separação por centrifugação, pode ser explicada pela presença de material polissacarídico em excesso, que não tenha participado da organização estrutural da nanopartícula ou eventualmente a presença de pequenos aglomerados de nanopartículas.

As misturas físicas entre QT e PS exibiram elevados valores de diâmetro, na ordem de micrômetros, quando submetidas ao espalhamento dinâmico de luz e MET. Esses resultados puderam explicar a presença de populações com diâmetros acima de 1 micrômetro nas Figuras 15 e 16.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NAS NANOPARTÍCULAS.

A metodologia de quantificação em tampão fosfato pH 7,4 teve sua linearidade aferida, demonstrando-se linear para a determinação de SC e FC, exibindo valores de R^2 de 0,9972 e 0,9952, respectivamente. As representações gráficas da linearidade do método

podem ser encontradas nas Figuras 17 e 18, respectivamente para SC e FC.

Ao realizar os cálculos para determinação do percentual de PS encontrado em cada variedade de partícula, encontrou-se que 25,43 % do FC usado no preparo das partículas estavam presentes em Np2 e 35,50 % de SC conseguiram se complexar com a quitosana, formando Np1.

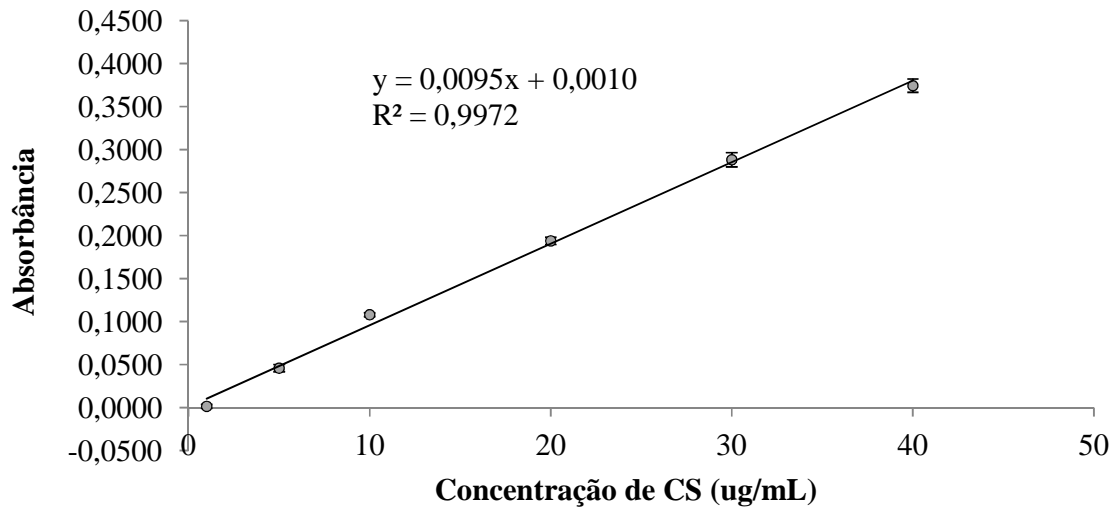


Figura 17: Curva de calibração de SC em tampão fosfato pH 7,4.

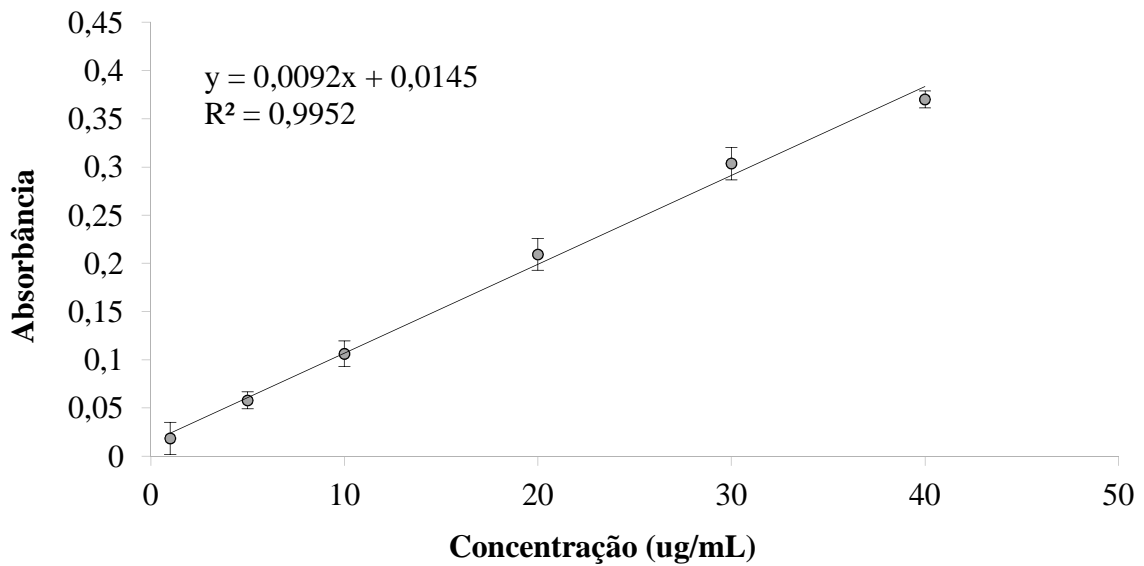


Figura 18: Curva de calibração de FC em tampão fosfato pH 7,4.

4.9 ENSAIOS DE COAGULAÇÃO

Diante dos polissacarídeos sulfatados escolhidos para a elaboração de nanopartículas polissacarídicas e somado ao fato que os dados de literatura comprovam a ação anticoagulante para FC e não para SC, somente as amostras contendo o FC foram selecionadas para avaliação de atividade anticoagulante, ensaios de mucoadesividade, citotoxicidade e permeabilidade.

As nanopartículas contendo SC foram estudadas como modelo estrutural para o preparo de nanopartículas polissacarídicas devido ao seu potencial de aplicação no carreamento de fármacos hidrofílicos, inclusive anticoagulantes, e ao seu custo reduzido de matéria-prima em relação a outros polissacarídeos sulfatados.

Os ensaios de coagulação realizados para Np2 resultaram em dados comparativos entre amostras e grupo controle, demonstrando a capacidade de Np2 ou da solução de FC em aumentar o tempo de coagulação.

No ensaio de aPTT (Figura 19), Np2 (13,3 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou tempo de coagulação duas vezes maior do que o grupo controle ($p < 0,001$), enquanto que a solução de FC, na mesma concentração, aumentou apenas 1,6 vezes esse tempo, ou seja, 40 % menos do que Np2. A solução de FC a uma concentração de 2,67 $\mu\text{g/mL}$ não afetou o tempo de coagulação, em comparação ao controle ($p > 0,05$). Por outro lado, Np2 aumentou o tempo de coagulação em 1,6 vezes, mesmo na concentração mais baixa testada, 0,53 $\mu\text{g/mL}$, comparado ao controle ($p < 0,001$).

Os resultados do teste de tempo de recalcificação (Figura 20) demonstraram semelhança aos resultados de aPTT, ou seja, Np2 mostrando-se mais ativo do que a solução do polissacarídeo. Na concentração de 13,3 $\mu\text{g/mL}$, Np2 e a solução de FC conseguiram aumentar o tempo de coagulação em 1,51 e 1,24 vezes, respectivamente. Np2 mostrou-se significativamente mais potente do que a solução de FC, a qual apresentou valores de p iguais a 0,2 e 0,057 nas concentrações de 1,33 e 2,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto Np2 a 1,33 e 2,67 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0,05$).

Em contraste aos testes de aPTT e tempo de recalcificação, o tempo de protrombina, não apresentou resultados significativos na alteração do tempo de coagulação ($p > 0,05$). A ausência de atividade anticoagulante no teste de PT sugere que as amostras envolvidas nesse ensaio atuam na via intrínseca da coagulação. Esses resultados reforçam os resultados obtidos

em trabalho anterior, onde esse polissacarídeo demonstra efeito anticoagulante somente na via intrínseca, ou seja, resultados de aPTT (NISHINO *et al.*, 1994).

A amostra Np2 apresentou uma atividade anticoagulante maior do que a solução de FC talvez pelo fato de que o polissacarídeo livre em solução assumiu uma conformação não específica que leva a uma menor atividade, em comparação com a nanopartícula testada, que possui uma conformação mais rígida, permitindo uma maior interação entre o receptor e os sítios de atividade da molécula sulfatada.

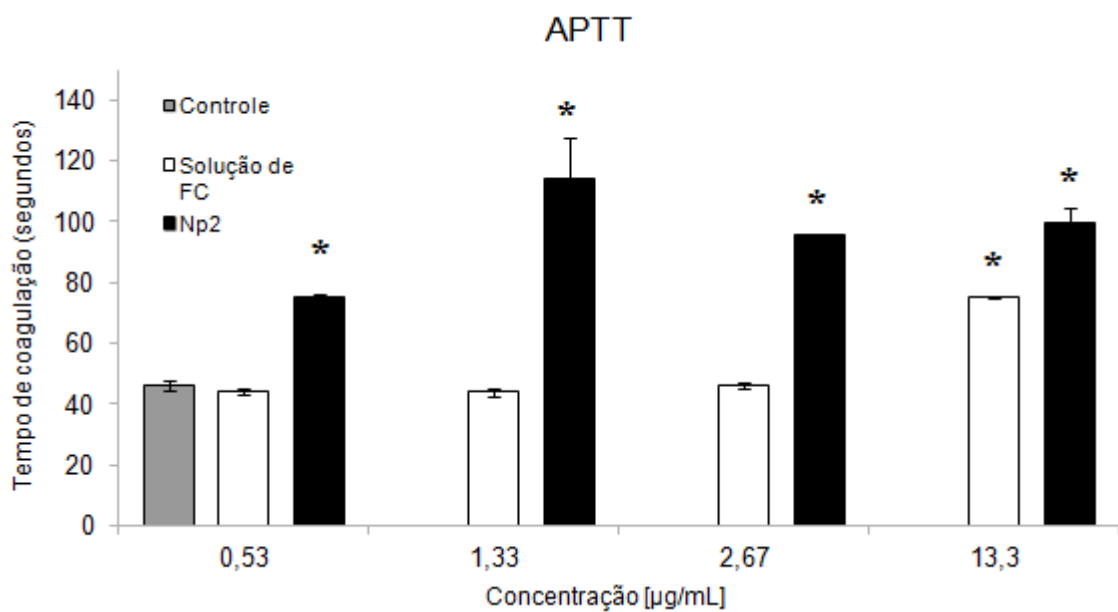


Figura 19: Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) de amostras contendo FC. (* p < 0,05 comparado ao grupo controle; n = 3).

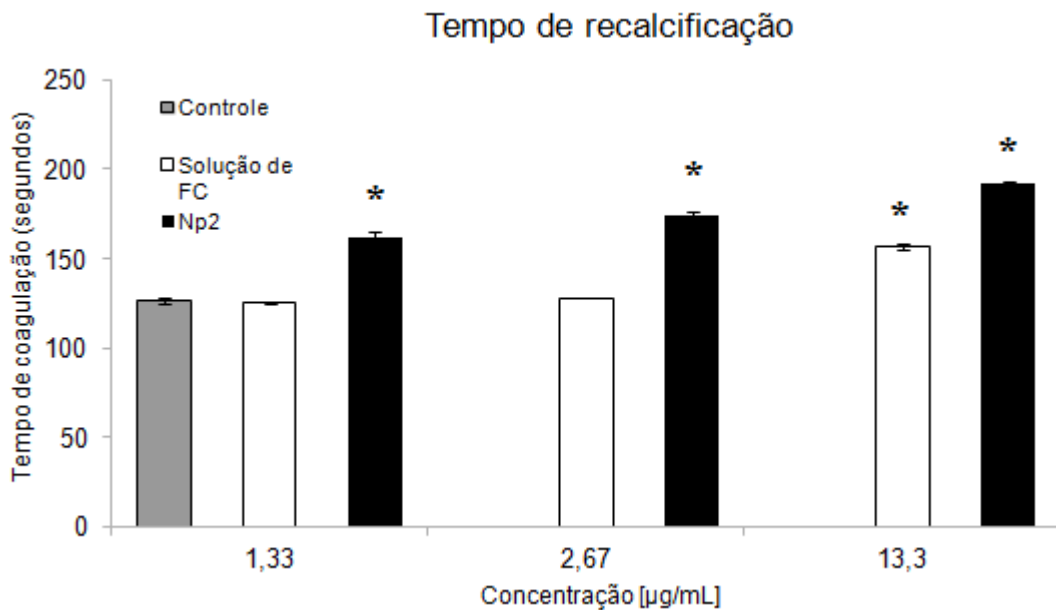


Figura 20: Tempo de recalcificação de amostras contendo FC. (* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; $n = 3$).

4.10 MEDIDAS DE MUCOADESIVIDADE

As medidas de mucoadesividade das preparações indicaram o percentual de material que foi lavado pela simulação do trânsito de fluidos na luz intestinal. Desse modo, por uma medida indireta, é encontrado o percentual aderido de uma amostra à membrana de mucina.

Os resultados obtidos através das medições de mucoadesividade, em célula do tipo Franz modificado, indicaram que Np2 apresentou grande afinidade pela membrana de mucina, onde 80,20% do material nanoparticulado foi retido (Figura 21). A presença de quitosana como uma matriz polimérica na nanopartícula Np2 foi a responsável pela aderência das mesmas à membrana de mucina, visto que, conforme descrito em literatura, o polissacarídeo catiônico apresenta propriedade mucoadesiva extensivamente descrita (HENRIKSEN *et al.*, 1996; TAKEUCHI *et al.*, 1996; HEJAZI & AMIJI, 2003).

A alta taxa de mucoadesão de Np2 à membrana de mucina (aproximadamente 80%) aponta para o fato que essas nanopartículas possuem a capacidade de prolongar seu contato com a mucosa intestinal e assim tornarem-se mais disponíveis à permeação intestinal.

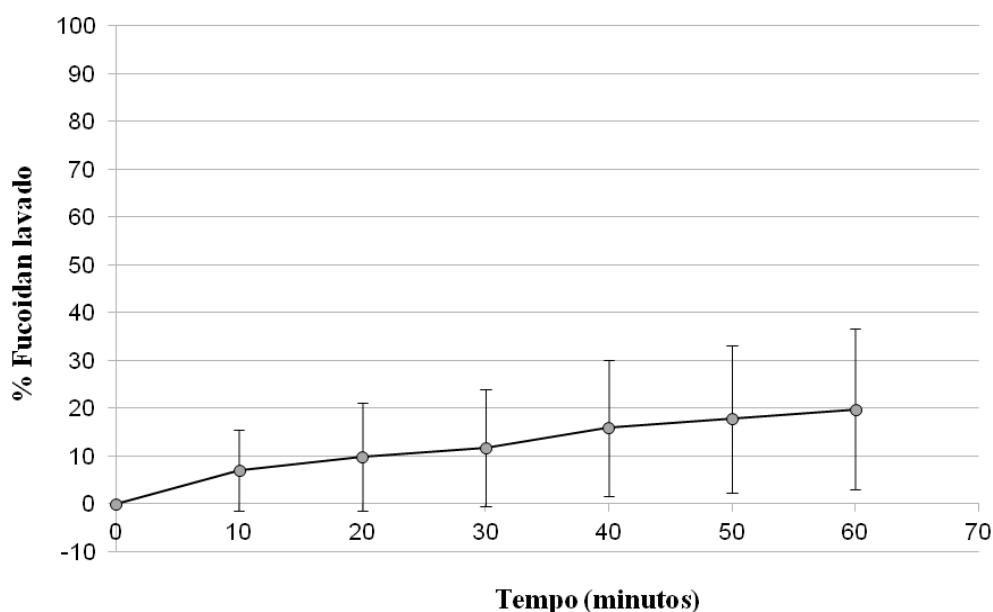


Figura 21: Percentual de Fucoïdan lavado, a partir das nanopartículas Np2, durante lavagem de membrana de mucina (n = 3).

4.11 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS CACO-2

Os testes de citotoxicidade foram utilizados como ferramenta para a determinação das concentrações utilizadas nos testes de permeabilidade. Através de uma varredura de 3 concentrações diferentes por amostra encontrou-se um valor que não provocasse agressão às células durante a realização dos experimentos de permeabilidade celular. Além disso, o teste indicou quais amostras não poderiam ser utilizadas de forma alguma nos testes posteriores.

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade em células Caco-2 estão demonstrados na Figura 22. Os grupos controle apresentaram-se normais em relação ao comportamento esperado, não alterando a viabilidade celular quando HBSS pH 6,8 foi utilizado e diminuindo a zero a viabilidade da linhagem Caco-2 ao utilizar Triton 10%. A escolha do pH 6,8 para HBSS foi motivada pelo fato de que testes posteriores seriam realizados em jejuno, onde encontramos esse valor de pH na luz intestinal.

Dentre as três concentrações testadas para as soluções de fucoïdan (500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$), nenhuma delas apresentou-se agressiva às células, não alterando de forma expressiva sua viabilidade. As misturas físicas entre quitosana e fucoïdan (1:1) foram testadas em

concentrações de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo a primeira a única que não se apresentou danosa às células. O grupo da amostra Np2, assim como grupo da solução de FC, foi estudado em concentrações de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, exibindo alta viabilidade celular em qualquer uma das três concentrações testadas.

Diante dos resultados obtidos, foi possível observar que as misturas físicas apresentaram-se danosas devido ao efeito oclusivo sobre as células, interrompendo as trocas gasosas com o ambiente, levando-as à morte por ausência de oxigenação. As malhas grosseiras de quitosana e fucoidan exibidas na Figura 10 ilustram de forma ideal o ambiente que as células foram submetidas ao entrar em contato com a mistura física estudada.

Para as amostras que se apresentaram inofensivas às células, solução de fucoidan e Np2, foi realizada uma normalização da concentração eleita para dar continuidade aos demais testes, visto que diferentes concentrações das duas amostras foram utilizadas nesse estudo. Assim, a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhida para a realização dos estudos de citotoxicidade em células endoteliais vasculares, permeabilidade em células Caco-2 e em jejuno de ratos.

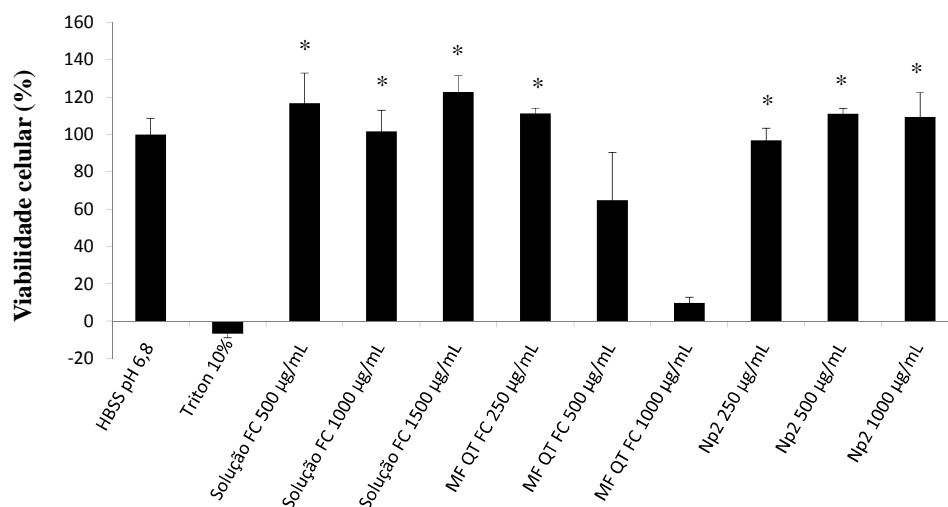


Figura 22: Estudo de citotoxicidade de amostras contendo FC (soluções, misturas físicas com quitosana e nanopartículas) em diferentes concentrações, controles positivo (HBSS pH 6,8) e negativo (Triton 10%) (* $p > 0,05$ comparado ao grupo controle positivo; $n = 4$).

4.12 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS VASCULARES DE CORDÕES UMBILICAIS HUMANOS – *HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS* (HUVEC)

A toxicidade das amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL também foi avaliada em células endoteliais vasculares de cordão umbilical (HUVEC), determinando o comportamento de nanopartícula e polissacarídeo em solução ao entrar em contato com células vasculares após uma possível passagem pelo epitélio intestinal ou até mesmo avaliar a toxicidade diante de administração intravenosa.

Os resultados, exibidos na Figura 23, apontam um comportamento semelhante ao observado em células Caco-2, sem diminuição da viabilidade celular em nenhum dos grupos testados. Assim, pode-se dizer que tanto as nanopartículas quanto a solução de polissacarídeo, nas concentrações testadas, não se apresentaram danosos ao epitélio vascular. Como grupo controle, foi utilizado HBSS pH 7,4, compatível com o pH presente no interior dos vasos sanguíneos.

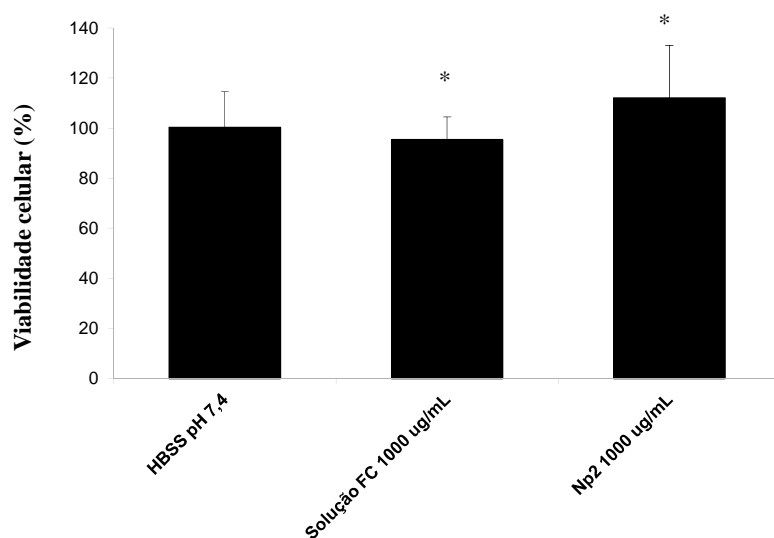


Figura 23: Estudo de citotoxicidade de amostras contendo FC (solução e nanopartículas) na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e controle positivo (HBSS pH 7,4) em células HUVEC (* $p > 0,05$ comparado ao grupo controle positivo; $n = 4$).

4.13 ENSAIOS DE PERMEABILIDADE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS CACO-2

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de permeabilidade em monocamada de células Caco-2 indicaram o percentual de FC que atravessou o epitélio intestinal e o possível mecanismo de transporte a nível celular. Desse modo, surgiram evidências a respeito da possibilidade de administração via oral das amostras de nanopartículas.

Após 21 dias de troca de meio de cultura das células semeadas sobre os filtros, o amadurecimento da monocamada de células de adenocarcinoma humano foi comprovado através das medidas da resistência elétrica transepitelial, que resultaram em uma média de $503,4 \pm 47,92 \Omega \text{ cm}^2$, apresentando-se compatível com monocamadas maduras descritas em literatura (SANDRI *et al.*, 2010).

Após as três horas de experimento, foram calculados os valores percentuais de fucoidan permeados a partir de Np2 e solução de FC a 1000 $\mu\text{g/mL}$, exibidos na Figura 24. Através

desta, notou-se que Np2 apresentou uma velocidade de permeação mais elevada do que a solução de FC, principalmente na primeira hora de experimento. A partir de 60 minutos de experimento ambas as amostras apresentaram velocidades de permeação semelhantes, porém, aos 180 minutos Np2 já havia permeado 1,4 vezes mais do que a solução de fucoidan.

Ao observar atentamente os dados da Figura 25 e correlacioná-los com a Figura 24, foi possível concluir que no intervalo entre 30 e 120 minutos ocorreu uma maior permeação de fucoidan a partir das nanopartículas em relação à solução do polissacarídeo ($p < 0,05$). Os valores de p encontrados para os intervalos de 30, 60 e 120 minutos foram, respectivamente, 0,017; 0,013 e 0,027, enquanto que em 180 minutos o valor encontrado foi de 0,093.

Nesse mesmo espaço de tempo houve uma brusca diminuição da resistência transepitelial da monocamada contendo Np2. Essa redução até o limite de 70,75% da TEER em 60 minutos é dada pela abertura das junções intercelulares de maneira reversível, permitindo uma maior permeabilidade das nanopartículas (CHEN *et al.*, 2009).

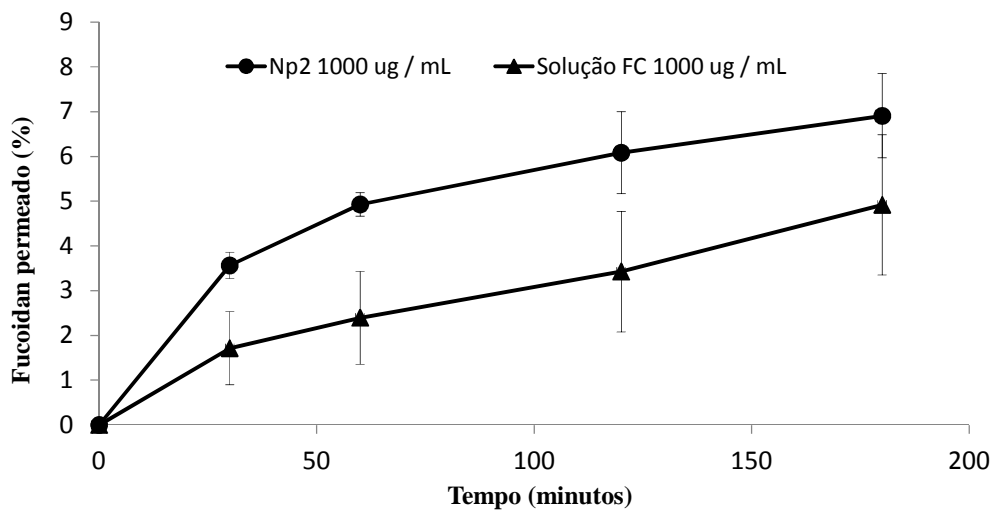


Figura 24: Percentual de fucoidan permeado, a partir de Np2 e solução de FC a 1000 $\mu\text{g/mL}$, através de monocamada de células Caco-2 durante 180 minutos de experimento ($n = 3$).

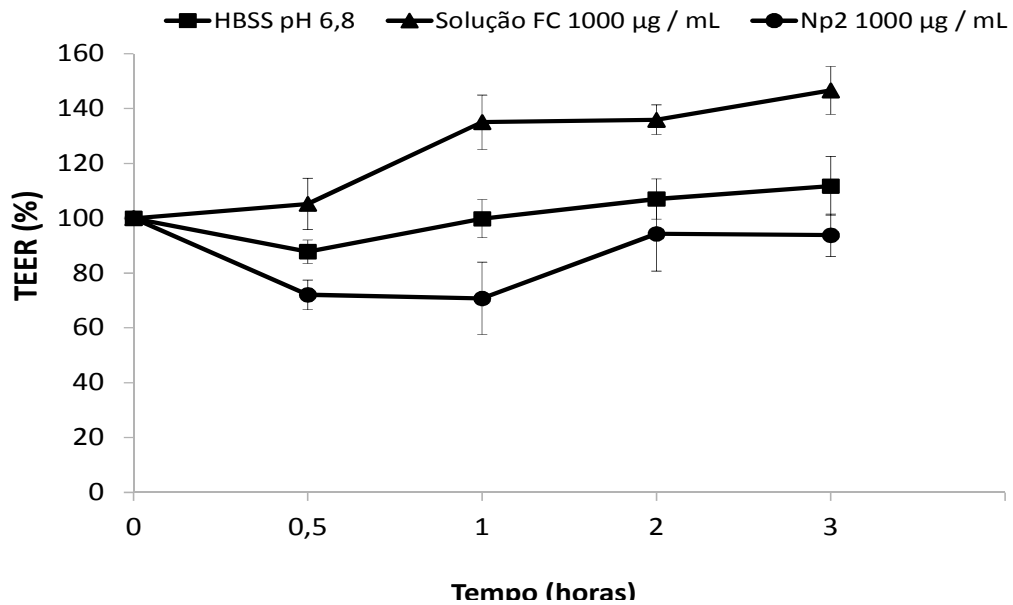


Figura 25: Medidas de resistência transepitelial em percentual, ao longo de 180 minutos, em poços contendo monocamada de células Caco-2 contendo Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL. Grupo controle utilizado = HBSS 6,8 (n = 3).

Como citado anteriormente, as velocidades de permeação, ao final do experimento, foram quase igualadas, podendo-se comprovar tal afirmação através da observação sequencial das Figuras 26, 27 e 28. Nessas figuras nota-se que a diferença entre os coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) de Np2 e da solução de FC diminui ao longo do tempo de experimento. Aos 30 minutos o P_{app} de Np2 mostrou-se 2,08 vezes maior do que o P_{app} da solução do polissacarídeo, aos 120 minutos 1,77 vezes e ao final do experimento essa razão é reduzida a 1,4 vezes.

Os coeficientes de permeabilidade aparente nos intervalos de 0 a 30 minutos e de 0 a 120 minutos apresentaram-se estatisticamente maiores nas amostras de Np2, com respectivos valores de p de 0,017 e 0,027. Entretanto, no intervalo entre 0 e 180 minutos não houve diferença estatisticamente significativa entre os coeficientes da duas amostras. Isso demonstrou que Np2 exibiu um efeito de permeação mais veloz do que a solução de FC até 120 minutos de experimento e aos 180 minutos as velocidades de permeação quase igualaram-se. O maior coeficiente de permeabilidade de Np2 até 120 minutos pode ser atribuído ao efeito de transporte paracelular, devido a abertura das junções intercelulares de 30 a 120 minutos (Figura 25).

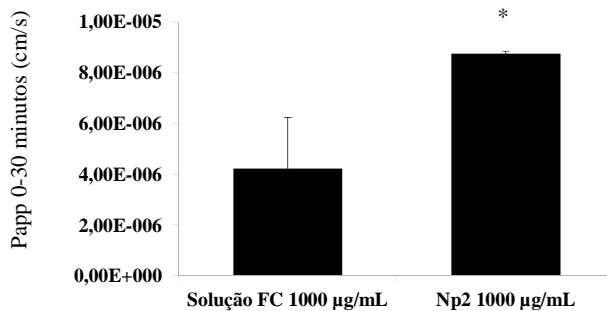


Figura 26: Representações gráficas, entre 0 e 30 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) em cm/s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2 (* $p < 0,05$ comparado ao grupo solução FC 1000 µg/mL; $n = 3$).

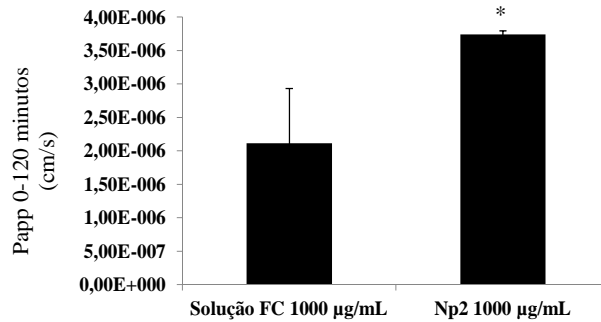


Figura 27: Representações gráficas, entre 0 e 120 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm/s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2 (* $p < 0,05$ comparado ao grupo solução FC 1000 µg/mL; $n = 3$).

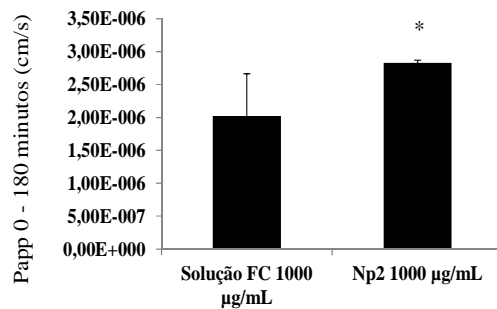


Figura 28: Representações gráficas, entre 0 e 180 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm/s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL no ensaio de permeabilidade em monocamada de células Caco-2 (* $p > 0,05$ comparado ao grupo solução FC 1000 µg/mL; $n = 3$).

Após a realização dos cálculos de Papp, outro cálculo foi efetuado para determinar o percentual de FC que permaneceu sobre a monocamada de células ao final do experimento, gerando assim o percentual de recuperação. Observando a Figura 24 tem-se que o percentual permeado de Np2 ao final do experimento foi de $6,90 \pm 0,94\%$. O valor recuperado no compartimento apical de Np2 foi de $93,98 \pm 18,69\%$, indicando que nenhum material foi

retido no interior das células e que possivelmente todo o material permeado utilizou a via paracelular como mecanismo de transporte.

Os dados de percentual de recuperação do compartimento apical contendo solução de FC não foram apresentados, pois as células sobre os filtros desprenderam-se e foram coletadas juntamente com a amostra, inviabilizando as leituras em espectrofotômetro por conta das células em suspensão.

4.14 ENSAIOS DE PERMEABILIDADE INTESTINAL EM JEJUNO DE RATOS

Neste ensaio a capacidade de permeação das amostras foi avaliada, assim como no item anterior, desta vez a nível tecidual. Dessa forma, todas as camadas celulares do tecido intestinal formaram uma barreira à permeação, e não somente uma monocamada de células. Neste ensaio enfrentou-se a variabilidade tecidual interindivíduo.

De forma análoga ao ocorrido no item 4.13., a amostra Np2 apresentou maior percentual de fucoïdan permeado em relação à solução de fucoïdan na mesma concentração, durante os 180 minutos de experimento (Figura 29). Novamente Np2 apresentou maior velocidade de permeação do que a solução de FC, a qual teve seu percentual de permeação quase que inalterado entre 30 e 180 minutos, sofrendo leve aumento de 2,26 para 3,89% de percentual de fucoïdan permeado. Por outro lado, Np2 sofreu aumento substancial de 5,34% entre 30 e 180 minutos.

As barras de erro apresentadas no gráfico da Figura 29 apresentaram-se maiores quando comparadas às barras de erro da Figura 24 (em monocamada de células Caco-2) por conta da variabilidade entre animais.

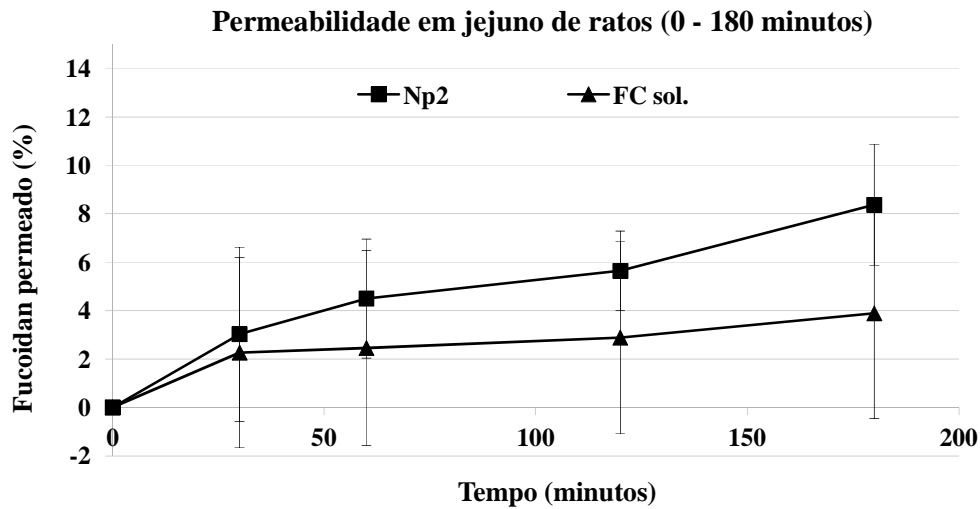


Figura 29: Percentual de fucoxantina permeada, a partir de Np2 e solução de FC a 1000 $\mu\text{g/mL}$, através do jejuno de ratos, durante 180 minutos de experimento.

Através do cálculo do coeficiente de permeabilidade aparente das amostras submetidas ao ensaio de permeabilidade em jejuno de ratos, foi possível observar que no intervalo de tempo entre 30 e 180 minutos, onde há uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,023$) entre as velocidades de permeação das amostras, os valores de Papp encontram-se distanciados, sendo o Papp de Np2 3,28 vezes maior do que o Papp da solução do polissacarídeo sulfatado, vide Figura 30.

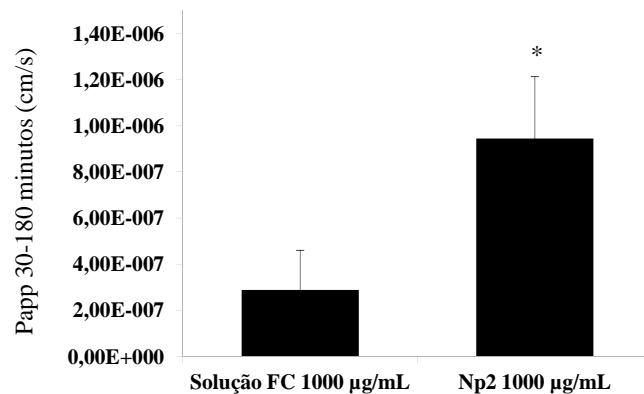


Figura 30: Representações gráficas, entre 30 e 180 minutos, dos coeficientes de permeabilidade aparente (Papp) em cm/s, de amostras Np2 e solução de FC a 1000 µg/mL no ensaio de permeabilidade em jejuno de ratos (* $p < 0,05$ comparado ao grupo solução FC 1000 µg/mL; $n = 3$).

4.15 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE Np2 NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

A amostra Np2 apresentou resultados satisfatórios nos ensaios biológicos, exibindo maior atividade anticoagulante do que a solução de FC em baixas concentrações, onde a solução do polissacarídeo sulfatado não exibiu efeitos anticoagulantes *in vitro*.

Np2 demonstrou ser altamente mucoadesiva, pois apenas aproximadamente 20% do material sobre a membrana de mucina foi efetivamente lavado na simulação de trânsito de fluidos intestinais. Esse resultado evidenciou a alta afinidade que esse sistema pode ter pela camada mucosa intestinal, facilitando sua interação com o epitélio e aumentando a eficácia na permeação.

Os testes de citotoxicidade em células Caco-2 mostraram que Np2 não se apresentava tóxica às células de adenocarcinoma humano, contribuindo para a viabilização da administração via oral. Por outro lado, as misturas físicas entre QT e FC demonstraram alta toxicidade às células Caco-2, demonstrando a necessidade da organização do polieletrólito em dimensões nanométricas.

Em células HUVEC também não foram observados efeitos tóxicos, concluindo-se que tal amostra de Np apresenta potencial de administração por via intravenosa ou que após a

permeação, ao atingir a corrente sanguínea, as células endoteliais vasculares não sofrem ao entrarem em contato com Np2.

A permeabilidade em monocamada de células Caco-2 mostrou que Np2 possui um efeito imediato de permeação ao passo que a solução de FC demonstrou uma velocidade de permeação menor. Os coeficientes de permeabilidade aparente evidenciaram que até os 120 minutos de ensaio a monocamada de células intestinais apresentavam-se significativamente mais permeáveis à Np2 do que a solução de FC.

O ensaio de permeabilidade em jejuno de ratos não demonstrou ser tão conclusivo quando ao ensaio a nível celular, porém, gerou forte indicação de maior permeação de Np2 do que a solução de FC, devido aos valores estatisticamente maiores de Papp de Np2.

Dessa forma, os ensaios biológicos reuniram diversos dados que apontam para a viabilidade do uso de Np2 para a terapia anticoagulante por via oral.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos apontaram para o sistema Np1 como um modelo a ser seguido para a produção das demais amostras propostas. Ao final da obtenção de todas as amostras notou-se que Np1 e Np2 eram consideradas as melhores amostras por apresentarem boa distribuição de diâmetro médio de partículas, abaixo de 200 nm, o que permitiria sua administração intravenosa, visto que os menores capilares sanguíneos apresentam diâmetros maiores do que 6,0 μm (GAUMET *et al.*, 2008). Assim, poderiam aumentar os tempos de circulação sanguínea do polissacarídeo sulfatado, teriam facilidade na penetração por espaços intercelulares, apresentariam altos valores de área superficial e pequenos núcleos de polissacarídeos sulfatados anticoagulantes, no caso de Np2.

O meio ácido, onde as partículas se encontraram, continha íons hidrônio, não deixando o potencial zeta aproximar-se da neutralidade, evitando o surgimento de aglomerados de nanopartículas e elevação do DM de partículas (ANDRADE, 2008). Através da MET verificou-se que as dimensões de partículas que corroboraram com os dados obtidos por espalhamento de luz e a ausência de aglomerados significativos. Além de todas essas características, o método de preparo das nanopartículas, comprovadamente mostrou-se reprodutível em escala laboratorial.

Os espectros de absorção na região do infravermelho criaram fortes evidências da presença de SC, QT e FC nas respectivas amostras, por conta das bandas características em cada espectro, como relacionado na seção de resultados e discussão, porém, não se mostraram conclusivos a respeito da diferenciação entre mistura física e nanopartículas.

O estudo de centrifugação demonstrou que houve uma separação seletiva por diâmetro médio de partícula para cada faixa de rotação, embora em rotações mais altas a diferença entre DM para cada *pellet* ressuspendido e analisado apresentou-se menor. Assim, para uma eficiente separação entre nano e micropartículas utilizou-se a centrifugação a 548,51 x g, com intuito de retirar as maiores partículas, e em seguida outra centrifugação a 28435,21 x g para recolhimento de material verdadeiramente nanoestruturado. Dentro de nossas buscas bibliográficas não foram encontrados relatos na literatura utilizando centrifugações crescentes para a separação de diferentes populações de diâmetro médio de nanopartículas.

O método de quantificação dos PS demonstrou-se linear, sendo possível determinar o percentual de FC contido nos nanosistemas. Esse método mostrou-se de grande importância

para obtenção dos resultados dos ensaios de coagulação, mucoadesividade e permeabilidade.

Os resultados de SAXS comprovam que um reservatório de polissacarídeos sulfatados foi gerado no interior dessas partículas, gerando diferentes núcleos de liberação do polissacarídeo anticoagulante, possibilitando uma farmacocinética de liberação diferenciada. Isso pode ajudar a explicar o efeito anticoagulante aumentado dessas nanopartículas em relação ao polissacarídeo solúvel.

Os resultados de atividade anticoagulante mostraram-se satisfatórios, pois os nanosistemas exibiram atividade melhorada em relação às soluções de polissacarídeo livre. Isso levou à formulação da hipótese que o nanosistema estudado tenha uma conformação que favorece a atividade anticoagulante do polímero.

A quitosana, como descrito em literatura (SADEGHI *et al.*, 2008), apresenta propriedades peculiares. Uma delas é a promoção da permeabilidade através de monocamada de células Caco-2, que pode explicar parte dos resultados obtidos neste trabalho, ao se observar um maior percentual de fucoidan permeado na presença de nanopartículas contendo quitosana e fucoidan. A possibilidade de realização dos experimentos com uma mistura física entre quitosana e fucoidan foi investigada, porém, sem sucesso na utilização nos experimentos por conta da alta toxicidade relacionada ao efeito oclusivo sobre as células.

A realização de experimento com tecido intestinal fresco ainda apresentando secreção de muco foi de suma importância para a compreensão da permeabilidade *ex vivo* e não somente do comportamento *in vitro*, diante de estruturas celulares organizadas em monocamada que não apresentavam secreção de muco e não possuíam a mesma espessura e complexidade que o tecido animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. V.100, p.5-28, 2004.

ANDERSON, L.O., BARROWCLIFFE, T.W., HOLMER, E., JOHNSON, E.A.; SIMS, F. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 by gel filtration. *Thrombosis Research*, V.8, p.859-867, 1976.

ANDRADE, J.E. Síntese, Caracterização e Modificação de nanopartículas de prata com 5-Fluorouracil sob influência do pH. Dissertação para obtenção de título de mestre. Núcleo de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe. SE - São Cristóvão, 2008.

ANDREWS R.K., BERNDT M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis research*. V. 114, p. 447–53, 2004.

ASSAFIM, M., FERREIRA, M.S., FRATTANI, F.S., GUIMARÃES, J.A., MONTEIRO, R.Q., ZINGALI, R.B. Couteracting effect of glycyrrhizin on the haemostatic abnormalities induced by Bothrops jararaca snake venom. *Br. J. Pharmacol.* V. 148, p.807–813, 2006.

AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2005.

BECKER, C.F.; GUIMARÃES, J.A.; MOURÃO, P.A.S.; VERLI, H.. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. V.6, p.391-399, 2007.

BICK R.L. KAPLAN, H. SYNDROMES OF THROMBOSIS Congenital and Acquired Causes. *Medical Clinics Of North America*. V. 82, p. 409–58, 1998.

BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; CARAMELLA, C. A modified cell for simultaneous assessment of drug release and washability of mucoadhesive gels. *Pharm. Dev. Technol.* V.4, p. 45 – 53, 1999.

BRAYDEN, D.J.. Controlled release technologies for drug delivery. *Drug Discovery Today*. V. 8, p. 976-978, 2003.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J.. Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharmaceutical Research*. V. , p. 14, 1431-1436, 1997-b.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J.. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. V. 63, p. 125-132, 1997-a.

CHAVES, D.S.A.; COSTA, S.S.; ALMEIDA, A.A.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R.B.. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*. V. 33, p. 172-180, 2010.

CHAVES, D.S.. Estudo químico e potencial antitrombótico da espécie medicinal *Petroselinum crispum* (Apiaceae). 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Química de Produtos Naturais) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHEN M.C, WONG H.S, LIN K.J, CHEN H.L, WEY S.P, SONAJE K. The characteristics, biodistribution and bioavailability of a chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery of heparin. *Biomaterials*. V. 30, p. 6629–37, 2009.

CHEN, F.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. V.336, p.166–173, 2007.

Committee on Animal Research and Ethics (CARE). Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals developed by APA's <http://www.apa.org/science/anguide.html>

COOPER C.L.; DUBIN, P.L.; KAYIYMAZER, A.B.; TURKSEN, S.. Polyelectrolyte–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. V. 10, p. 52–78, 2005.

DAVIE E.W.; FUJIKAWA K; KISIEL W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. V. 30, p. 10363–70, 1991.

DE, S.; ROBINSON, D.. Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-l-lysine–alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*. V. 89, p. 101–112, 2003.

FURIE, B.; FURIE, B.C. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. V.53, p. 505-518, 1988.

GANZA-GONZÁLEZ, A.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F.J.; BLANCO MÉNDEZ, B. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V. 48, p. 149-155, 1999.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F.. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V. 69, p. 1–9, 2008.

GULLIANI, G.L.; HYUN, B.H.; LITTEN, M.B. Blood recalcification time. A simple and reliable test to monitor heparin therapy. *Am J Clin Pathol*. V.65, N.3, p.390-396, 1976.

GOLDBERG M, GOMEZ-ORELLANA I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nature reviews. Drug discovery*. V. 2, p. 289–95, 2003.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled release*. V. 89, N. 2, p. 151 – 165, 2003

HENRIKSEN, I.; GREEN, K.L.; SMART, J.D.; SMISTAD, G.; KARLSEN, J. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Pharm.*. V.145, p. 231–240, 1996.

HIRSH J; WARKENTIN T.E.; RASCHKE R; GRANGER C.; OHMAN E.M.; DALEN J.E. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin: Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest*. V. 114, p. 489–510, 1998.

HONDA, S.. Separation of neutral carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. V. 720, p. 337-351, 1996.

JONG, J.G.N.; WEVERS, R.A.; LAARAKKERS, C.; POORTHULS, B.J.H.M.. Dimethylmethylene Blue-Based Spectrophotometry of Glycosaminoglycans in Untreated Urine: a Rapid Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses. *J Clin Chem*. V.35/7, p.1472-1477, 1989.

KARIYA, Y.; MULLOY, B.; IMAI, K.; TOMINAGA, A.; KANEKO, T.; ASARI, A.; SUZUKI, K.; MASUDA, H.; KYOGASHIMA, M.; ISHII, T. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydrate Research*. V.339, p.1339–1346, 2004.

KARMAKAR, P.; GHOSH, T.; SINHA, S.; SAHA, S.; MANDAL, P.; GHOSAL, P.K.; RAY, B. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: Characterization of a sulfated fucan. *Carbohydrate Polymers*. V.78, p.416–421, 2009.

KONSOULA, R.; BARILE, F.A. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in vitro*. V.19, N. 5, p. 675 – 684, 2005.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. V. 1, p. 193– 212, 2005.

KREUTER, J.. Nanoparticles – a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 331, p.1–10, 2007.

KREUTER, J.. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V 47, p.65–81, 2001.

LAU, Y.Y.; CHEN, Y.H.; LIU, T.T.; LI, C.; CUI, X.; WHITE, R.E.; CHENG, K.C. Evaluation of a novel in vitro Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metabolism and Disposition*. V. 32, N. 9, p.937-942, 2011.

LEE, C.; HUANG, C. P.; LEE, Y. Synthesis and characterizations of amphiphilic poly(L-lactide)-grafted chondroitin sulfate copolymer and its application as drug carrier. *Biomolecular Engineering* V.24, p.131–139, 2007.

LEE, C.; KUNG, P.; LEE, Y. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. V. 61, p. 348-354, 2005.

LEE, H.E.; LEE, M.J.; PARK, C.R.; KIM, A.Y.; CHUN, K.H.; HWANG, H.J.; OH, D.H.; JEON, S.O.; KANG, J.S.; JUNG, T.S.; CHOI, G.J.; LEE, S.. *Journal of Controlled Release*, In Press, Corrected Proof, Available online 22 December 2009.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; ZHAO, R. Fucoïdan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. V.13, p. 1671-1695, 2008.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z.. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 60, p. 1650–1662, 2008.

MANN, K.G.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.; ORFEO, T.; BUTENAS, S. Models of blood coagulation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. V.36, p.108–117, 2006.

MELO, F.R.. Atividade anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas. 97 f. Tese (Doutorado em Química Biológica) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MULLER, R.H.; HEINEMANN, S. Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. *Clinical Nutrition*. V.11, p. 223-236, 1992.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y.. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. V. 5, p. 561-573, 2006.

MOURÃO, P.A.S.; BOISSON-VIDAL, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; BROS, A; FISCHER, A.M.. Inactivation of Thrombin by a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm. *Thrombosis Research*. V.102, p. 167-176, 2001.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M.; MOWINCKEL, M.C.; ABILDGAARD, U.. Structure and Anticoagulant Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoder. V. 271, p. 23973–23984, 1996.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure: function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *Journal of Biotechnology*. V 77, p. 123-135, 2000.

MUZZARELLI, R.A.A.; MUZZARELLI, C.. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Adv Polym Sci*. V. 186, p. 151–209, 2005.

NAIR, L.S.; LAURENCIN C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer Science*. V.32, p. 762-798, 2007.

NISHINO, T.; NISHIOKA, C.; URA, H.; NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydrate Research*. V.255, p. 213-224, 1994.

NIST - NCL Method PCC-1 Version 1.0. Measuring the Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. 2007.

OEFFNER, P.J.; CHIESA, C.. Capillary electrophoresis of carbohydrates .*Glycobiology*. V. 4, p. 397-412, 1994

PARK, W.; NA, K.. Polyelectrolyte complex of chondroitin sulfate and peptide with lower pI value in poly(lactide-co-glycolide) microsphere for stability and controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V. 72, p.193–200, 2009.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P.. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*. V. 13, p. 155–168, 2000.

PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L.. Vetorização e Vetores de Fármacos. *Caderno de Farmácia*. V.4, n. 1-2, p. 29-50, 1988.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci*. V. 31, p. 603–632, 2006.

SABISTON, P.; ADAMS, M.E.; HO, Y.A. Automation of 1,9-Dimethylmethylene Blue Dye-Binding Assay for Sulfated Glycosaminoglycans with Application to Cartilage Microcultures. *Analytical Biochemistry*. V.149, p. 543-548, 1985.

SADEGHI, A.M.M.; DORKOOSH, F.A.; AVADI, M.R.; WEINHOLD, M.; BAYAT, A.; DELIE, F.; GURNY, R.; LARIJANI, B.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H.E. Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: Comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V.70, p. 270–278, 2008.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; GIBIN, S.; ZAMBITO, Y.; DI COLO, G.; CARAMELLA, C.. Nanoparticles based on N trimethylchitosan: Evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V. 65, p. 68–77, 2007.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BOSELLI, C.; CARAMELLA, C. Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: In Vitro (Caco-2 Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. *AAPS PharmSciTech*, V.11, 1, p. 362 – 371, 2010.

SARMENTO B.; RIBEIRO A.; VEIGA F.; FERREIRA D.; NEUFELD R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*. V.10, p. 3054–60, 2007.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. *Quim. Nova*, V. 29, N. 4, p.776-785, 2006.

SUI, W.; HUANG, L.; WANG, J.; BO, Q. Preparation and properties of chitosan chondroitin sulfate complex microcapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V.65, p.69-73, 2008.

TSAI, M.L.; BAI, S.W.; CHEN, R.H. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydrate Polymers*. V.71, p.448–457, 2008.

VALERIE, L. Prothrombin Time and Partial Thromboplastin Time Assay Considerations. *Clin Lab Med*. V.29, p. 253–263, 2009.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *European Journal* V. 41, p. 923–932, 2005.

VIEIRA, R.P.; MOURÃO, P.A.S.. Occurrence of a Unique Fucose-branched Chondroitin Sulfate in the Body Wall of a Sea Cucumber. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 263, p. 18176-18183, 1988.

VIEIRA, R.P.; MULLOY, B.; MOURÃO P.A.S.. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 266, p. 13530-13536, 1991.

VOGEL, H.G. AND VOGEL, W.H. (Eds). Guidelines for the care and use of laboratory animals in drug discovery and evaluation, pp. 726-740, 1998.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*. V. 6, p. 112-115, 2008.

TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; NIWA, T.; HINO, T.; KAWASHIMA Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm. Res*. V.13, p. 896–901, 1996.

YAMASHITA, S.; FURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* V.10, p. 195–204, 2000.

YEH M.K.; CHENG K.M.; HU C.S.; HUANG Y.C.; YOUNG J.J.; Novel protein-loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Acta biomaterialia*. V.7, p. 3804–12, 2011.

YOUDIM K.A.; AVDEEF A.; ABBOTT N.J. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug discovery today* V.8, p. 997–1003, 2003.