



Biopolímeros mucoadesivos para a distribuição direcionada de péptidos no trato gastrointestinal

CLÁUDIA SOFIA FERREIRA MAIA

novembro de 2018

Biopolímeros mucoadesivos para a distribuição direcionada de péptidos no trato gastrointestinal

Cláudia Maia

Novembro de 2018

Orientação: **INL**

Doutor Pablo Fuciños

Doutora Isabel Rodriguez

ISEP

Doutora Susana Sousa

“Nada na vida é para ser temido, mas sim entendido”

Marie Curie

Agradecimentos

Esta dissertação foi o resultado de muito trabalho, esforço e dedicação. Ao longo do meu percurso fiz amizades, conheci e trabalhei com pessoas imprescindíveis, que me ajudaram em cada momento desta caminhada. Um agradecimento a todos aqueles que contribuíram para o meu percurso académico.

Em primeiro lugar quero agradecer às pessoas mais importantes, aos meus pais e ao meu irmão por todo o sacrifício, apoio incondicional, carinho, amor e incentivo ao longo de toda a minha vida. Sem eles nada disto seria possível e todo o meu sucesso é dedicado a eles.

Muito obrigada aos meus orientadores do INL, Dra. Isabel Rodriguez e ao Dr. Pablo Fuciños pela partilha de conhecimentos, ensino, paciência, incentivo, disponibilidade e amizade com que sempre me trataram.

Quero igualmente agradecer à minha orientadora do ISEP, Dra. Susana Sousa, por toda a simpatia, disponibilidade e partilha de conhecimentos ao longo do mestrado e estágio.

Agradecimento imprescindível ao Edward por todo o carinho, incentivo e força ao longo deste percurso.

À Cristina, por todas as palavras de incentivo ao longo destes anos, força e carinho.

Um agradecimento a todos os meus colegas do INL, em especial à Catarina Gonçalves, Vitória Oliveira, Ana Isabel Bourbon e Gabriela Azevedo por toda a ajuda, disponibilidade, apoio e pelo carinho como me receberam e trataram no INL.

Aos meus amigos no ISEP e não só, mas em especial à Barbara Barros, Cristiana Pereira e Elanice Lima, por todo o companheirismo ao longo deste percurso, apoio, incentivo e grande amizade.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Um dos grandes desafios a nível da saúde altamente é a obesidade, afetando cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo. Com a obesidade, aumenta o aparecimento de doenças como os diabetes tipo 2, doenças cardíacas, acidentes vasculares e cancros. Uma das abordagens destinadas a revolucionar a ingestão de alimentos e a mudança no tratamento da obesidade é a utilização de péptidos de soja, com a capacidade de suprimir a ingestão de alimentos e inibir o esvaziamento gástrico, conferindo assim, o efeito de saciedade. No entanto, até o momento, os inibidores de protease mostraram efeitos limitados nos estudos de intervenção humana. O encapsulamento desses compostos saciantes tem sido explorado de forma limitada, apesar da sua natureza proteica os tornar suscetíveis à digestão por proteases. Uma estratégia inteligente para o desenvolvimento de nanotransportadores, permitindo a liberação sob demanda de inibidores de tripsina, é o seu encapsulamento em biopolímeros mucoadesivos, que podem ajudar a melhorar a biodisponibilidade no trato gastrointestinal.

Neste contexto, pretende-se estudar os biopolímeros mucoadesivos mais adequados para a distribuição de péptidos no trato gastrointestinal. Este estudo iniciou-se com a síntese das nanopartículas a partir de biopolímeros não tóxicos como o quitosano (CH), o ácido hialurónico (HA) e a condroitina de sódio (CS), através do método da coacervação. As nanopartículas foram de seguida caracterizadas físico-quimicamente e quanto à mucoadesividade, foram selecionadas para este trabalho as de CH β /TPP/HA uma vez que, apresentavam as características pretendidas.

Para comprovar que as nanopartículas eram mucoadesivas, foi realizado um estudo de internalização das partículas, onde estas foram incubadas durante 4h com células Caco-2/HT29-MTX diferenciadas e observadas através de microscopia confocal. Este estudo veio mais uma vez provar que as partículas são mucoadesivas, ficando aderidas na superfície das células após lavagem com PBS.

Seguidamente foi otimizada a eficiência da encapsulação do péptido saciante de soja (PSS), nas nanopartículas usando várias concentrações deste. Percebeu-se assim que, a percentagem ótima de encapsulamento do PSS foi de 51% que corresponde a uma concentração de 100 mg/mL de PSS.

Realizou-se também um estudo da estabilidade das partículas ao longo do tempo e concluiu-se que a altas concentrações de nanopartículas, existe agregação das mesmas, enquanto que diluídas são mais estáveis ao longo do tempo. As nanopartículas mais estáveis são as que não

tem PSS encapsulado. No entanto, era necessário diluir o PSS nanoencapsulado e estudar o seu comportamento ao longo do tempo para poder comparar.

Para determinar o efeito do encapsulamento na permeabilidade intestinal do composto ativo, realizou-se um estudo da permeabilidade do PSS (livre e encapsulado) usando linhas celulares Caco-2/HT29-MTX. A cultura das linhas celulares foi feita na proporção 9:1 (Caco-2/HT29-MTX) durante 21 dias para mimetizar o epitélio intestinal. Como esperado grande parte do PSS não passa através da monocamada de células, mas quando está nanoencapsulado nas partículas desenvolvidas a permeabilidade aumenta 5 vezes.

Procurou-se também estudar a citotoxicidade das nanopartículas em células Caco-2, através do estudo de viabilidade celular em MTT e resazurina após 4 e 24h de incubação. Conclui-se que as nanopartículas não eram tóxicas para as células, indicando que não são tóxicas para o trato intestinal.

Por fim foi realizado o estudo do encapsulamento do PSS em condições gastrointestinais *in vitro*, em que o PSS livre e o PSS nanoencapsulado foram expostos às condições gastrointestinais. Os resultados mostram que o PSS se hidrolisa na fase gástrica não chegando à fase intestinal. No caso do PSS nanoencapsulado chega até à fase intestinal, no entanto parte das partículas se desintegram nesta fase.

Após o trabalho realizado conclui-se que, as nanopartículas apesar de serem resistentes à fase gástrica, para que o sistema se torne mais eficiente, seria necessário encapsular as nanopartículas em micropartículas para aumentar a estabilidade.

Palavras-chave: Nanopartículas, quitosano, ácido hialurónico, mucoadesividade, encapsulação, saciedade, péptido de soja.

Abstract

One of the major health challenges at present is the obesity, which affects approximately 500 million people worldwide. With obesity, the diseases like diabetes type 2, heart diseases, cardiac diseases and cancers increased. One approach to revolutionizing food intake is the release of soybean peptides, with the capacity to suppress the food intake and inhibit the gastric emptying, giving the effect of satiety. However, the protease inhibitors have shown limited effects in human intervention studies, at present. The encapsulation of these satiating compounds has been exploited to a limited extent, despite their protein nature rendering them susceptible to protease digestion. One intelligent strategy, for the development of nanocarriers, allowing on-demand release of trypsin inhibitors, is their encapsulation in mucoadhesive biopolymers, which may help improve bioavailability in the gastrointestinal tract.

In this context, we pretend to study the mucoadhesive biopolymers more appropriate for the distribution of peptides in the gastrointestinal tract. This study begins with the synthesis of nanoparticles from non-toxic biopolymers such as chitosan (CH), the hyaluronic acid (HA) and the sodium chondroitin (CS), through the coacervation method. After, the nanoparticles were characterize physical-chemical and the mucoadhesive was selected for this study the CH β /TPP/HA because, these nanoparticles had the pretended characteristics.

To confirm the theory that the nanoparticles were mucoadhesive, it was made a study of internalization of the particles, where these were incubated during 4 h with differentiated Caco-2/HT29-MTX cells and observed by a confocal microscopy. This study proved again that the particles are mucoadhesive, becoming sticking to the surface of the cells after washing with PBS.

After, was optimized the efficiency for encapsulation of the soybean satiating peptide (PSS), was encapsulated in the nanoparticles CH β /TPP/HA, at various concentrations. It was thus realized that the optimal percentage of PSS encapsulation was 51% corresponding to a concentration of 100 mg/mL PSS.

A study of the stability of the particles was also carried out over time and it was concluded that at high concentrations of nanoparticles, there is aggregation of the these, while diluted are more stable over time. The most stable nanoparticles are those that do not have encapsulated PSS. However, it was necessary to dilute the nanoencapsulated PSS and study its behavior over time to be able to compare.

To determine the effect of encapsulation on the intestinal permeability of the active compound, a permeability study of PSS (free and encapsulated) was performed using Caco-

2/HT29-MTX cell lines. The culture of the cell lines was done in the ratio 9:1 (Caco-2/HT29-MTX) for 21 days to minimize the intestinal epithelium. As expected the major of the PSS doesn't pass through the monolayer cell, but when it is nanoencapsulated in the developed particles the permeability increases 5 times.

We also study the citotoxicity of nanoparticles in Caco-2 cells by the study of viability cells in MTT and resazurin after at 4 and 24h of incubation. It is concluded that the applied nanoparticles were not toxics to the cells, and for this reason they are not toxic to the intestinal tract.

In the end, was made an *in vitro* digestion study, where the free PSS and the nanoencapsulated PSS were exposed to gastrointestinal conditions. The results show that the PSS hydrolyzes in the gastric phase not reaching the intestinal phase. In the case of nanoencapsulated PSS it reaches the intestinal stage, however it is understood that some parts of the particles were disintegrated at this point.

After study, it was conclude that, although the nanoparticles are resistant to the gastric phase, in order for the system to become more efficient, it would be necessary to encapsulate the nanoparticles in microparticles to increase stability.

Keywords: Nanoparticles, chitosan, hyaluronic acid, mucoadhesiveness, encapsulation, satiety, soybean peptide.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Encapsulamento	2
1.1.1 Encapsulamento de péptidos.....	4
1.1.2 Técnicas de encapsulamento	7
1.1.3 Critérios para determinar a qualidade do encapsulamento de péptidos.....	10
1.1.4 Encapsulação e controle da libertação do núcleo	13
1.2 Biopolímeros.....	13
1.2.1 Quitosano.....	14
1.2.2 Ácido hialurónico.....	15
1.2.3 Sulfato de condroitina	16
1.3 Mucoadesividade.....	17
1.3.1 Moléculas mucoadesivas	18
1.3.2 Fatores que influenciam a mucoadesão	19
1.3.3 Métodos para a avaliação da mucoadesividade.....	21
1.4 Objetivos do trabalho	23
1.5 Estrutura da dissertação.....	24
2. Estado da arte.....	25
2.1 Nanopartículas	25
2.1.1 Nanopartículas de CH/TPP.....	25
2.1.2 Nanopartículas de CH/TPP/HA	27
2.1.3 Nanopartículas de CH/CS	27
2.2 Nanopartículas em aplicações farmacêuticas e alimentares.....	29
2.2.1 Aplicações farmacêuticas.....	29
2.2.2 Aplicações alimentares	30
3. Parte experimental	33
3.1 Reagentes/Soluções	33
3.1.1 Síntese de partículas	33
3.1.2 Caracterização das partículas e ensaios de mucoadesividade	33
3.1.3 Otimização da eficiência de encapsulação do PSS.....	33

3.1.4	Ensaio de cultura celular	34
3.1.5	Estudos de digestão simulada <i>in vitro</i> em sistema estático.....	34
3.2	Métodos.....	34
3.2.1	Síntese das nanopartículas.....	34
3.2.2	Caraterização físico-química das partículas	35
3.2.3	Caracterização funcional das partículas otimizadas	39
3.2.4	Estudo <i>in vitro</i> do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais.....	44
4.	Resultados e discussão.....	47
4.1	Caracterização físico-química das partículas	47
4.1.1	Tamanho, carga superficial e índice de polidispersão (PI)	47
4.1.2	Avaliação das propriedades mucoadesivas das nanopartículas	50
4.1.3	Análise de morfologia mediante microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	56
4.2	Caracterização funcional das partículas otimizadas.....	58
4.2.1	Otimização da eficiência de encapsulação do PSS.....	58
4.2.2	Estudo da estabilidade das partículas.....	59
4.2.3	Estudo da permeabilidade em células Caco-2+HT29-MTX.....	61
4.2.4	Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2	63
4.3	Estudo da internalização das partículas	65
4.4	Estudo <i>in vitro</i> do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais	66
5.	Conclusão	67
	Bibliografia.....	69
	Anexos.....	81
A.	Caracterização físico-química das partículas	81
A.1	Tamanho, carga superficial e índice de polidispersão (PI)	81
A.1.1	Partículas CH/TPP	81
A.1.2	Partículas CH/TPP/HA.....	82
A.1.3	Partículas CH/CS.....	83
A.2	Caracterização da mucoadesividade	84
A.2.1	Microbalança de quartzo (QCM)	84
A.2.2	Avaliação da adesão das mucinas via tamanho das partículas e potencial Zeta ..	85

B.	Caracterização funcional das partículas otimizadas.....	92
B.1	Otimização da eficiência de encapsulação do PSS.....	92
B.2	Estudo da estabilidade das partículas.....	93
B.3	Estudo da permeabilidade em células Caco-2+HT29-MTX.....	97
B.4	Avaliação da toxicidade em células Caco-2.....	108
C.	Estudo <i>in vitro</i> do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais.....	116

Índice de Figuras

Figura 1.1 – a) Núcleo/concha e partículas/matriz (b) tipos de microcápsulas [11].	2
Figura 1.2 – Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simples, (ii) matriz (microesferas), (iii) microcápsula irregular (iv) Microcápsulas com vários núcleos, (V) microcápsulas de parede múltipla e (vi) microcápsula de montagem [14].	3
Figura 1.3 – Método da coacervação [24].	8
Figura 1.4 – Medição de dispersões coloidais [18].	12
Figura 1.5 – Estrutura do quitosano [34].	15
Figura 1.6 – Estrutura do ácido hialurônico [35].	15
Figura 1.7 – Estrutura do sulfato de condroitina [42].	16
Figura 1.8 – Mucosa gastrointestinal [47].	17
Figura 1.9 – Frequência (Hz) <i>versus</i> tempo (min) [45].	22
Figura 2.1 – Formulação de nanopartículas com CH e TPP [61].	25
Figura 2.2 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento mostrando nanopartículas CH/TPP obtidas por adição de TPP [10].	26
Figura 2.3 – Formulação de nanopartículas de CH/ TPP/ HA [43,44].	27
Figura 2.4 – Formulação de nanopartículas de CH/CS [68].	28
Figura 3.1 – Representação <i>in vitro</i> utilizado na determinação da permeabilidade intestinal [111].	41
Figura 3.2 – Microplaca de 96 poços com os poços utilizados no ensaio. 1 – 40% DMSO; 2 – Meio de cultura (<i>MEM</i>); 3 – 10% H ₂ O; 4 – PSS 50 mg/L; 5 – Nanopartículas; 6 – PSS nanoencapsulado 50 mg/L.	43
Figura 4.1 – Gráfico do tempo (min) <i>versus</i> frequência (10 ⁷) (Hz) das partículas CH β /TPP. A – Diminuição da frequência correspondente à solução das mucinas; B – Diminuição da frequência após a passagem das nanopartículas sobre as mucinas aderidas ao cristal.	51
Figura 4.2 – Gráfico com a diminuição das frequências (Hz) de cada síntese de partículas.	52
Figura 4.3 – Potencial Zeta (mV) das nanopartículas e das nanopartículas + mucinas.	53
Figura 4.4 – Percentagem de mucina ligada.	55
Figura 4.5 – Percentagem da razão entre a transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e transmitância das mucinas a 0,3 mg/mL.	56
Figura 4.6 – Partículas de CH β /TPP/HA através da microscopia eletrônico de varrimento (SEM).	57

Figura 4.7 – Histograma da distribuição dos tamanhos das partículas medidos.....	57
Figura 4.8 – Concentração do PSS (mg/mL) <i>versus</i> a percentagem de encapsulamento.	58
Figura 4.9 – Tempo (dias) <i>versus</i> tamanho das partículas (nm).....	60
Figura 4.10 – Tempo (dias) <i>versus</i> PI.....	61
Figura 4.11 – Percentagem (%) de massa de PSS permeado <i>versus</i> tempo (h) de incubação. 62	
Figura 4.12 – Cinética da passagem do PSS livre através da membrana (sem células), sem percentagem (%), relativamente à quantidade de PSS inicial.	63
Figura 4.13 – Percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação com as amostras, determinada pelo método de MTT.....	64
Figura 4.14 – Percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação com as amostras, determinada pelo método da resazurina.	64
Figura 4.15 – Observação por microscopia confocal de monocamadas, após 21 dias de diferenciação de células Caco-2, HT29-MTX incubadas com nanogéis HA-cy5.5 durante 4h. Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). A actina foi corada com isotiocianato de faloidina-tetrametil-rodamina B (verde). Os nanogéis foram corados com cy5.5 (vermelho).	65
Figura A.1 – Concentração das mucinas (mg/mL) <i>versus</i> absorvância.	89
Figura B.1 – Reta de calibração referente ao PSS.	92
Figura B.2 – Concentração do PSS (mg/L) <i>versus</i> área.	98
Figura B.3 – Concentração do PSS (mg/L) <i>versus</i> área.	98
Figura B.4 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.....	102
Figura B.5 – Cromatograma do PSS, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.	103
Figura B.6 – Cromatograma do PSS, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.	103
Figura B.7 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado, dos ensaios sem células, para as amostras 8 da basolateral e apical.	104
Figura B.8 – Cromatograma do PSS filtrado e não filtrado.	104
Figura B.9 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado filtrado e não filtrado.	105
Figura B.10 – Resistência elétrica transepitelial (TEER), ao longo do ensaio.	105
Figura C.1 – Cromatograma do PSS a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e gástrica respetivamente. O pico assinalado com a linha vermelha representa o PSS.	117
Figura C.2 – Cromatograma do PSS a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e intestinal respetivamente. Os picos assinalados com a linha vermelha representam o PSS. ...	117

Figura C.3 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e gástrica respetivamente. Os picos assinalados com a linha vermelha representam o PSS. 118

Figura C.4 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e intestinal respetivamente. O pico assinalado com a linha vermelha representa o PSS. 119

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Trabalhos publicados na literatura científica, relativos aos sistemas de libertação controlada de fármacos em base de quitosano.	29
Tabela 2.2 – Encapsulamento de hidrolisados de proteína de alimentos e péptidos, com a utilização de transportadores de proteínas, polissacáridos e lípidos.....	31
Tabela 3.1 – Fluídos simulantes usados no processo de digestão <i>in vitro</i>	45
Tabela 4.1 – Concentração (mg/mL), relação CH/TPP (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/TPP.....	47
Tabela 4.2 – Concentração (mg/mL), relação CH/TPP/HA (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/TPP/HA.....	48
Tabela 4.3 – Concentração (mg/mL), relação CH/CS (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/CS.....	49
Tabela 4.4 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas e das nanopartículas + mucinas, com uma concentração de mucinas de 0,6 mg/mL.	52
Tabela 4.5 – Tamanho (nm) e PI das nanopartículas ao longo do tempo, nanopartículas diluídas (x5) em água, não diluídas e o PSS nanoencapsulado.	59
Tabela A.1 – Resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das partículas de CH/TPP.....	81
Tabela A.2 – Resultados dos tamanhos das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das partículas de CH/TPP/HA.....	82
Tabela A.3 – Resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV), das partículas de CH/CS.....	83
Tabela A.4 – Média de desvio padrão das variações de frequência da cada síntese de nanopartículas.....	85
Tabela A.5 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas e potencial Zeta (mV) das mucinas a uma concentração de 0,3 mg/mL.....	85
Tabela A.6 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas + mucinas, com uma concentração de mucinas de 0,6 mg/mL.	87
Tabela A.7 – Concentração (mg/mL) e absorvâncias a 550 nm das mucinas.....	88
Tabela A.8 – Absorvâncias a 550 nm, concentração de mucina livre (mg/mL), massa de livre (mg) e percentagem de mucina ligada às nanopartículas com respetiva média e desvio padrão.	89

Tabela A.9 – Absorvância a 550 nm, percentagem de transmitância e percentagem da razão entre transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e da transmitância das mucinas a 0,3 mg/mL, com respetiva média e desvio padrão.....	91
Tabela B.1 – Concentração do PSS (mg/mL), área, concentração final do PSS (mg/mL), e % PSS encapsulado.....	92
Tabela B.2 – Tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) do PSS nanoencapsulado, ao longo do tempo.....	94
Tabela B.3 – Tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas, ao longo do tempo.....	95
Tabela B.4 – Tamanho das partículas (nm), PI das nanopartículas com um fator de diluição de (1/5) em água, ao longo do tempo.....	96
Tabela B.5 – Concentração do PSS em (mg/L) e a sua respetiva área.....	97
Tabela B.6 – Resultados do tempo de retenção (min), área, concentração de PSS (mg/L), massa de PSS na amostra e na basolateral (µg).	98
Tabela B.7 – Volume inicial (mL), concentração inicial de PSS (mg/L) e massa inicial de PSS (µg).	106
Tabela B.8 – Tempo (h), área com as respetivas médias, concentração (mg/L) e (µg/mL), a massa das amostras (µg).	106
Tabela B.9 – Massa total de PSS acumulado (µg) e a percentagem de PSS que passa a membrana, respetivas médias e desvios padrão.....	106
Tabela B.10 – Absorvâncias a 570 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 1.....	108
Tabela B.11 – Absorvâncias a 570 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 2.....	108
Tabela B.12 – Absorvâncias a 690 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 1.....	109
Tabela B.13 – Absorvâncias a 690 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 2.....	109
Tabela B.14 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão do meio de incubação, para 4h de contacto, para o ensaio 1.....	109
Tabela B.15 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão do meio de cultura, para 4h de incubação, para o ensaio 2.....	110
Tabela B.16 – Percentagem de viabilidade celular, média e respetivo desvio padrão para 4h de incubação, para o ensaio 1 e 2.....	110
Tabela B.17 – Absorvâncias a 570 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 1.....	111
Tabela B.18 – Absorvâncias a 570 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 2.....	111
Tabela B.19 – Absorvâncias a 690 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 1.....	111
Tabela B.20 – Absorvâncias a 690 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 2.....	112

Tabela B.21 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão para o meio de cultura, às 24h de contacto, para o ensaio 1.....	112
Tabela B.22 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm , média e o respetivo desvio padrão para o meio de cultura, às 24h de contacto, para o ensaio 2.....	112
Tabela B.23 – Percentagem de viabilidade, média e respetivo desvio padrão às 24h de contacto, para o ensaio 1 e 2.	113
Tabela B.24 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 4h de incubação, para o ensaio 2.	114
Tabela B.25 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 24h de incubação, para o ensaio 1.	114
Tabela B.26 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 24h de incubação, para o ensaio 2.	114
Tabela B.27 – Percentagem de viabilidade, média e respetivo desvio padrão para 4h de incubação, para o ensaio 2.	115
Tabela B.28 – Percentagem de viabilidade celular para 24h de incubação.	115

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

λ – Comprimento de onda

d – Diâmetro

f – Frequência

Hz – Hertz

kDa - Quilodalton

MDa – Megadalton

min – Minutos

mL – Mililitro

mV – Milivolts

nm – Nanómetros

pK_a – Constante de acidez

rmp – Rotações por minuto

μm – Micrómetros

PAS – Ácido periódico e reagente de Schiff

Lista de siglas

ACN – Acetonitrilo

H_5IO_6 – Ácido periódico

CH – Quitosano

CH_3COOH – Ácido acético

C_2H_6O – Etanol

C_3H_8O – Isopropanol

$C_2H_8O_3$ – Glicerol

CS – Sulfato de condroitina

DLS – Dynamic Light Scattering

DMSO – Dimetilsulfóxido

$CaCl_2(H_2O)_2$ – Cloreto de cálcio dihidratado

CO_2 – Dióxido de carbono

DAPI – 4, 6-diamidino-2-fenilindol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EE – Eficiência de encapsulamento

HA – Ácido hialurónico

HBSS – Hanks' Balance Salt

HCl – Ácido clorídrico

H_2O – Água

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

KCl – Cloreto de potássio

KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico

MEM – Minimum Essential Medium

$MgCl_2(H_2O)_6$ – Cloreto de magnésio hexaidratado

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NaCl – Cloreto de sódio

$NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – Carbonato de amónio

PBS – Soro fetal bovino

PFA – Paraformaldeído

PI – Polidispersidade

PSD – Distribuição tamanho das partículas

PSS – Péptido saciente de soja

QCM – Microbalança de cristal de quartzo

SEM – Microscopia eletrónica de varrimento

SGF – Fluido gástrico simulado

SIF – Fluido intestinal simulado

SSF – Fluido salivar simulado

TFA – Ácido trifluoroacético

TPP – Tripolifosfato de sódio

1. Introdução

A nanotecnologia define-se como criação, utilização e manipulação/processamento e aplicação de materiais, dispositivos ou sistemas numa escala nanométrica (menos que 100 nm). Nos últimos anos, a nanotecnologia encontrou inúmeras aplicações em diferentes indústrias alimentares e revolucionou todo o sistema alimentar desde a produção até ao processamento, armazenamento e desenvolvimento de materiais, produtos e aplicações inovadoras [1,2]. A aplicação da nanotecnologia no setor alimentar pode gerar inovação nas características dos alimentos, como textura, gosto, processabilidade e estabilidade durante a vida útil. Atualmente, as aplicações da nanotecnologia nas indústrias alimentares são imensas, mas é de destacar a nanoencapsulação para entrega controlada de compostos bioativos [1].

O número de produtos alimentares contendo componentes bioativos com efeito na promoção da saúde tem aumentado significativamente. Uma característica dos componentes alimentares bioativos é que eles estão sujeitos à rápida inativação ou degradação. Por esse motivo, a encapsulação pode ser um benefício para estes componentes bioativos, pois além de promover a viabilidade, retarda os processos de degradação e/ou evita a degradação até que o produto seja entregue nos locais onde a adsorção é desejada [3].

A obesidade é um dos maiores desafios da saúde atualmente. Em todo o mundo, cerca de 2 bilhões de adultos tem excesso de peso e cerca de 500 milhões de pessoas são obesas [4]. Manter o peso corporal ideal não é só um questão estética, mas mais importante, é uma questão de saúde. Com o excesso de peso, o risco do aparecimento de doenças como os diabetes tipo 2, doença cardíaca, derrame e cancro, aumenta [5]. Muitos dos tratamentos farmacológicos para a perda de peso foram retirados do mercado, devido aos seus efeitos adversos. No entanto, o único tratamento para a obesidade, que é capaz proporcionar a perda de peso a longo prazo é através de uma intervenção cirúrgica conjugada com uma alimentação saudável e prática de exercício físico [6]. Como a intervenção cirúrgica é bastante invasiva, a procura por novos tratamentos eficazes para combater a obesidade é uma questão atual. Uma das abordagens destinadas a revolucionar a ingestão de alimentos é a libertação de péptidos de soja.

A síntese de ácidos gordos humanos é regulada negativamente na maioria dos tecidos humanos normais, mas é altamente expressa em tecidos adiposos e malignos. A descoberta e o desenvolvimento de inibidores farmacológicos da síntese de ácidos gordos podem prevenir a obesidade, distúrbios metabólicos relacionados e cancro. A inibição da síntese de ácidos gordos no sistema nervoso central reduz acentuadamente a ingestão alimentar e o peso

corporal. Os péptidos derivados da β – conglícinina de soja inibem a síntese de ácidos gordos [7].

Alguns péptidos presentes nos hidrolisados de proteína de soja eliminam a ingestão de alimentos e inibem o esvaziamento gástrico, produzindo a sensação de saciedade [8]. No entanto, alguns péptidos de soja são suscetíveis a serem hidrolisados no trato gastrointestinal, portanto a nanoencapsulação é uma opção para melhorar a biodisponibilidade [9].

1.1 Encapsulamento

O encapsulamento pode ser definido como um processo para embalar/aprisionar uma substância, que pode estar em estado sólido, líquido ou gasoso, dentro de um invólucro sólido ou líquido, feito de outro material não miscível e que liberta o seu conteúdo a taxas e períodos de tempo controlados [1–4]. As cápsulas podem ser de dois tipos: núcleo/concha e partícula/matriz, como se pode observar na Figura 1.1. No primeiro caso, o material do núcleo é cercado por um tipo de membrana, enquanto que no segundo caso, as micro/nanopartículas formam uma fase dispersa, e estão distribuídas uniformemente dentro de uma matriz [11].

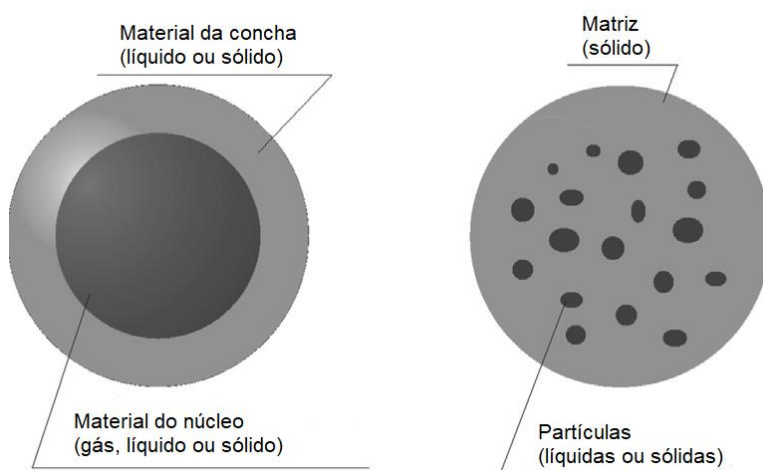


Figura 1.1 – a) Núcleo/concha e partículas/matriz (b) tipos de microcápsulas [11].

A matriz pode ser produzida a partir de açúcares, proteínas, polissacarídeos naturais e modificados, lípidos e polímeros sintéticos [12]. As cápsulas podem ser classificadas por três tamanhos [13]:

- *Macrocápsulas* - (> 5000 nm);
- *Microcápsulas* - (1-5000 μ m);

- *Nanocápsulas* - (<1 μm).

A encapsulação pode ser de variadas formas, como mostra a Figura 1.2 e pode ter: (i) revestimento de membrana simples, (ii) parede ou membrana de forma esférica ou irregular, (iii) estrutura de múltiplas paredes, com paredes de composições iguais ou variáveis ou numerosos núcleos dentro da mesma estrutura [12].

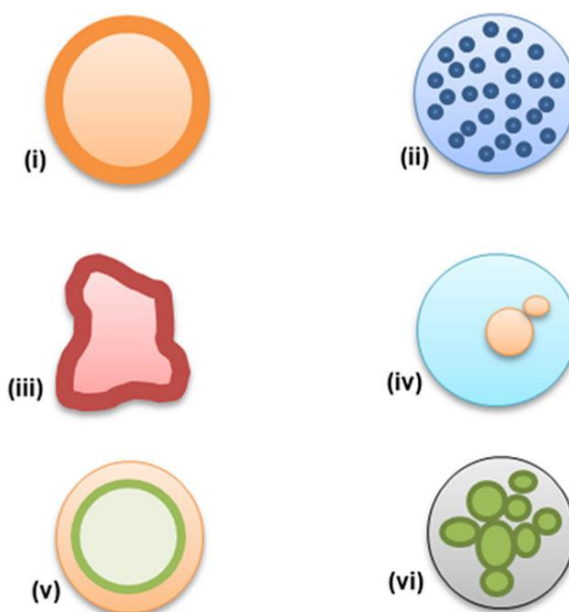


Figura 1.2 – Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simples, (ii) matriz (microesferas), (iii) microcápsula irregular (iv) Microcápsulas com vários núcleos, (v) microcápsulas de parede múltipla e (vi) microcápsula de montagem [14].

Um dos principais objetivos do encapsulamento é a redução da higroscopicidade, para garantir a estabilidade da textura e armazenamento dos hidrolisados e dos péptidos [15].

Esta tecnologia tem sido aplicada em produtos farmacêuticos, para a entrega de fármacos, obtendo assim uma entrega controlada destes e para proteger os fármacos da condição gástrica, melhorando assim a sua absorção no intestino [1,3]. A indústria alimentar também adotou esta tecnologia, por inúmeras razões [2,3,5]:

- Para uma entrega direcionada de compostos bioativos, pois estes são caracterizados por inativação rápida. O encapsulamento evitaria a degradação até que o produto seja entregue nos locais desejados;
- Para proteger os compostos que são sensíveis a alguns fatores como a humidade, calor ou outras condições extremas, aumentando a estabilidade, a biodisponibilidade e

mantendo a viabilidade;

- Para mascarar odores e sabores indesejáveis;
- Para proteger alguns nutracêuticos que são sensíveis a condições de baixo pH e formam isômeros ou oligômeros no estômago.

1.1.1 Encapsulamento de péptidos

Os aminoácidos unidos por meio de ligações peptídicas, podem formar os péptidos e por sua vez as proteínas. Quando o número de aminoácidos é superior a dois e inferior a cinquenta, o polímero é chamado de péptido. As proteínas podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas e contêm, geralmente, mais de cinquenta aminoácidos. A hidrólise ocorre quando existe uma quebra da molécula na presença das proteases presentes no nosso organismo [17].

Os péptidos e os aminoácidos podem ser encontrados através de fontes naturais ou podem ser produzidos por hidrólise de proteínas. Os péptidos bioativos e os aminoácidos são normalmente gerados a partir de proteínas alimentares por hidrólise controlada ou não controlada. A hidrólise de proteínas pode ser realizada por um fabricante de alimentos ou ingredientes (por exemplo, por métodos químicos, enzimáticos ou de fermentação), ou pode ocorrer dentro do organismo humano após a ingestão de alimentos (por exemplo, por ácidos ou enzimas digestivas) [18].

Os péptidos bioativos são diferentes de outros compostos bioativos alimentares, pois as espécies químicas dentro dos hidrolisados proteicos são heterogêneas. Estes péptidos bioativos podem precisar de serem isolados em matrizes mais complexas ou fracionadas antes do encapsulamento [15].

Os hidrolisados de proteínas alimentares e os péptidos são considerados uma categoria de ingredientes alimentares funcionais promissores. No entanto, a sua comercialização pode ser impedida devido à baixa biodisponibilidade, gosto amargo, higroscopicidade e probabilidade de interação com a matriz de alimentos. A bioestabilidade e a biodisponibilidade são fundamentais para obter benefícios fisiológicos, uma vez que os péptidos precisam atingir os seus alvos intactos para exercer a sua bioatividade. A biodisponibilidade é a porção do composto bioativo inalterado, absorvido e que atinge a circulação sanguínea. O encapsulamento como mecanismo de entrega, pode ser usado para superar esses desafios, melhorando a biodisponibilidade e as propriedades organolépticas dos péptidos [15].

Um dos desafios enfrentados na produção para comercialização de péptidos derivados de proteínas alimentares, é a suscetibilidade dos péptidos à digestão gastrointestinal, arriscando

assim a perder a sua integridade estrutural e função, quando são hidrolisados por proteases e peptidases. Os péptidos bioativos, quando são administrados oralmente, são submetidos à digestão péptica no estômago sob condições ácidas, seguido de várias digestões alcalinas de protéase pancreática na fase intestinal antes de serem absorvidos pelos enterócitos [15].

Um das razões mais importantes para o encapsulamento de ingredientes ativos é proporcionar uma estabilidade nos produtos finais e durante o processamento. A escolha de um sistema de encapsulamento é sempre crucial, uma vez que tem que ser eficiente e facilmente incorporado ao alimento sem interferir com a textura e com o sabor dos alimentos [16].

Existem muitas substâncias que podem ser usadas para encapsular líquidos, sólidos ou gases de diferentes tipos e propriedades. No entanto existe regulamentação para essas substâncias e no caso da indústria alimentar, essas regulamentações são mais rígidas do que por exemplo, na indústria farmacêutica. Os critérios mais importantes para a seleção de um material para encapsular e o que este deve fornecer ao produto final são, a concentração, o tipo de libertação, estabilidade, biodegradação, custos e a capacidade de formar uma barreira entre a fase interna e externa. A maioria dos materiais utilizados para encapsulamento no setor alimentar são biomoléculas. Entre todos os materiais, os mais utilizados para o encapsulamento em aplicações de alimentos são polissacarídeos [16].

Existe uma variedade de proteínas e polissacarídeos que podem ser usadas para fabricar partículas de biopolímero. As características moleculares destas partículas, como o peso molecular, flexibilidade, carga elétrica e hidrofobicidade, vão ser determinadas pelo tipo, número e distribuição dos monómeros ao longo da cadeia do polímero, bem como as suas ligações. As partículas devem ser projetadas para que tenham características funcionais específicas necessárias para uma aplicação específica. Por exemplo, se uma partícula estiver destinada a fornecer um componente de sabor, esta deve ser projetada para libertar o componente na boca e libertar as moléculas de sabor encapsuladas lá [18].

Um sistema de entrega é um sistema concebido para encapsular, entregar e libertar um ou mais componentes ativos/ingredientes alimentares. Os sistemas de entrega podem ser projetados para ter uma série de benefícios potenciais para a indústria de alimentos: incorporação de ingredientes ativos em matrizes de alimentos sem afetar negativamente características de qualidade como aparência, textura, sabor ou estabilidade; proteção contra degradação química, física ou biológica; aumentando a eficiência dos ingredientes ativos fornecendo esses ingredientes ativos para determinados tipos de ação; melhoria do armazenamento e manuseio do produto; extensão da vida útil do produto [1]. A indústria alimentar é restrita ao uso de matrizes transportadoras, sendo comestíveis, biodegradáveis, não

tóxicas e de baixo custo [15].

Existem três tipos de sistemas de entrega para o encapsulamento de péptidos. Transportadores baseados em proteínas, em polissacarídeos e em lípidos [15].

1.1.1.1 Transportadores baseados em proteínas

O encapsulamento em que a matriz é baseada em proteínas é o sistema nutricionalmente mais benéfico. Os transportadores baseados em proteínas mais populares para a entrega de compostos bioativos alimentares são os flavonoides, vitaminas e pró-vitamina A [3]. No entanto, é necessário aplicar diferentes tratamentos químicos ou térmicos complicados que não podem ser completamente controlados [2].

A razão do uso de proteínas para a entrega de compostos bioativos, é devido às suas propriedades funcionais, como a capacidade de formação de filme e gel, emulsificação e solubilidade, além do benefício nutricional. Entre as fontes de proteína, a soja tem sido a principal escolha para o encapsulamento de péptidos bioativos [15].

1.1.1.2 Transportadores baseados em polissacarídeos

Os polissacarídeos são moléculas de hidrato de carbono com longas cadeias de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. Podem ser encontrados em vários recursos, como origem vegetal, microbiana e animal. Tem uma composição química variável, diferentes faixas de peso molecular são insolúveis em água e amorfos [20]. São estruturalmente estáveis, abundantes e de baixo custo, por isso, geralmente, são ideais para serem utilizados como agentes de entrega. Os grupos funcionais reativos de polissacarídeos, tornam-se uma das melhores escolhas como matrizes portadoras. No entanto, em condições extremas, como a alta temperatura, a parede do polissacarídeo é suscetível a reagir com o núcleo do péptido para formar produtos complexos, que podem ser potencialmente tóxicos e também empobrecem os péptidos bioativos [15].

1.1.1.3 Transportadores baseados em lípidos

Os transportadores à base de lípidos, além de poderem ser produzidos à escala industrial, têm uma maior eficiência de encapsulamento e baixa toxicidade [2].

A liposfera e o lipossoma são dois sistemas à base de lípidos que são atualmente utilizados para encapsular hidrolisados e péptidos de proteínas alimentares. O primeiro possui uma

camada interna de ácidos gordos e uma camada externa composta pela parte hidrofílica do ácido gordo ou fosfolípido, enquanto a última é uma bicamada concêntrica única ou múltipla feita de fosfolípidos que constituem uma vesícula [19].

O lipossoma é o suporte de encapsulamento mais popular em comparação com a liposfera, que é menos usado para aplicações alimentares devido ao seu elevado teor de ácidos gordos saturados. O lipossoma é semelhante às membranas celulares, logo é favorável para a entrega de compostos bioativos e é compatível com uma grande variedade de péptidos bioativos. O seu núcleo é adequado para péptidos hidrofílicos enquanto que o inferior da bicamada é compatível com péptidos hidrofóbicos [15].

O uso do sistema de lipossomas no encapsulamento de péptidos, tem a vantagem de ser possível a sua produção à escala industrial, mas tem como desvantagens a instabilidade térmica, o uso de colesterol na preparação dos lipossomas e o risco de oxidação lipídica durante a sua produção [15].

1.1.2 Técnicas de encapsulamento

A escolha de um método para a encapsulação depende de uma serie de fatores como: tamanho das partículas, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos de libertação, escala de produção e custo. Existem vários métodos utilizados para a encapsulação, entre os quais podem destacar-se: coacervação, atomização, spray-drying, extrusão e leiteo fluidizado.

1.1.2.1 Coacervação

A coacervação é a separação em duas fases líquidas em sistemas coloidais [21]. Esta separação dá origem a uma fase densa rica num polímero (chamada de coacervado) que coexiste com o seu sobrenadante, deficitário em polímero. Estas duas fases líquidas são imiscíveis, mas não compatíveis termodinamicamente [4,9,10]. Esta técnica é considerada eficaz para o encapsulamento, uma vez que se baseia na atração eletrostática entre os materiais do núcleo e da parede [15].

A coacervação efetua-se em três passos: [4,6]

- Formação de uma fase química imiscível;
- Deposição do revestimento sobre a partícula, em que a fase rica em polímero apresenta-se sob a forma de gotículas líquidas, que coalescem, formando uma camada contínua que deposita-se para formar a parede da cápsula;

- Solidificação do material de revestimento e isolamento das cápsulas.

Na Figura 1.3, apresenta-se a técnica da coacervação [24].

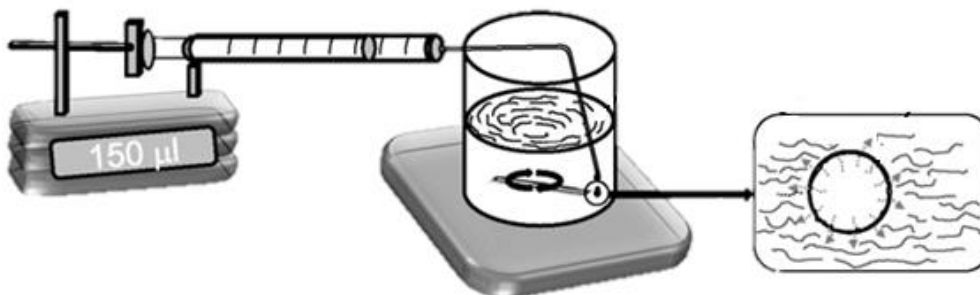


Figura 1.3 – Método da coacervação [24].

Apesar deste processo ser muito eficiente, é um processo caro, por isso não é muito utilizado na indústria alimentar [13]. A coacervação pode ser induzida por vários processos: alteração de temperatura, de pH ou adição de uma segunda substância como por exemplo solução concentrada de um sal [25].

Existem dois tipos de coacervação: a simples e a complexa, dependendo do número de polímero utilizados. Na coacervação simples, apenas um tipo de polímero está envolvido e é induzida alterando diferentes parâmetros como a adição de micro iões, um não solvente, uma mudança de temperatura ou de pH [8,10]. A coacervação complexa, acontece quando dois ou mais tipos de polímeros de cargas iónicas opostas estão presentes e é induzida através da criação de forças electrostáticas entre as macromoléculas [17,20]. Geralmente ocorre quando as interações electrostáticas são estabelecidas entre os biopolímeros de carga oposta em meios aquosos e existe um equilíbrio electrostático na fase concentrada. Os coacervados são formados através das interações electrostáticas do soluto, apesar de serem miscíveis no solvente [27].

A coacervação é uma tecnologia de encapsulamento distintiva e promissora, devido às cargas úteis muito altas alcançáveis (até 99%) e às possibilidades de liberação controlada [1].

1.1.2.2 Atomização

A atomização é um dos métodos mais antigos de encapsulação. É uma técnica barata e muito utilizada pela indústria de alimentos. O material a ser encapsulado, geralmente é hidrofóbico e é emulsionado numa solução aquosa ou dispersão do material encapsulante. A

emulsão resultante é bombeada através de um atomizador para uma câmara a alta temperatura [13].

As cápsulas produzidas por esta técnica têm o núcleo distribuído na forma de micropartículas na matriz seca do material encapsulante. Os mecanismos de libertação do núcleo usualmente são através de ação de solventes e por difusão [13].

1.1.2.3 Spray-drying

Esta técnica é também uma das mais antigas e mais utilizadas na indústria alimentar [16]. É simples, rápida e não necessita de lavagens para isolar as micropartículas ou eliminar resíduos ou solventes, no entanto tem como inconveniente o uso de calor, o que pode afetar as propriedades dos polímeros [26]. Produz partículas de boa qualidade, num tamanho inferior a 40 μm [16].

Neste método o péptido é disperso ou dissolvido numa solução orgânica ou aquosa do polímero e o sistema é nebulizado numa corrente de ar quente. Após a evaporação do solvente, as micropartículas secas são recuperadas. A eficiência de encapsulação deste método varia entre os 70 e 85%, independentemente dos parâmetros do processo [26].

Existem algumas desvantagens nesta técnica como a complexidade do equipamento, condições não uniformes na camara de secagem e nem sempre é fácil controlar o tamanho das partículas [16].

1.1.2.4 Extrusão

Na extrusão, o material do núcleo está na forma líquida e é lançado através do orifício de um tubo fino ou seringa para formar gotas. Estas gotas contêm o material de revestimento ou este é adicionado quando as gotas caem ou são injetadas [26]. Quando o material entra em contacto com o líquido desidratante e a parede se endurece, qualquer parte oleosa é removida pela superfície. Este método produz partículas relativamente grandes, que podem ser usadas quando se deseja fragmentos visíveis [13].

Em comparação com outras técnicas, esta foi considerada a melhor tecnologia para aplicações industriais de larga escala [16].

1.1.2.5 Leito fluidizado

A fluidização ocorre quando o fluxo ascendente de um fluido atinge velocidade suficiente para suspender as partículas sem expulsá-las da corrente de fluido, através de um leito de partículas [13].

Enquanto as partículas do núcleo são suspensas, o material da parede é atomizado para dentro da câmara, depositando-se sobre as partículas do núcleo. Quando as partículas atingem o topo da coluna ascendente, são lançadas numa coluna descendente de ar, que as lança novamente no leito fluidizado, onde são novamente revestidas, secas e endurecidas. A uniformidade da parede é assegurada pelas passagens das partículas pelo ciclo de revestimento [13].

Esta técnica possibilita que as partículas sejam revestidas com praticamente qualquer tipo de material de cobertura (polissacarídeos, proteínas, gorduras, etc.) [13].

1.1.3 Critérios para determinar a qualidade do encapsulamento de péptidos

A qualidade do encapsulamento dos péptidos depende de vários fatores como, o tamanho das partículas, o potencial Zeta, a eficiência de encapsulamento e a encapsulação e controle da libertação do núcleo. Para analisar alguns dos fatores como o tamanho da partícula e o potencial Zeta é utilizado o DLS (Dynamic Light Scattering).

1.1.3.1 Tamanho da partícula

O tamanho das partículas coloidais usadas para encapsular péptidos bioativos deve ser cuidadosamente selecionado. O tamanho das partículas pode variar de cerca de 10 nm para pequenas nanopartículas para cerca de 1 µm para micropartículas grandes e depende dos ingredientes e do processo de encapsulação [28].

A dispensabilidade e a solubilidade do péptido encapsulado dependem do tamanho das partículas. Um tamanho de partícula acima de 50 µm pode afetar significativamente a solubilidade e a dispersão, logo a textura dos alimentos vai também ser afetada. Pensa-se que um pequeno tamanho das cápsulas aumenta a entrega ou libertação das moléculas ativas. Os sistemas à base de lípidos são mais eficientes para a preparação de produtos de hidrolisado de proteínas e péptidos nanoencapsulados em comparação com os sistemas à base de proteínas ou polissacarídeos. A nanoencapsulação é vantajosa devido à sua elevada área de superfície podendo aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do produto. A maior parte da

encapsulação com proteínas, polissacarídeos ou ambos, resulta na produção de microcápsulas, devido à sua grande estrutura molecular, produzindo assim cápsulas relativamente grandes. O tamanho da partícula depende do tipo de veículo usado e também do método utilizado para o encapsulamento [15].

1.1.3.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão móvel e a camada estacionária do meio de dispersão ligado à partícula dispersa [29]. Este potencial, reflete o potencial de superfície das partículas, que são influenciadas pelas mudanças na interface com o meio dispersante [30]. Existem alguns fatores a afetar o potencial Zeta, como o pH (é o fator que mais afeta), a força iônica, a concentração de aditivos e a temperatura [29].

As emulsões com alto potencial Zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estabilizadas, enquanto que emulsões com potenciais Zeta baixos tendem a coagular ou a flocular, podendo levar a uma fraca estabilidade física [29].

A carga de superfície é umas das propriedades que transmitem a estabilidade dos produtos encapsulados. Quando diminui a magnitude do potencial Zeta, diminui também a estabilidade do produto encapsulado. O hidrolisado de proteínas encapsuladas e os produtos peptídicos de potencial Zeta de baixa magnitude tendem a agregar-se em meio aquoso. Ao aumentar a concentração de componentes do núcleo e na parede o potencial Zeta diminui [10].

1.1.3.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS) é uma tecnologia de dimensionamento de partículas amplamente usada para medir a distribuição do tamanho das partículas (PSD) de dispersões coloidais. É particularmente útil para a análise de sistemas de distribuição coloidal que contém partículas relativamente pequenas ($d < 1000$ nm). Os tamanhos das partículas baseados neste princípio medem as flutuações na intensidade da luz dispersa ao longo do tempo, que ocorre quando as partículas numa dispersão coloidal alteram periodicamente a sua localização espacial relativa devido ao movimento browniano (Figura 1.4). A frequência dessas flutuações de intensidade depende da velocidade em que as partículas se movem e do tamanho das partículas: partículas menores movem-se mais rapidamente que as maiores e, logo, apresentam flutuações de intensidade mais rápida. Uma amostra é analisada ao medir a mudança na intensidade da onda espalhada ao longo do tempo num determinado ângulo de

dispersão. Seguidamente, é usado um modelo matemático adequado para converter as flutuações de intensidade num PSD [18].

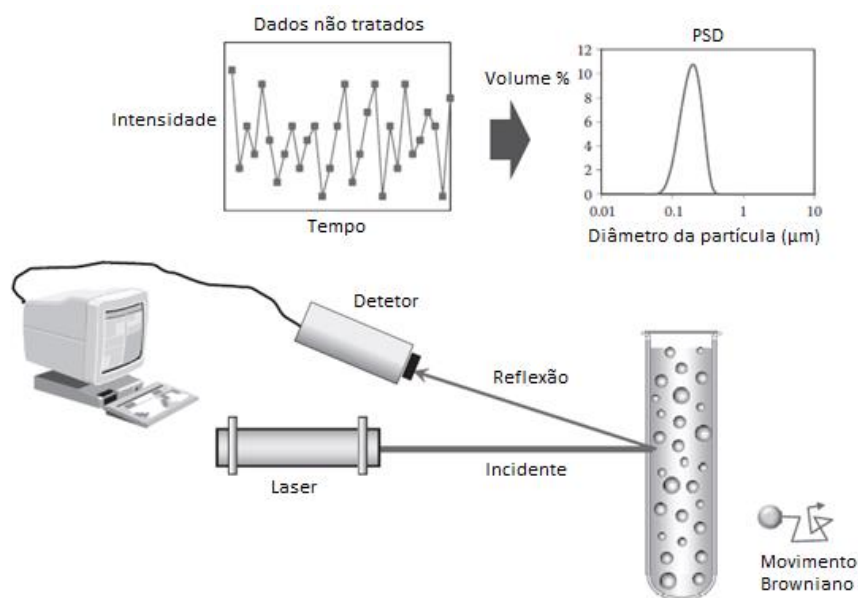


Figura 1.4 – Medição de dispersões coloidais [18].

1.1.3.4 Eficiência de encapsulamento (EE)

A eficiência de encapsulamento (EE) é a quantidade de composto bioativo (péptido) preso no núcleo ou na superfície do veículo em comparação com a quantidade inicial do material bioativo. É um fator importante a considerar especialmente na produção de produtos hidrolisados e péptidos de proteínas bioativas comerciais [15].

Uma eficiência alta é sempre favorável, mas uma eficiência de encapsulamento de mais de 50%, pode levar ao risco de vazamento bioativo. No entanto uma eficiência de encapsulamento baixa leva a um uso insuficiente dos materiais bioativos, logo seria necessário uma maior quantidade de produtos encapsulados para atingir as quantidades de péptido necessárias [3,21]. A eficiência de encapsulamento depende da relação núcleo-parede, das condições em que o encapsulamento é realizado e da técnica de encapsulamento. Um estudo publicado na *Royal Society of Chemistry*, relata que o encapsulamento usando cápsulas de proteínas e polissacarídeos resultou numa maior eficiência de encapsulamento em comparação com o encapsulamento de péptidos à base de lípidos, possivelmente porque o primeiro é controlado e envolve processos de alta energia no aprisionamento dos péptidos [15].

Em geral, as técnicas que utilizam altas forças de cisalhamento, pressão e temperatura resultam em eficiências de encapsulamento mais altas [15].

1.1.4 Encapsulação e controle da liberação do núcleo

A encapsulação permite que o núcleo seja isolado do ambiente externo até que a liberação seja desejada. Uma das prioridades de extrema importância nos processos de encapsulação é a liberação no local e no momento desejado. Por exemplo, os compostos de sabor devem ser liberados no momento do consumo. Os principais fatores que afetam as taxas de liberação do núcleo estão relacionados com o material encapsulante e com o núcleo. No entanto, existem outras variáveis que influenciam a liberação, como: volatilidade do núcleo, proporção entre núcleos e encapsulante, tamanho das partículas e grau de viscosidade do polímero encapsulante [18].

Os processos que utilizam encapsulantes hidrofílicos normalmente têm uma liberação mais rápida do núcleo, enquanto os encapsulantes à base de gorduras ou ceras tendem a retardar a liberação. Os principais mecanismos envolvidos na liberação do núcleo são [18]:

- *Liberação controlada por difusão* – A difusão é um dos mecanismos mais importantes no processo de liberação. Se a parede de uma cápsula estiver íntegra, a liberação do núcleo ocorre principalmente por difusão, cuja taxa é dirigida pelas propriedades químicas do núcleo e do material encapsulante, assim como por algumas propriedades físicas da parede, como estrutura da matriz e dimensão dos poros;
- *Liberação ativada por degradação* – Proteínas ou lípidos podem degradar-se pela ação de proteases e lipases, respectivamente;
- *Liberação ativada por solvente* – Em contacto com um solvente, o material da parede pode dissolver-se totalmente, libertando o núcleo. A água é o mecanismo mais comum de liberação na indústria alimentar;
- *Liberação controlada por pH* – Resulta das alterações na solubilidade em água do material da parede, decorrentes das alterações de pH;
- *Liberação ativada por temperatura* – O núcleo é libertado como resultado de uma mudança de temperatura, afetando assim o estado físico e a taxa de liberação;
- *Liberação ativada por pressão* – Ocorre quando uma pressão é aplicada às paredes das cápsulas, por exemplo, durante a mastigação.

1.2 Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros produzidos por organismos vivos que contêm unidades monoméricas ligadas covalentemente para formar estruturas maiores. Existem três tipos principais de biopolímeros baseados nas diferentes unidades monoméricas usadas e na

estrutura do biopolímero formado, os polinucleótidos, os polipéptidos e os polissacarídeos. Os polinucleótidos são polímeros longos constituídos por treze ou mais monómeros de nucleótidos. Os polipéptidos são polímeros curtos de aminoácidos e os polissacarídeos são maioritariamente estruturas de hidratos de carbono poliméricos ligados linearmente [31].

A seleção de um biopolímero ou combinação de polímeros para a produção de nanopartículas depende de vários fatores como: propriedades físico-químicas e funcionais desejadas das partículas (tamanho, carga, polaridade, permeabilidade, degradabilidade e perfil de libertação) [32].

Os biopolímeros escolhidos para produzir nanopartículas foram: quitosano, ácido hialurónico e sulfato de conditina.

1.2.1 Quitosano

O quitosano é um biopolímero natural derivado da quitina e é o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. É um polímero catiónico e pode ser encontrado nos exoesqueletos dos crustáceos, insetos, bem como moluscos e fungos. É formada por unidades monoméricas repetidas de N-acetil-D-glicosamina (GlcNHAc) ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ [10], como se pode observar na Figura 1.5.

Este biopolímero é obtido através da desacetilação da quitina em meio alcalino forte e a temperaturas superiores a 60°C, ou seja, existe a transformação do grupo (NHCOCH₃) em amina (NH₂), por meio da reação com uma base forte. Este grupo amina, altamente ativo, proporciona a solubilidade em meios ácidos do quitosano, diferenciando-o assim da quitina [10].

Como a celulose, tanto a quitina como o quitosano são considerados polissacarídeos de ocorrência natural. É um biopolímero biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade [10].

O quitosano é um dos polímeros mais populares no sistema de encapsulamento e entrega. Na indústria alimentar, tem sido investigada pelos seu potencial de encapsulamento e entrega de vários nutrientes. A característica catiónica do quitosano em condições ácidas fornece simplicidade para fabricar sistemas de encapsulamento e entrega em diferentes formas, incluindo nano/micropartículas [10].

Este polímero exhibe fortes propriedades mucoadesivas devido à formação de pontes de hidrogénio e ligações iónicas entre os grupos amino do quitosano (carregados positivamente) e os resíduos de ácido siálico (carregados negativamente) das glicoproteínas da mucina [33].

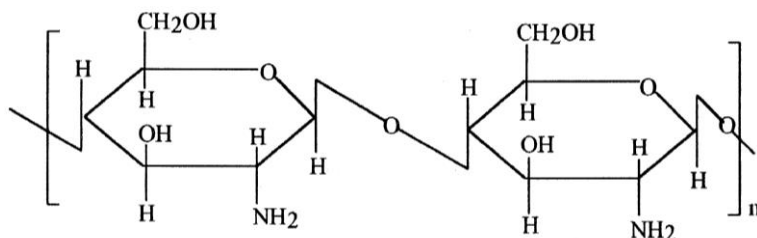


Figura 1.5 – Estrutura do quitosano [34].

1.2.2 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (HA) é um biopolímero, polissacarídeo, de ocorrência natural, presente em tecidos e cápsulas bacterianas. É um polímero linear, hidrofílico, não-imunogénico, biodegradável, biocompatível, solúvel em água e tem elevada massa molecular. É composto por unidades de ácido D-glucurónico e N-acetil-D-glucosamina, através de ligações glicosídicas β-1,4 e β-1,3, alternadas [26,27] como se pode verificar na Figura 1.6. Pertence a um grupo de substâncias chamadas glicosaminoglicanos [37].

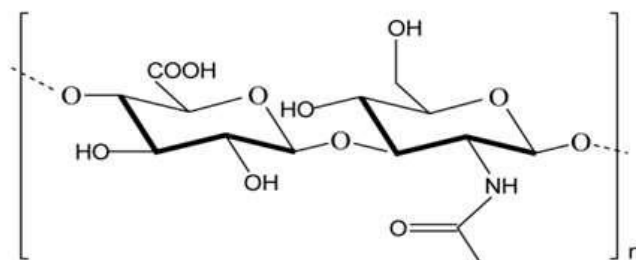


Figura 1.6 – Estrutura do ácido hialurónico [35].

O HA em solução tem uma consistência gelatinosa, tem alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às características estruturais da molécula. Este ácido está presente em vários tecidos conectivos de animais, tais como pele e cartilagem, e possui importantes funções como flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos [38].

O HA consegue estabelecer interações moleculares com a mucina, formando ligações de hidrogénio e/ou *Van der Waals*, que resultam em forças atrativas, responsáveis pela consolidação do processo de adesão, devido à presença de grupos hidroxil na sua estrutura [35].

Todas as funções biológicas do HA estão relacionadas com as suas diversas estruturas e interações específicas. A estrutura do HA pode ser afetada pelo ambiente, pela força iónica, constante dielétrica local, exposição a forças mecânicas perturbadoras e pela presença de espécies que interagem com as suas cadeias, como as proteínas e os lípidos [37].

1.2.3 Sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina (CS) é um polissacarídeo linear que é composto por ácido glucurónico D (GlcA) E N-acetil-D-galactosamina (GAINAc) [39]. É um importante componente estrutural da ligação dos tecidos, e na matriz cartilaginosa [40]. Este componente tem capacidade antioxidante e é abundante na matriz extracelular de todos os vertebrados. Além disso, desempenha um papel importante na cicatrização de feridas. O CS também é usado como agente na pele, devido à sua capacidade de hidratar, curar e suavizar a pele [41]. Na Figura 1.7, é mostrada a estrutura do sulfato de condroitina.

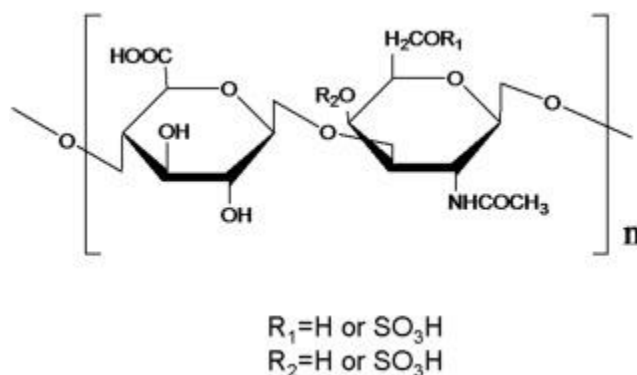


Figura 1.7 – Estrutura do sulfato de condroitina [42].

Este polímero natural é aniónico e apresenta baixa toxicidade, alta estabilidade, flexibilidade para modificação química, baixo custo, é biodegradável e solúvel em água. O facto de o CS ser solúvel em água torna-o limitante como veículo de libertação controlada. No entanto, esta limitação pode ser minimizada através da interação electrostática com substâncias carregadas opostamente [40].

1.3 Mucoadesividade

A adesão é definida como uma força molecular de atração na área de contacto entre dois corpos diferentes que atuam para se manterem juntos. A bioadesão é um fenómeno de adesão, em que pelo menos um dos aderentes é biológico. A mucoadesão é um termo usado para um fenómeno bioadesivo, em que o substrato biológico é uma superfície mucosa e é um processo que envolve grandes quantidades de água [43].

A mucosa gastrointestinal é revestida por uma camada de muco [44]. O muco é uma barreira de gel viscoelástica e tenaz que cobre, lubrifica e protege o corpo através do aprisionamento rápido de substâncias estranhas, através de forças estéticas e adesivas [45]. No trato gastrointestinal, o muco facilita a passagem de alimentos através do canal alimentar. Pode ser constantemente ou intermitentemente segregado e a sua quantidade varia [46]. Em diferentes regiões do trato gastrointestinal existe diferenças nas quantidades de muco segregado, na proporção dos constituintes e na composição das glicoproteínas [44]. O muco é composto principalmente por água (até 95%), sais inorgânicos e glicoproteínas denominadas de mucinas, que são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas em forma de gel do muco [43].

A Figura 1.8, representa uma mucosa gastrointestinal.

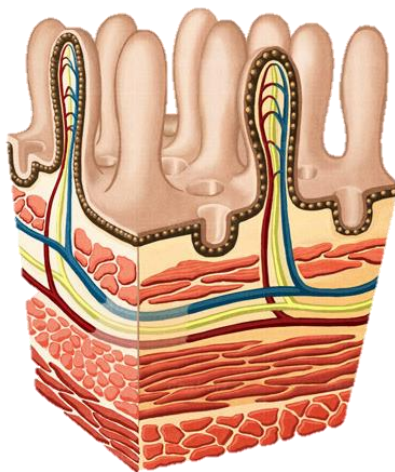


Figura 1.8 – Mucosa gastrointestinal [47].

As mucinas são moléculas grandes, com pesos moleculares variando de $0,5 \times 10^6$ a mais de 20×10^6 g/mol, são constituídas por cerca de 90% de hidratos de carbono e são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas do muco [25,26]. As mucinas têm propriedades

mucoadesivas, pois apresentam interações electrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogénio [48].

A maioria das ligações mucoadesivas a outras substâncias é obtida por ligações químicas, físicas ou secundárias sendo a interação predominante a ligação de hidrogénio. Consequentemente, vários grupos funcionais, tais como hidroxilo, carboxilo e outros grupos funcionais formadores de ligação de hidrogénio, podem contribuir para a mucoadesão [45].

A camada mucosa aderente ao trato gastrointestinal é produzida por células especializadas. Essas células são células epiteliais de superfície, encontradas principalmente no estômago, mas também noutras partes do intestino. Ao contrário de outras secreções gastrointestinais, o muco adere às superfícies epiteliais da mucosa como um gel insolúvel em água, até que ocorra degradação e erosão [43].

O trato gastrointestinal possui barreiras fisiológicas e morfológicas contra a administração de proteínas ou péptidos, (a) enzimas proteolíticas no lúmen do intestino como pepsina, tripsina e quimiotripsina; (b) enzimas proteolíticas na membrana (endopeptídases); (c) flora intestinal bacteriana; (d) camada de muco e revestimento de células epiteliais. A mucosa é projetada para prevenir a absorção de matéria originária do ambiente. Um processo para superar a barreira gastrointestinal é usar as nanopartículas [49].

As células epiteliais do intestino delgado formam uma monocamada que reveste a superfície do lúmen do intestino delgado. Estas separam o lúmen intestinal da circulação sistémica e previnem a absorção de compostos tóxicos e a invasão de bactérias através do trato gastrointestinal. Nanopartículas ingeridas que sejam tóxicas podem ferir as células epiteliais intestinais [50].

As células Caco-2 são originárias de carcinoma do cólon humano e são frequentemente usadas para mimetizarem o do intestino humano, pois diferenciam-se espontaneamente após 3-4 semanas em cultura [53,106]. Quando estas células estão diferenciadas, exibem características morfológicas e funcionais de enterócitos funcionais e podem expressar alguns transportadores presentes no intestino delgado humano [51].

1.3.1 Moléculas mucoadesivas

Uma molécula mucoadesiva não deve ser tóxica, não deve ter ações fisiológicas ou farmacológicas indesejáveis, deve ter boa molhabilidade, uma capacidade de descarga adequada e não deve ser cara. Por estes motivos, os biopolímeros e em particular os

polissacarídeos alimentares são bons candidatos. Existem algumas propriedades moleculares e fatores ambientais moleculares importantes a considerar numa molécula mucoadesiva [43]:

- *Propriedades moleculares* – carga, ligação ao hidrogénio, hidrofobicidade, flexibilidade, distribuição de peso molecular/peso molecular;
- *Fatores ambientais moleculares* – solubilidade, pH, força iónica, presença de outros sais e outras moléculas (anticorpos, enzimas, polissacarídeos, etc.)

O processo mucoadesivo pode ocorrer em duas fases: Na primeira é necessário que ocorra a bio-aderência, logo deve haver um contacto próximo entre o polímero mucoadesivo e a camada do muco, e para isso é que fatores como a boa molhabilidade e a hidratação são importantes. Como consequência, ocorre a transferência de água da camada de muco para o polímero, aumentando assim este último. Assim, as cadeias do polímero adquirem maior mobilidade para poderem interpenetrar com as cadeias glicoproteicas do muco. O estabelecimento posterior de ligações químicas entre o polímero e o muco contribui para a consolidação do fenómeno mucoadesivo [24,25].

1.3.1.1 Polímeros mucoadesivos

Os polímeros mucoadesivos podem ser divididos em polímeros naturais e sintéticos. Polímeros para utilização em preparações mucoadesivas podem ser aniónicos, catiónicos ou não iónicos [53].

Os polímeros aniónicos têm propriedades mucoadesivas devido à ligação de hidrogénio com a camada de muco, e têm baixa toxicidade [30,31]. Estes polímeros são caracterizados devido à presença de grupos funcionais carboxilo e sulfato que dão origem a uma carga negativa global [54].

Os polímeros catiónicos formam ligações com as cadeias da mucina carregadas negativamente [53]. Dos polímeros catiónicos, o quitosano é o mais utilizado [54].

Park e Robinson evidenciaram que os polianióes são preferidos ao policatiões em relação à adesão, bem como ao potencial de toxicidade [53].

1.3.2 Fatores que influenciam a mucoadesão

Existem diversos fatores que afetam a mucoadesão, como os fatores relacionados com o polímero e os fatores relacionados com as condições fisiológicas.

- *Fatores relacionados com o polímero:*
-

Algumas das características do polímero, como o peso molecular e a viscosidade da solução mostram correlação positiva com a força mucoadesiva. A quantidade de ligações iniciais formadas depende da capacidade de difusão para a camada do muco, logo, uma maior flexibilidade do polímero resulta numa melhor difusão na rede do muco e conseqüentemente, uma mucoadesão mais forte. A ligação de hidrogénio é essencial para uma mucoaderência forte, proporcionando interações entre o polímero e os grupos hidroxilo de oligossacáridos da mucina [55].

- *Fatores relacionados com as condições fisiológicas:*

pH – O valor de pH no trato gastrointestinal influencia a carga à superfície do muco e do polímero, logo pode influenciar a interação entre os dois e o grau de hidratação de alguns polímeros [44]. O estado iónico de um polímero que pode influenciar o grau de mucoadesão, depende do pH do meio em que reside e este varia entre diferentes ambientes mucosos [55].

Os polímeros aniônicos como alguns polissacarídeos, que possuem grupos carboxilo, são parcialmente carregados negativamente a um pH quase neutro. As suas fortes propriedades mucoadesivas podem-se dever às ligações de hidrogénio e às forças de *Van der Waals*. Os polímeros catiónicos (como o quitosano), que possuem grupos funcionais amino, também são mucoadesivos fortes. Como o quitosano tem um pK_a alto, forma um gel em condições ácidas [55].

Concentração – Se a concentração for muito baixa, a interação entre o polímero e a mucina é instável. No entanto, se for muito alta, a rede de polímero torna-se impermeável ao solvente, o que resultará na falta de cadeias de polímero livres para difundir na interface do muco, devido à sua estrutura altamente enrolada e compacta [55].

Hidratação – Uma hidratação incompleta, resulta numa baixa exposição dos grupos responsáveis pelas interações. Enquanto que, uma sobre hidratação resulta na perda de coesão do polímero, diminuindo assim a mucoadesão [44].

Viscosidade, espessura e taxa de renovação – Influencia a expansão da interação entre o polímero e o muco [44].

Tempo de residência – O tempo de residência de um polímero mucoadesivo no trato gastrointestinal pode ser limitado pela taxa de renovação do muco, uma vez que a interação polímero-muco pode ser mais forte que a interação entre as camadas de muco. Logo, um sistema mucoadesivo teria mais sucesso na zona do trato gastrointestinal onde a taxa de renovação do muco é mais lenta [44].

1.3.3 Métodos para a avaliação da mucoadesividade

Existem diferentes métodos e técnicas para analisar o destino dos sistemas de libertação de partículas nas camadas de muco, a permeação do muco e o comportamento da mucoadesão em sistemas com partículas. Neste subcapítulo apenas são discutidas duas técnicas.

1.3.3.1 Método da microbalança de cristal de quartzo (QCM)

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é um instrumento sensível e versátil para o estudo em tempo real dos comportamentos dinâmicos de uma amostra na superfície de cristal [45]. O cristal tem a forma de um disco que pode ser colocado em oscilação no modo de cisalhamento por uma corrente elétrica. Os elétrodos são depositados nas faces opostas do cristal e quando a corrente elétrica é aplicada pelos elétrodos, o cristal sofre uma oscilação no modo de cisalhamento [56].

Esta técnica fornece informações sobre as mudanças de massa e estruturais que ocorrem na amostra por medidas simultâneas de frequência (f). A partir dessas mudanças é possível calcular a massa/espessura da amostra absorvida e também as suas propriedades viscoelásticas [45].

A Figura 1.9 representa um exemplo do tipo de gráfico da QCM, em que a seta azul indica quando é que a solução de mucina entra no módulo QCM. A seta vermelha indica quando é que a solução de polímero entra no módulo. A seta preta indica a introdução da solução tampão. A barra dourada, as linhas azul-ciano e os círculos vermelhos com revestimento preto indicam o sensor do cristal, as mucinas e os polímeros, respetivamente [45].

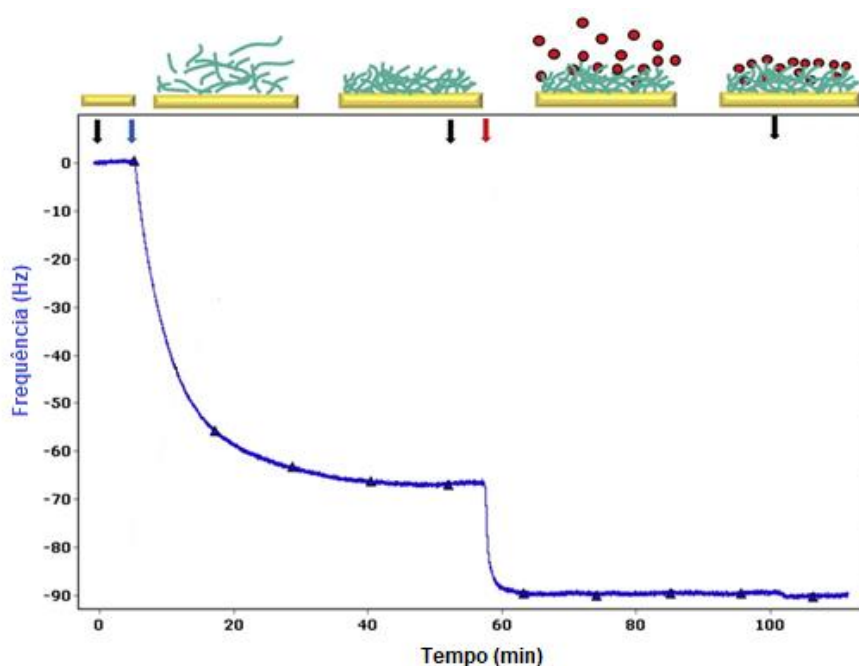


Figura 1.9 – Frequência (Hz) versus tempo (min) [45].

1.3.3.2 Estudo da interação das nanopartículas com as mucinas

O estudo da interação das nanopartículas com as mucinas pode ser executado através de três ensaios diferentes. Através do tamanho das nanopartículas e do potencial Zeta, através de um ensaio colorimétrico e através da transmitância. Para estes ensaios a suspensão de nanopartículas é misturada com as mucinas e incubada a 37°C durante 3h a 300 rpm.

- **Via tamanho das partículas e potencial Zeta**

Em tempos pré-definidos, as amostras são analisadas em relação à sua mudança no tamanho e no potencial Zeta. As alterações analisadas no tamanho e no potencial Zeta, fornecem informações acerca de uma possível adsorção das mucinas às partículas [57].

Os componentes das mucinas absorvem facilmente as nanopartículas de carga positiva e negativa. Além disso, este método pode ser usado para avaliar a estabilidade de nanopartículas em fluidos biológicos que contém proteínas e enzimas [57].

- **Via ensaio colorimétrico**

Os ensaios colorimétricos são largamente utilizados para a análise quantitativa e qualitativa de hidratos de carbono que ocorrem em polissacarídeos, glicoproteínas, glicolípidos e proteoglicanos [58].

A oxidação periódica de grupos hidroxilo e aldeídos sob condições aquosas é uma reação adequada para aplicação em hidratos de carbono. Quando esta oxidação é emparelhada com um reagente subsequente para o desenvolvimento de cor, como o reagente de Schiff, torna-se um método útil para o ensaio qualitativo ou quantitativo de hidratos de carbono. O ácido periódico – reagente de Schiff (PAS) são muito utilizados para visualizar mucinas, glicoproteínas, glicogénio e outros polissacarídeos em tecidos e células [58].

Neste método a amostra e o ácido periódico (H_5IO_6) são colocados numa microplaca e incubados durante 1,5h a 37°C seguido da colocação do reagente de Schiff. A absorvância é lida a 550 nm [58].

- **Via transmitância**

Neste método a transmitância das nanopartículas em conjunto com as mucinas são medidas a 500 nm. Os dados obtidos são reportados em percentagem de transmitância e são calculados como a razão entre os valores de transmitância da amostra e da mucina. Uma diminuição na percentagem de transmitância da amostra indica propriedades mucoadesivas [59].

1.4 Objetivos do trabalho

A realização deste trabalho teve como principal objetivo a produção de um nanosistema baseado em biopolímeros mucoadesivos para a entrega direcionada de péptidos no trato gastrointestinal. As principais tarefas relacionadas com a consecução deste objetivo foram:

- Otimização da síntese de nanopartículas contendo quitosano, ácido hialurónico e sulfato de condroitina, utilizando a técnica da coacervação;
- Caracterização das nanopartículas de acordo com o seu tamanho (DLS e microscopia eletrónica de varrimento (SEM)), carga superficial (DLS);
- Caracterização das propriedades mucoadesivas das nanopartículas;
- Caracterização funcional das partículas otimizadas;
- Estudo do efeito do encapsulamento na estabilidade do péptido em condições gastrointestinais *in vitro*.

1.5 Estrutura da dissertação

Esta dissertação refere-se à criação de um nanosistema com propriedades mucoadesivas para a entrega direta de péptidos no trato gastrointestinal.

A dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos. Introdução, estado da arte, parte experimental, resultados e discussão e conclusão.

No primeiro capítulo referente à introdução, abordam-se três temas fundamentais, encapsulamento, biopolímeros e mucoadesividade. No subcapítulo encapsulamento, é efetuado um estudo sobre o encapsulamento de péptidos, as técnicas de encapsulamento, os critérios para a determinação da qualidade do encapsulamento e o controle da libertação do péptido. No que diz respeito aos biopolímeros, é realizada uma breve apresentação dos biopolímeros utilizados para a produção do nanosistema mucoadesivo. Por fim, no subcapítulo da mucoadesividade, apresenta-se uma breve explicação sobre o tema, as moléculas mucoadesivas, os fatores que influenciam a mucoadesão e os métodos para a sua quantificação.

O segundo capítulo concentra-se no estado da arte. Dentro deste capítulo, existe dois subcapítulos. O primeiro refere-se às características das partículas que vão ser produzidas durante o trabalho e o segundo centra-se nas aplicações farmacêuticas e alimentares das nanopartículas.

No terceiro capítulo, irá ser apresentada toda a parte experimental do trabalho, desde a síntese das nanopartículas, a caracterização das partículas de acordo com o tamanho, carga e polidispersidade, caracterização da mucoadesividade através do método QCM e do método da interação das nanopartículas com as mucinas, caracterização funcional das partículas otimizadas através da otimização da eficiência de encapsulação do péptido, do estudo da estabilidade das partículas, estudo da permeabilidade do péptido em cultivo celular de células do epitélio intestinal e avaliação da toxicidade em células Caco-2. Também foi realizado um estudo da internalização das partículas e por fim é realizado um estudo do efeito do encapsulamento na estabilidade do péptido em condições gastrointestinais *in vitro*.

No capítulo referente aos resultados e discussão poderão ser encontrados os resultados experimentais obtidos, relativamente à caracterização e estudo das partículas, bem como as discussões associadas a estes.

No quinto e último capítulo, vai ser referente às conclusões do trabalho, tendo em conta as dificuldades que foram surgindo durante o desenvolvimento do mesmo.

2. Estado da arte

Neste capítulo serão abordadas as nanopartículas, em específico as nanopartículas que irão ser produzidas ao longo deste trabalho e as aplicações farmacêuticas e alimentares das nanopartículas.

2.1 Nanopartículas

Os sistemas de entrega de compostos bioativos em nanopartículas estão em enorme crescimento no setor alimentar, destinados a melhorar a qualidade e segurança alimentar. Recentemente as nanopartículas são usadas para encapsular componentes bioativos, que podem melhorar a saúde e o bem-estar humano [18].

Existem vários tipos de nanopartículas, dependendo dos materiais utilizados e do método de preparação destas. Nos subcapítulos a seguir estão apresentadas as nanopartículas produzidas neste trabalho e uma breve explicação destas.

2.1.1 Nanopartículas de CH/TPP

A mistura da solução de CH com TPP produz nanopartículas que podem variar num diâmetro entre dezenas a centenas de nanômetros (nm). Estas nanopartículas tem atraído grande interesse como veículos de libertação controlada devido ao seus atributos, como biocompatibilidade, mucoaderência e procedimento de preparação fácil [60].

As nanopartículas de CH/TPP podem ser obtidas usando o CH que transporta apenas uma carga positiva e o TPP que transporta cinco cargas negativas por molécula [10]. Na Figura 2.1, está apresentada a formulação das nano/micropartículas usando CH e TPP.

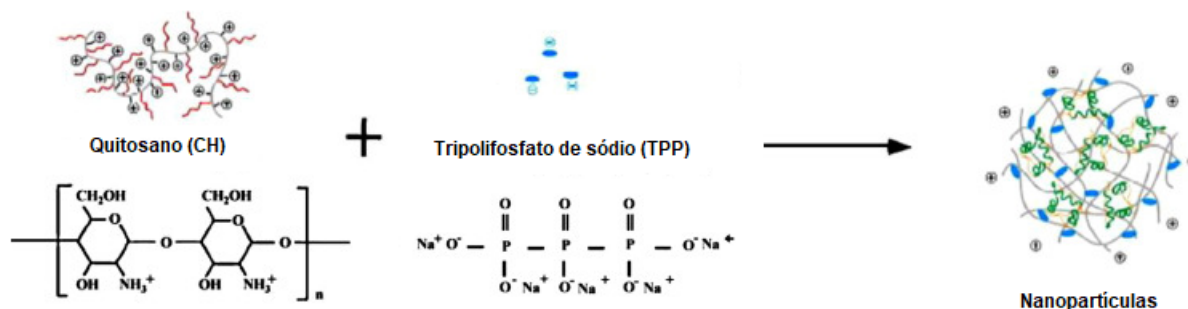


Figura 2.1 – Formulação de nanopartículas com CH e TPP [61].

O tamanho médio de uma partícula de CH/TPP depende de muitos parâmetros como a força

iônica, concentração de CH e TPP, procedimento de produção das partículas, temperatura, pH, relação entre CH e TPP e o número de agregação. O número de agregação, é o número de cadeias agregadas de CH, numa partícula de CH/TPP. A extensão da agregação aumenta com a concentração da solução de CH, logo aumenta as frequências de colisão entre as espécies agregantes. Portanto, concentrações mais altas de polímero, aumentam a polidispersidade (PI). Variar a concentração de CH, é uma maneira de ajustar o tamanho da partícula de CH/TPP [60].

Outro modo para controlar o tamanho das partículas é fazer variar a relação CH:TPP, que afeta a densidade das ligações CH/TPP. Este método é eficaz no ajuste do tamanho de partícula, mas tem efeitos drásticos sobre o rendimento destas [60].

No caso do PI, estudos relevam que o PI das partículas pode ser diminuída através da redução do peso molecular do CH. O PI também pode ser ajustada alterando-se as composições das misturas [60].

Através do método da coacervação, a solução de TPP é adicionada à solução de CH gota a gota e as partículas são formadas quando o CH e o TPP se misturam. Depois são recolhidas por métodos de centrifugação e secagem. Na Figura 2.2, pode-se observar o CH e nanopartículas de CH/TPP em SEM. É possível observar que o CH apresenta uma morfologia superficial semelhante a uma membrana, no entanto após a adição do TPP, as partículas formaram-se espontaneamente. Os tamanhos das partículas podem variar entre os 100 nm a poucos μm , de acordo com a concentração de CH e TPP, as massas e os métodos de secagem [10].

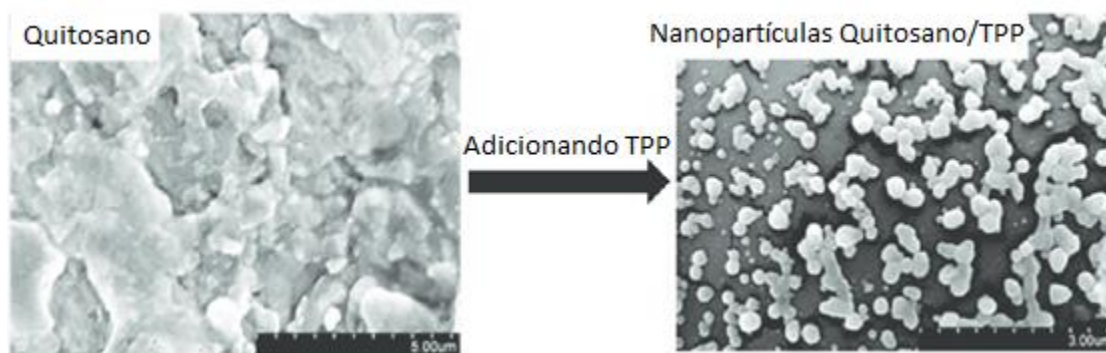


Figura 2.2 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento mostrando nanopartículas CH/TPP obtidas por adição de TPP [10].

2.1.2 Nanopartículas de CH/TPP/HA

As nanopartículas podem ser obtidas usando o CH que transporta uma carga positiva, o TPP que transporta cinco cargas negativas por molécula e o ácido hialurónico (HÁ) que transporta também carga negativa [10]. Na Figura 2.3, está apresentada a formulação das nanopartículas usando CH, TPP e HA.

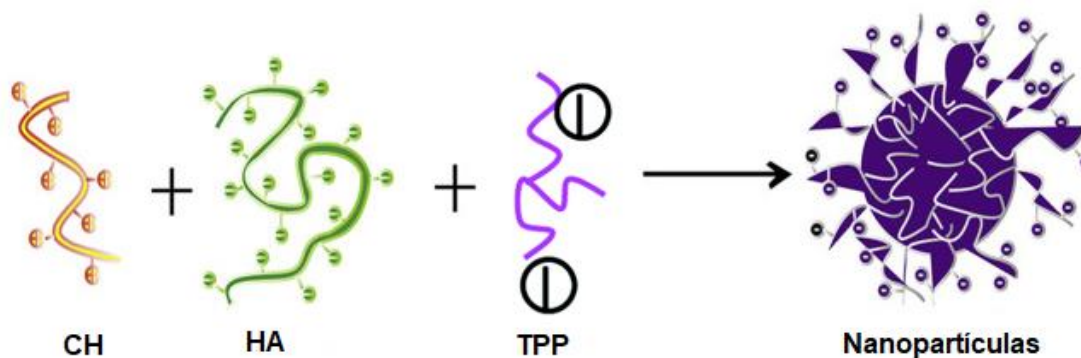


Figura 2.3 – Formulação de nanopartículas de CH/ TPP/ HA [43,44].

A ligação entre o CH e o HA ocorre através da interação entre os grupos amina (NH_3^+) ionizados do CH e os grupos carboxílicos (COO^-) ionizados do HA. No entanto as atrações electrostáticas só podem ocorrer quando os dois polímeros são ionizados simultaneamente [64].

As partículas de CH/TPP revestidas com HA tornam a superfície da partícula aniónica. As partículas de CH/HA carregadas positivamente exercem efeitos tóxicos sobre as células Caco-2, comparando-as com as partículas carregadas negativamente [65].

A adsorção de um polianião em nanopartículas carregadas positivamente pode resultar numa aglomeração e possivelmente floculação. Essa aglomeração pode ocorrer devido à ausência de estabilização electrostática durante os estados intermediários da adsorção. A aglomeração também depende da concentração e do tamanho das nanopartículas [66].

2.1.3 Nanopartículas de CH/CS

As nanopartículas podem ser obtidas usando o CH que transporta uma carga positiva e com o CS que transporta 2 a 3 cargas negativas por molécula, em função do grau de sulfatação da molécula.

A complexação entre o CH e o CS ocorre devido a fortes interações electrostáticas entre os grupos amino carregados com protões (NH_3^+) do CH, e dos grupos sulfato ($-\text{OSO}_3^-$) e carboxilo

($-COO^-$) do CS. O CS é altamente solúvel em água, enquanto que o CH necessita de ácidos inorgânicos ou orgânicos para solubilizar em água. Isto acontece por causa das forças de repulsão electrostática catiónica intramolecular [8].

As partículas CH/CS contêm redes poliméricas hidrofílicas que podem absorver muito mais água do que o seu próprio peso e funcionam como uma matriz ideal para aplicações biocompatíveis e para materiais bioativos ambientalmente sensíveis [67].

Com o aumento da concentração final de CH, numa relação de CH/CS fixa, existe tendência para um aumento do potencial Zeta. Este acontecimento pode ser explicado pela carga superficial positiva e pelo potencial Zeta crescente com o aumento do tamanho da partícula e pela área de superfície [67].

Na Figura 2.4, está apresentado a formulação das partículas de CH e CS.

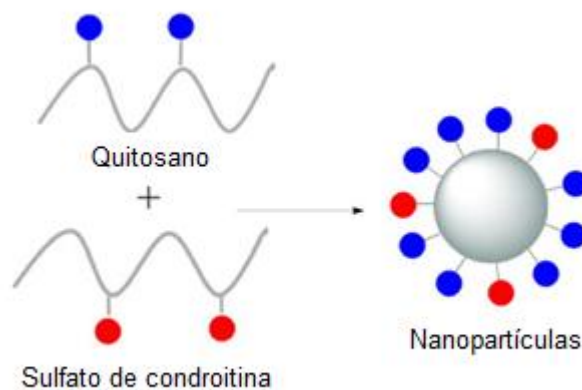


Figura 2.4 – Formulação de nanopartículas de CH/CS [68].

2.2 Nanopartículas em aplicações farmacêuticas e alimentares

Avanços significativos em biotecnologia e bioquímica levaram à descoberta de um grande número de moléculas bioativas. As nanopartículas poliméricas permitem encapsular moléculas bioativas e protegê-las contra a degradação enzimática e hidrolítica [49].

O quitosano é um biopolímero de interesse na área farmacêutica e alimentar, pois além de ser biocompatível e biodegradável tem a característica especial de aderir às superfícies das mucosas [69].

Existem na literatura alguns trabalhos, abaixo descritos, sobre aplicações das nanopartículas para a liberação controlada de fármacos e também na área alimentar como transportadores de hidrolisados de proteína, utilizando as proteínas, os polissacarídeos e os lípidos.

2.2.1 Aplicações farmacêuticas

A entrega controlada de um medicamento no local alvo é um problema importante no tratamento de muitas doenças. Uma aplicação convencional de medicamentos é caracterizada por eficácia limitada, baixa distribuição e falta de seletividade. Com isso, é necessário a administração de maiores doses de medicação do que o necessário, o que traz efeitos tóxicos [70]. Estas limitações podem ser superadas através de um controle na entrega do medicamento. Assim, os sistemas de liberação controlada de medicamentos transportam o fármaco para o local desejado e protegem-no da rápida degradação, logo, consegue-se reduzir a dose necessária de fármaco, pois este vai para o local onde deve atuar. Desta forma, os avanços científicos nesta área são importantes, havendo, no entanto ainda alguns problemas associados a estes [70].

Na Tabela 2.1, estão apresentados alguns trabalhos publicados, relativos aos sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tabela 2.1 – Trabalhos publicados na literatura científica, relativos aos sistemas de liberação controlada de fármacos em base de quitosano.

Tipo de estrutura dos sistemas de liberação controlada (SLC)	Sistema polimérico	Método de preparação	Agente bioativo libertado	Referência bibliográfica
Sistema de partículas (micropartículas)	Quitosano/ alginato	Modificação física reforçada com modificação química com genipina	Indometacina	[71]

	Quitosano/ sulfato de condroitina	Modificação química com glutaraldeído	Fluorouracil	[72]
	<i>N,O</i> – carboximetil quitosano/ alginato	Modificação física com iões Ca^{2+} Modificação química com genipina Modificação química com glutaraldeído	BSA	[73][74][72]
	Quitosano/ <i>N,N</i> dimetilacrilamida	Modificação química com glutaraldeído	Clorotiazida	[72]
	Quitosano	Modificação química com genipina	Claritromicina, tramadol e heparina BSA	[75][76]
	Quitosano	Modificação química com glutaraldeído	Insulina	[72]
	Quitosano/ TPP, PP	Modificação física	6-mercaptopurina	[77]
	Quitosano/ ácido fítico, TPP	Modificação física	Insulina	[78]
Sistemas de partículas (nanopartículas)	Quitosano/TPP	Modificação física	Leucovorin e 5-fluorouracil BSA ciclosporina A	[79-82]
	Quitosano	Modificação química com glutaraldeído	Conjugado dextranodoxorrubicina	[83]
	Quitosano/alginato	Modificação física	Nifedipina	[84]
	Quitosano/ alginato/ Pluronic	Modificação física	Curcumina	[85]
	Quitosano/ ciclodextrina	Modificação física	Glutaciona	[86]
	Quitosano	Precipitação	Gemcitabina	[87]
	Quitosano/ DNA	Modificação física com TPP	DNA	[88-89]

* TPP – tripolifosfato de sódio; PP – polifosfato; BSA - albumina de soro bovino; DNA - ácido desoxirribonucleico.

2.2.2 Aplicações alimentares

As proteínas bioativas exibem um amplo espectro de atividades biológicas, o que as torna interessantes para aplicação em alimentos. Certos péptidos têm forte atividade antimicrobiana, logo podem ser utilizados como agentes terapêuticos. As proteínas bioativas têm que ser encapsuladas de modo a protegê-las durante a ingestão, mas depois liberta-las no local

apropriado. Foram desenvolvidos diferentes técnicas para encapsular as proteínas bioativas, mas cada sistema tem as suas vantagens e desvantagens. A seleção do método mais eficaz para o encapsulamento destas proteínas depende, de inúmeros fatores. No entanto, existe uma série de desafios técnicos importantes que precisam de ser superados antes que estas proteínas bioativas possam ser administradas com sucesso através da via oral [28].

Na Tabela 2.2, apresenta-se alguns métodos testados para o encapsulamento de péptidos, utilizando as proteínas, os polissacarídeos e os lípidos como transporte.

Tabela 2.2 – Encapsulamento de hidrolisados de proteína de alimentos e péptidos, com a utilização de transportadores de proteínas, polissacáridos e lípidos.

Matriz	Hidrolisado/ péptidos	Metodologia	Referência	
Proteica	SPI	HC	SPI e HC foram pré-dissolvidos misturados e homogeneizados, secos por pulverização	[90]
	SPI + pectina	HC	Coacervação: o HC aquoso foi emulsionado em óleo de soja para formar emulsão, seguida por emulsificação em SPI. A pectina foi lentamente adicionada a emulsão.	[91]
	SPI + gelatina	HC	SPI disperso em água, misturado com gelatina e homogeneizado com CH, seguido por secagem por pulverização	[92]
	WPC e WPC + alginato de sódio	Hidrolisado de WPC	Hidrolisado de WPC adicionado sob agitação até ser dissolvido e seco por pulverização; liofilizado ou misturado mecanicamente	[93]
	RPI	Péptidos de colza	Adição dos péptidos ao RPI pré-dissolvido e secagem por pulverização da mistura.	[94]
	WPI	Phe-Trp Leu-Trp-Met-Arg-Phe	Os péptidos foram misturados com microesferas WPI e agitadas durante 24 h	[95] [96]
Polissacarídeo	MD + goma-arábica	Hidrolisado de frango	MD e goma-arábica diretamente adicionados ao hidrolisado e, em seguida, secos por pulverização	[15]
	MD	HD	MD e HC pré-dissolvidos misturados e homogeneizados, seguidos por secagem por pulverização	[15]
	Goma carboximetilada + alginato de sódio	Hidrolisado de <i>Phaseolus lunatus</i>	A goma e o hidrolisado foram deixados numa solução de CaCl ₂ para formar contas	[97]

	Goma-arábica	HD	Solução aquosa de goma e HC preparada seguida de secagem por pulverização	[98]
	MD + ciclodextrina	Hidrolisado de proteína de soro de leite	MD e CD foram separadamente dispersos em água e misturados em conjunto com o hidrolisado, evaporados rotativamente e secos por pulverização	[99]
	Quitosano	Polipéptido (<i>Spirulina platensis</i>)	Gelificação inotrópica: O quitosano foi dissolvido em ácido acético, centrifugado e a solução de polipeptídica foi adicionada. O TPP adicionado e agitado por 60 min e seco na estufa	[100]
Lipossomas	PC	<i>Micropogonias furnieri</i> (peixe) hidrolisado	PC dissolvido em solvente orgânico e evaporado, seguido de hidratação com o hidrolisado. Aquecimento, agitação, sonicação em ciclos	[101]
	PC	Péptido de colagénio	PC dissolvido em solvente orgânico e evaporado seguido de hidratação com o hidrolisado. Encapsulamento por sonicação	[102]
	PC + PG + colesterol	HC	PC dissolvido em solvente orgânico e evaporado seguido de hidratação. Encapsulamento por sonicação	[103]
	Lecitina	HC	Encapsulamento por agitação e sonicação	[104]
Liposfera	Ácido esteárico + PC	HC	Adicionou-se HC ao ácido esteárico, seguido da adição de PC pré-dissolvido em tampão. A mistura foi homogeneizada para formar uma emulsão	[103][105][106]
	Ácido esteárico + manteiga de cupuaçu	HC	A fase lipídica fundida (80% de ácido esteárico + 20% de manteiga de cupuaçu) foi misturada com 4% de polissorbato, com agitação seguida de arrefecimento do sistema de emulsão	[15]

* SPI – hidrolisado de soja; HC – hidrolisado de caseína; WPC – hidrolisado de soro de leite; RPI – isolado de proteína de couve-nabiça; WPI – isolado de proteína de soro de leite; MD – maltodextrina; PC – fosfatidilcolina; PG – fosfatidil-glicina.

3. Parte experimental

Neste capítulo apresenta-se a metodologia utilizada para a realização do trabalho. No capítulo 3.1 são apresentados os reagentes/soluções utilizados ao longo do trabalho e no capítulo 3.2 são descritos os métodos seguidos para a caracterização físico-química e funcional das partículas, a otimização da eficiência de encapsulação do péptido saciante de soja (PSS), o estudo da estabilidade das nanopartículas, o estudo da permeabilidade do PSS em cultura celular, a avaliação da toxicidade em células Caco-2 e o estudo do efeito do encapsulamento na estabilidade do PSS em condições gastrointestinais *in vitro*.

3.1 Reagentes/Soluções

3.1.1 Síntese de partículas

O CH α com peso molecular = 50 – 190 kDa e grau de desacetilação = 75 – 85% foi obtida Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

O CH β com peso molecular = 655 kDa e grau de desacetilação = 85% foi obtido a partir de pernas de lulas (*Illex argentinus*) preparada de acordo com o artigo [107].

O HA foi obtido através da fermentação do *Streptococcus zooepidemicus* e preparado de acordo com o artigo [108].

O CS com peso molecular = 45 kDa e PI = 1,33, foi obtido a partir dos resíduos da *Scyliorhinus canicula* e preparado de acordo com o artigo [109].

O ácido acético e o ácido clorídrico foram obtidos na ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). O hidróxido de sódio foi obtido na empresa José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Odivelas, Portugal).

3.1.2 Caracterização das partículas e ensaios de mucoadesividade

O acetato de uranilo a 4% utilizado no SEM, foi obtido na Delta Microscopies (Mauressac, França).

As mucinas de estômago de porco tipo II e o reagente de Schiff foram obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O etanol foi obtido na Honeyweel (Morris Plains, Nova Jersey, EUA). O detergente de cuvetes foi obtido na Hellma Analytics). O ácido periódico foi obtido na Merck Milipore (Burlington, Massachusetts, EUA).

3.1.3 Otimização da eficiência de encapsulação do PSS

O péptido saciente de soja (PSS) com a sequência de aminoácido: EITPEKNPQLR foi obtido através da Chinapeptide (China), com um grau de pureza de 99%. O ácido trifluoroacético (TFA) foi obtido na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A solução de acetonitrilo (ACN) foi obtida na VWR International (Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.1.4 Ensaios de cultura celular

A solução de Hanks' Balance Salt (HBSS) foi obtida na Merck Milipore (Burlington, Massachusetts, EUA). O glicerol foi obtido pela ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). As células Caco-2 foram obtidas na American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virgínia, EUA). O *Minimum Essencial Medium* (MEM) foi obtido na Biowest (Missouri, USA). O soro fetal bovino (PBS), os aminoácidos não essenciais, a tripsina-EDTA e a penicilina foram obtidos na Merck Milipore (Alemanha). O piruvato de sódio, e o demetilsulfóxido (DMSO) preparado a 40% em meio de cultura, foram obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e a resazurina foram obtidos na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O isopropanol foi obtido na Honeyweel (Morris Plains, Nova Jersey, EUA).

O triton x-100 foi adquirido na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

O paraformaldeído (PFA) a 4%, a faloidina-tetrametil-rodamina B, e o fluoroshield foi obtido na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), foi obtido na Invitrogen (Califórnia, EUA) .

3.1.5 Estudos de digestão simulada *in vitro* em sistema estático

O cloreto de potássio, fosfato monopotássico, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de magnésio hexaidratado, carbonato de amônio, cloreto de cálcio dihidratado, pepsina, bile e a pancreatina foram obtidas na Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A lecitina foi obtida na Solegraells Guzmán (Barcelona, Espanha.).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese das nanopartículas

A síntese das nanopartículas foi efetuada através do método da coacervação, que consiste na separação em duas fases líquidas em sistemas coloidais. Este método dá origem a duas fases, uma rica em polímero e outra deficitária em polímero. As soluções de CH foram preparadas usando ácido acético 1% (v/v), com o posterior acerto do pH a 5, com NaOH a 1

mol/L. A solução de TPP foi preparada em água ultrapura e posterior acerto do pH a 7, com HCl a 1 mol/L. O HA e o CS foram preparados com água ultrapura e posterior acerto do pH a 7, usando HCl e NaOH a 1 mol/L, respetivamente.

Síntese das nanopartículas de CH/TPP

A solução de CH (com volumes de 20 mL e concentrações de CH α -1,2 mg/mL; CH β - 1,2 e 0,6 mg/mL) foi colocada sob contínua agitação a 600 rpm, à temperatura ambiente. A solução de TPP (com volumes de 4 mL e concentrações de 1,2; 1,5; 2 e 3 mg/mL) foi adicionada lentamente através de uma bomba e uma seringa (a uma taxa de 0,2 mL/min) à solução de CH, formando assim partículas de CH/TPP. As nanopartículas foram formadas em razões de massa CH/TPP de (2:1; 3:1; 5:1). A solução final foi mantida em agitação a 200 rpm durante 30 minutos para estabilização do sistema.

Síntese das nanopartículas de CH/TPP/HA

As soluções de TPP (com volumes de 0,67 mL e concentrações de 0,5 e 1 mg/mL) e HA (com volumes de 2 mL e concentrações de 1 e 2 mg/mL) foram misturadas e colocadas sob agitação contínua a 1200 rpm, à temperatura ambiente. A solução de CH (com volumes de 1,33 mL e concentrações de CH α e β de 0,5 e 1 mg/mL) foi adicionada rapidamente através de uma pipeta automática à solução de TPP/HA, formando as partículas CH/TPP/HA. As nanopartículas foram formadas em razões de massa CH/HA de (1:3), a diferentes concentrações de CH, TPP e HA. A solução final foi mantida em agitação a 200 rpm durante 30 minutos para estabilização do sistema.

Síntese das nanopartículas de CH/CS

A solução de CH (com volumes de 2 mL e concentrações de 0,5 e 1 mg/mL) foi colocada sob agitação contínua a 1200 rpm, à temperatura ambiente. A solução de CS (com volumes de 2 mL e concentrações de 0,5 mg/mL) foi adicionada rapidamente através de uma pipeta automática à solução de CH, formando as partículas CH/CS. As nanopartículas foram formadas em razões de massa CH/CS de (1:1; 2:1). A solução final foi mantida em agitação a 200 rpm durante 30 minutos para estabilização do sistema.

3.2.2 Caracterização físico-química das partículas

Dentro da caracterização físico-química das partículas encontra-se a análise do tamanho carga e índice de polidispersão (PI) e as propriedades mucoadesivas mediante o estudo da interação das nanopartículas com as mucinas através do método da microbalança de quartzo (QCM) e outros métodos de quantificação.

3.2.2.1 Análise do tamanho, carga superficial e índice de polidispersão (PI)

As análises do tamanho, PI e potencial Zeta das partículas produzidas foram realizadas através do Dynamic Light Scattering (HORIBA, SZ-100), a 25°C, com um ângulo de detecção de 173°. Para o tamanho da partícula e o PI, foi utilizada uma cuvette de faces transparentes e para o potencial Zeta foi utilizada uma célula descartável de amostras aquosas ($V=100 \mu\text{L}$). O experimento inicia-se com a adição da solução de partículas à cuvette e a sua colocação no DLS. Todas as amostras foram medidas cinco vezes. Os resultados obtidos foram analisados com o *software* do DLS.

3.2.2.2 Análise de morfologia mediante *microscopia eletrônica de varrimento* (SEM)

As imagens das nanopartículas foram obtidas por microscopia eletrônica de varrimento, SEM, utilizando um FEI Quanta 650 FEG Environmental SEM. Para isso, as nanopartículas foram sintetizadas e diluídas (5x) em água ultrapura. De seguida, uma gota da amostra foi colocada numa placa de silício de 10 x 10 mm e secas durante 12h à temperatura ambiente numa câmara fechada. Para aumentar o contraste, as amostras foram coradas com acetato de uralino a 4%, seguindo as instruções do fabricante. As imagens foram adquiridas a uma tensão de 3,0 kV usando um detetor para elétrons secundários (Everhart-Thornley Detector, ETD).

3.2.2.3 Avaliação das propriedades mucoadesivas das nanopartículas

As propriedades mucoadesivas das nanopartículas foram quantificadas mediante avaliação da adesão das mucinas à superfície das nanopartículas. A quantificação desta interação realizou-se utilizando uma microbalança de quartzo (QCM), avaliando as diferenças na frequência de vibração de um cristal de quartzo revestido de ouro na presença de nanopartículas. Complementarmente, realizaram-se ensaios para quantificar esta interação baseados na medição do tamanho e potencial Zeta das nanopartículas, mediante ensaio colorimétrico e utilizando medições de transmitância.

3.2.2.3.1 Método da microbalança de quartzo (QCM)

Preparação dos sensores QCM

Os sensores de QCM revestidos de ouro foram limpos antes e depois do seu uso, através da sua imersão numa solução com o detergente de cuvetes diluído em água ultrapura, numa proporção de 1,5% (v/v), durante 30 minutos a 60°C. Este procedimento foi repetido duas vezes, com limpeza de água e etanol depois de cada imersão na mistura.

Ensaio com QCM

Os ensaios foram realizados utilizando o instrumento *openQCM* (Novaetech, UK). As características do equipamento são:

- Frequência padrão: 10 MHz;
- Material do elétrodo: Ouro, com substrato de titânio.

Todos as experiências foram conduzidos à temperatura ambiente e seguiram-se as seguintes etapas: 1) Inicialmente foi injetada água ao sistema de modo a verificar uma frequência ($\Delta f < 2$ Hz) a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. 2) Após a estabilização do sistema, o fluxo foi diminuído para 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ até que o sistema estabiliza-se novamente. 3) Foi introduzida a solução de mucinas até que o sinal f estabiliza-se. 4) Posteriormente, o cristal foi lavado com água, durante 10 minutos com o objetivo de remover as mucinas que não ficaram ligadas. A solução de mucinas foi preparada todas as semanas numa concentração de 0,3 mg/L em água ultrapura e filtrada através de um filtro de 5 μm . 5) Após a remoção das mucinas não ligadas, procedeu-se à injeção da solução de nanopartículas até que o sinal ficasse estabilizado. 6) Por fim, as partículas não ligadas foram removidas utilizando água durante 10 minutos.

Os resultados obtidos foram analisados com o *software* Mathematica (Wolfram Research, Inc., Mathematica, Versão 10.1, Champaign, IL, USA, 2015).

Todas as partículas foram testadas duas vezes empregando a mesma concentração de polímero total (0,3 mg/mL).

Para iniciar as avaliações seguintes de adesão das mucinas, as amostras passaram por um procedimento inicial: nanopartículas (0,3 mg/mL) foram misturadas numa proporção 1/1 (v/v) com mucinas a 0,6 mg/mL e incubadas a (37°C durante 3h a 300 rpm).

3.2.2.3.2 Avaliação da adesão das mucinas via tamanho das partículas e potencial Zeta

Este método foi realizado de acordo com a publicação [57]. Inicialmente mediu-se o tamanho e o potencial Zeta das nanopartículas e das mucinas, separadamente. No final da incubação acima descrita, o tamanho das partículas e o potencial Zeta dos sistemas “nanopartículas + mucinas” foram medidos novamente.

3.2.2.3.3 Avaliação da adesão das mucinas via ensaio colorimétrico

Inicialmente as soluções depois de incubadas foram colocadas a centrifugar a 10.000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente 25 µL de amostra (sobrenadante resultante da centrifugação) foi colocado em cada poço de uma microplaca, seguido da colocação de 120 µL de ácido periódico 0,06% (v/v) em ácido acético 7% (v/v). A microplaca é tapada e incubada a 37°C durante 1,5 horas. Depois de arrefecida, são adicionados 100 µL do reagente de Schiff, e a microplaca é colocada em agitação durante 5 minutos seguido de 25 minutos de repouso. A leitura das absorvâncias é realizada a 550 nm [58].

Neste método, foi realizada uma reta de calibração com as mucinas às concentrações de: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,05 mg/mL.

3.2.2.3.4 Avaliação da adesão das mucinas via medição da transmitância

Depois de incubados os sistemas “nanopartículas + mucinas” foram colocados em poços de uma microplaca. A transmitância das soluções foi medida a 500 nm. Calculou-se a razão entre a transmitância da amostra e das mucinas [59]:

$$\%T/T_0 = \frac{\%T}{T_{\text{mucinas}}} * 100 \text{ (Equação 1)}$$

Em que:

%T – Percentagem da transmitância das “nanopartículas + mucinas”;

T_{mucinas} - Transmitância das mucinas.

3.2.3 Caracterização funcional das partículas otimizadas

A caracterização funcional das nanopartículas foi realizada através de um conjunto de métodos, otimização da eficiência de encapsulação do PSS, estudo da estabilidade das nanopartículas, estudo da permeabilidade do PSS em cultura celulares e avaliação da citotoxicidade usando células Caco-2.

Para os estudos a seguir, selecionou-se uma das formulações das partículas avaliadas. A escolha da síntese foi realizada a partir dos resultados de mucoadesividade. Assim, a síntese de partículas escolhida foi a CH β (0,5 mg/mL)/ TPP (0,5 mg/mL)/ HA (1,0 mg/mL).

3.2.3.1 Otimização da eficiência de encapsulação do PSS

Encapsulação do PSS

A análise da encapsulação do PSS foi realizada por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), utilizando o sistema Agilent Technologies 1200 infinity, equipado com uma coluna Phenomenex (Aeris™ 3,6 μ m PEPTIDE XB-C18 (150 x 2,1 mm)). Esta técnica permite separar e determinar espécies numa variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Nesta cromatografia, a fase móvel é um solvente líquido que contém a amostra com uma mistura de solutos [110].

As fases móveis utilizadas foram HPLC: A) H₂O + TFA 0,1% (v/v) e B) ACN + TFA 0,1% (v/v), previamente filtradas (0,45 μ m). Para a quantificação do PSS utilizou-se um método de separação em gradiente, com a seguinte sequência: incremento de 12-29% de B durante 6 min, 29% de B durante 2 min e 29-12% de B durante 2 min, previamente otimizado. O fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min, sendo o tempo de retenção do PSS de 4,9 min. O volume de injeção foi de 50 μ L e o comprimento de onda de detecção foi de 220 nm.

Para otimizar a eficiência de encapsulação testaram-se diferentes concentrações de PSS: 10, 20, 50, 100 e 200 mg/L. Para isso, no meio de síntese adicionou-se um volume de 100 μ L de soluções de stock para atingir as concentrações finais referidas. Depois da síntese, o PSS não encapsulado foi separado mediante centrifugação a 1000 rpm, durante 45 min, de forma a retirar o sobrenadante que continha o PSS livre. O sobrenadante foi filtrado (PES, 0,22 μ m) e analisado por HPLC. O PSS encapsulado foi calculado de acordo com:

$$\%PSS_{\text{nanoencapsulado}} = \left(\frac{PSS_{\text{total}} - PSS_{\text{livre}}}{PSS_{\text{total}}} \right) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

3.2.3.2 Estudo da estabilidade das nanopartículas

O estudo da estabilidade das nanopartículas foi realizado através da análise do tamanho e do PI das partículas, ao longo do tempo, no DLS (HORIBA, SZ-100), a 25°C. O ensaio foi executado com a síntese de nanopartículas, que foi escolhida através dos ensaios de mucoadesividade. Foram analisadas, as partículas, o PSS nanoencapsulado e as partículas diluídas em água. Nas duas primeiras a análise é efetuada ao longo de oito dias, enquanto que a última é analisada durante nove dias.

3.2.3.3 Estudo da permeabilidade em células Caco-2 + HT29-MTX

O estudo da permeabilidade intestinal do PSS (livre e encapsulado) foi realizado em linhas de células do epitélio intestinal humano (Caco-2 + HT29-MTX). Foi também realizado um ensaio controlo usando PSS livre em *transwells* sem células para verificar se o PSS livre passava a membrana.

O estudo da permeabilidade foi realizado com PSS livre a uma concentração de 50 mg/L e no caso do PSS nanoencapsulado foi usada uma concentração inicial de PSS de 100 mg/L. Para isso foi necessário retirar o PSS não encapsulado após o processo de encapsulação por centrifugação. Após o processo de encapsulamento a mistura foi colocada em eppendorf's de 1,5 mL, contendo 10 a 15 µL de glicerol (para que o pellet formado seja mais fácil de ressuspender). Centrifugou-se durante 40 minutos a 13300 rpm. Depois da centrifugação retirou-se o sobrenadante (PSS livre) e adicionou-se 1 mL de HBSS nos eppendorf's. As soluções finais foram filtradas através de um filtro de seringa PES 0,45 µm, em ambiente estéril.

As amostras para aplicação nas células foram: a) PSS diluído em tampão HBSS até uma concentração de 50 mg/L e filtrado através de um filtro de seringa (PES de 0,22 µm), em ambiente estéril e b) PSS nanoencapsulado e filtrado através de um filtro de seringa (PES de 0,45 µm), em ambiente.

As células Caco-2 foram cultivadas em *transwell* (Figura 3.1) colocadas numa placa de 12 poços a 37°C em ar humidificado com 5% de dióxido de carbono (CO₂) em meio de cultura até 21 dias para diferenciação. O meio de cultura, Minimum Essential Medium (MEM) foi suplementado com 20% de soro fetal bovino, 0,11 g/L de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de penicilina/ estreptomicina. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias e a TEER (resistência elétrica transepitelial) medida a cada troca de meio.

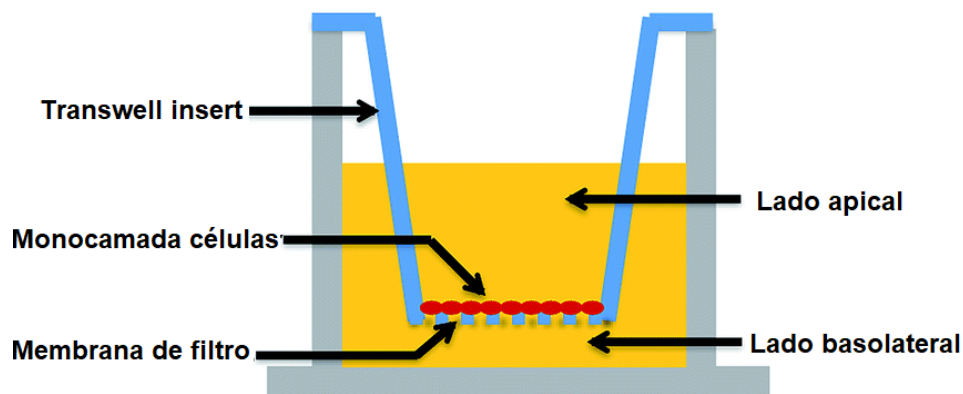


Figura 3.1 – Representação *in vitro* utilizado na determinação da permeabilidade intestinal [111].

O ensaio de permeabilidade foi iniciado com três lavagens dos *inserts* (lado apical e lado basolateral), usando HBSS pré-aquecido. De seguida foi colocado 1,5 mL no lado basolateral e 0,5 mL no lado apical de HBSS, pré-aquecido, e a placa foi incubada por 15 min, a 37°C e 100 rpm (agitador orbital de bancada). A TEER foi medida de seguida (0h – início do ensaio). Os 500 µL de HBSS do lado apical foram retirados e substituídos por 500 µL de amostra a testar. A placa foi colocada a incubar a 37°C e 100 rpm. O ensaio foi realizado durante 4h, em que a cada hora foi medida a TEER e retirada 200 µL de amostra no lado basolateral e foi repostos 200 µL de HBSS pré-aquecido no mesmo lado.

Após ler a última TEER (após 4h de ensaio), foram recolhidos separadamente os lados apical e basolateral. Posteriormente os *inserts* foram lavados três vezes com HBSS, usando 1 mL no lado basolateral e 0,5 mL no lado apical. De seguida foi colocado 1,5 mL de HBSS no lado basolateral e 0,5 mL no lado apical, e a placa foi incubada durante 15 min, a 37°C e 100 rpm e a TEER foi medida. Depois, todo o HBSS foi retirado adicionado 200 µL de triton 1% (v/v preparado com HBSS) para lisar as células e a placa foi incubada por 5 min, a 37°C e 100 rpm. Foi adicionado mais 300 µL de HBSS a cada *insert* e foi tudo recolhido para um falcon que foi posteriormente centrifugado a 1080 rpm, durante 10 min. Os sobrenadantes foram recolhidos para análise no HPLC, de acordo com o capítulo 3.4.1.

O ensaio sem células, iniciou-se com a colocação de 1,5 mL de HBSS em cada poço da placa de 12 poços. Seguidamente foi colocado o *insert* e 500 µL do PSS em cada *insert*. A placa é colocada a incubar a 37°C e 100 rpm durante 4 horas. A cada hora foi retirado 200 µL do lado basolateral para análise posterior no HPLC e repostos a mesma quantidade de HBSS.

Para quantificar a massa de PSS acumulado ao longo do tempo, utilizou-se a equação:

$$\%PSS_{\text{basolateral}} = \frac{(Massa_{PSS})_{t=x}}{(Massa_{PSS})_{t=0}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

$(Massa_{PSS})_{t=x}$ = Massa de PSS no lado basolateral ao tempo de ensaio x (1, 2, 3 e 4h);

$(Massa_{PSS})_{t=0}$ = Massa de PSS no lado basolateral ao início do ensaio.

A percentagem (%) de PSS na basolateral, para os tempos 2, 3 e 4 foi calculado acumulativamente, sendo a soma do resultado da Equação 3 correspondente a cada tempo e o resultado da massa tirada no tempo anterior.

3.2.3.4 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com três tipos de amostras: PSS livre a 50 mg/L, nanopartículas e PSS nanoencapsulado a 50 mg/mL.

O MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para a avaliação da proliferação celular e consequentemente da citotoxicidade *in vitro*. O número de células viáveis pode ser inferido pela quantificação da absorvância após incubação das células com o composto. Isto acontece porque o anel tretazole, sofre uma redução enzimática dentro das células viáveis transformando-o num o sal que precipita em cristais de cor azul (formazan) e que são solúveis em isopropanol [107,108].

A resazurina é um indicador de oxidação-redução usado para avaliar o crescimento celular. É um corante azul não fluorescente e não tóxico que se torna rosa e fluorescente quando é reduzido a resorufina por oxidoreductases presentes em células vivas [118].

Para avaliar a citotoxicidade das nanopartículas, foi necessário fazer uma separação do polímero livre das restantes nanopartículas e no caso do PSS nanoencapsulado fazer a separação do PSS livre. Esta separação está explicada no capítulo anterior 3.2.3.3.

As células foram cultivadas em MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio e 1% de penicilina/ estreptomina. Seguidamente as células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em frascos de 75 cm². As células confluentes foram destacadas com uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% e depois precipitadas por centrifugação a 1080 rpm durante 5 min e ressuspensas em meio de cultura a uma concentração de 1x10⁵ células/mL. As células foram semeadas em placas de 96 poços, 100 µL/poço para uma concentração final de 1x10⁴ células/poço e deixadas a aderir, de um dia para o outro, a uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C.

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, foram realizados dois tipos de ensaios para determinar a viabilidade celular após diferentes tempos de contacto (4 e 24h) com as amostras: o ensaio de MTT (quantificação por absorvância e o ensaio com resazurina (quantificação por fluorescência). Após a adesão retirou-se todo o meio de cultura e adicionou-se 200 μ L de amostra (PSS livre, partículas e PSS nanoencapsulado) preparadas em água destilada e diluídas em meio de cultura (10% v/v) e ficaram em contato durante 4 e 24 h. Foi realizado um controlo negativo, utilizando as células em crescimento no meio de cultura MEM com 10% (v/v) de água destilada (considerada como 100% de viabilidade celular) e um controlo positivo de morte celular, usando 40% (%v/v) de DMSO. Na Figura 3.2, pode observar-se a microplaca com os poços utilizados no ensaio.

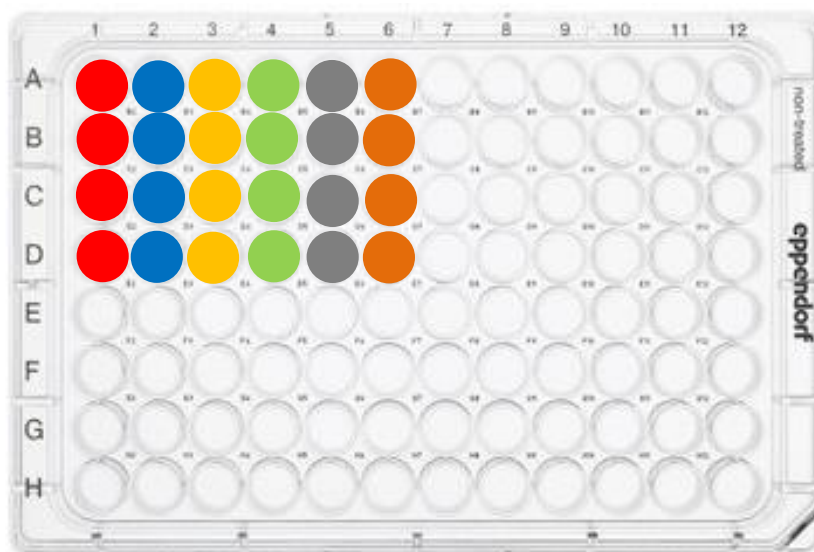


Figura 3.2 – Microplaca de 96 poços com os poços utilizados no ensaio. 1 – 40% DMSO; 2 – Meio de cultura (MEM); 3 – 10% H₂O; 4 – PSS 50 mg/L; 5 – Nanopartículas; 6 – PSS nanoencapsulado 50 mg/L.

No ensaio de resazurina:

Para 4 e 24h foram adicionados 20 μ L de solução de resazurina (0,15 mg/mL em PBS) a cada poço (concentração final de 0,015 mg/mL) e a placa foi incubada por 4h. Para medir a intensidade da fluorescência que é proporcional ao número de células viáveis foi utilizado um leitor de fluorescência de microplacas (Synergy, Biotek H 1, EUA), lendo a intensidade de fluorescência a um comprimento de onda (λ) de excitação de 560 nm e um λ de emissão de 590 nm.

A percentagem de viabilidade celular foi expressa como a percentagem de fluorescência nas células tratadas com as amostras, em relação à percentagem de fluorescência das células que cresceram no meio de cultura com 10% (v/v) de água destilada (controlo negativo).

No ensaio de MTT:

Foram retiradas as soluções dos poços para os tempos de incubação 4 e 24h e foram adicionados 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS) a cada poço e a placa foi incubada por 2,5h. Depois da incubação a solução de MTT foi removida e os cristais de MTT-formazan foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol. A absorvância foi medida a 570 e 690 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy, Biotek H 1, EUA). A percentagem de viabilidade celular foi expressa como a percentagem de fluorescência das células tratadas com as amostras, em relação à percentagem de fluorescência das células que cresceram no meio de cultura com 10% (v/v) de água destilada (controlo negativo).

3.2.3.5 Estudo da internalização das partículas

As nanopartículas foram incubadas com células Caco-2/HT29-MTX (proporção 9:1) diferenciadas. Uma vez diferenciadas (após 21 dias em cultura), as células foram lavadas com PBS pré-aquecido, fixadas com PFA a 4% por 30 min, lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% (v/v), lavadas novamente com PBS e incubadas com isotiocianato de faloidina-tetrametil-rodamina B por 1h. Após a lavagem com PBS, e DAPI (200 ng/mL) foi adicionado e incubado durante mais 30 min e após lavagem, as células foram cobertas com Fluoroshield e observadas usando um microscópio invertido Carls Zeiss no sistema confocal LSM 780 (Software: Zen 2010).

3.2.4 Estudo *in vitro* do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais

Neste estudo foi avaliado o efeito do encapsulamento nas várias fases de digestão: oral, gástrica e intestinal. Os ensaios foram realizados para o PSS livre a 50 mg/L e o PSS nanoencapsulado na mesma concentração. Foram realizadas três réplicas para cada amostra e um controlo (sem amostra). Neste estudo foram utilizados fluidos simulantes: salivar (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF), preparados de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Fluidos simulantes usados no processo de digestão *in vitro*.

Soluções	Concentração		SSF (pH=7)		SGF (pH=3)		SIF (pH=7)	
	g/L	mol/L	V _{adicionado}	sal _{final}	V _{adicionado}	sal _{final}	V _{adicionado}	sal _{final}
			mL	mol/L	mL	mol/L	mL	mol/L
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1,0	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	-	-	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,15	0,4	0,12	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	-	-
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1	0,5	-	1,5	-	0,15	-	0,6
HCl	-	6	0,09	1,1	1,3	15,6	0,7	8,4

Foram adicionados cerca de 350 mL de água ultrapura às soluções e o pH ajustado com (NaOH ou HCl a 1M) e o volume acertado para 400 mL.

Fase oral (condições: pH=7, T=37°C; t=10 min):

Num falcon de 50 mL foi colocado 5,0 mL de amostra, 4,0 mL de SSF, 25,0 µL de CaCl₂ (0,3M) e 975,0 µL de água ultrapura.

Fase gástrica (condições: pH=3, T=37°C, t=2h):

Adicionou-se 7,5 mL de SGF com 1% de lecitina, 1,6 mL de pepsina (preparada a 1% (m/v) em SGF), 5,0 µL de CaCl₂ (0,3M), 0,2 mL de HCl (1M) e 695,0 µL de água ultrapura. Acertou-se o pH a 3.

Fase intestinal (condições: pH=7, T=37°C, t=2h):

Adicionou-se 11,0 mL de SIF, 5,0 mL de pancreatina (preparada a 7% (m/v) em SIF), 2,5 mL de bile (preparada a 4% (m/v) em SIF), 40,0 µL de CaCl₂ (0,3M), 150,0 µL de NaOH (1M) e 1,31 mL de água ultrapura. Acertou-se o pH a 7.

No final de cada fase foram retiradas duas amostras de 1,0 mL de cada réplica e foram colocadas em gelo durante 5 min. Posteriormente as duas amostras foram centrifugadas a 13300 rpm, durante 10 min, Os sobrenadantes foram retirados e analisados por HPLC.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados experimentais obtidos. Os que correspondem à caracterização físico-química das partículas encontram-se no subcapítulo 4.1, onde foi selecionada a síntese de nanopartículas mais mucoadesiva. No subcapítulo 4.1 encontram-se os resultados da caracterização funcional das partículas otimizadas, em que foram estudados a eficiência de encapsulação do PSS (onde foi selecionada a concentração ótima de péptido para encapsular), a estabilidade das partículas, e permeabilidade do PSS e a avaliação da citotoxicidade. Por fim, no subcapítulo 4.1, apresentam-se os resultados da estabilidade do PSS na digestão *in vitro*.

4.1 Caracterização físico-química das partículas

Neste subcapítulo pretende-se efetuar uma análise às características das partículas sintetizadas. Os parâmetros a discutir neste subcapítulo foram o tamanho, PI, potencial Zeta, carga e a mucoadesividade.

4.1.1 Tamanho, carga superficial e índice de polidispersão (PI)

Foram preparadas partículas de três tipos: CH/TPP, CH/TPP/HA e CH/CS. Para cada um dos tipos de partículas, foi avaliada a produção empregando CH em a forma molecular α (CH α) e β (CH β). A análise do tamanho, PI e carga superficial das partículas foi efetuada mediante DLS. Para todas as tipologias de partículas, foram realizados vários ensaios com diferentes concentrações e relações em massa dos polímeros e TPP. A relação em massa é um parâmetro muito importante para a formação de nanopartículas, uma vez que afeta a eficiência de reticulação entre os distintos componentes.

Na Tabela 4.1 apresentam-se as concentrações (mg/mL) do CH e do TPP, a relação CH/TPP (m/m), as médias e os desvios das análises das partículas CH/TPP. Todos os resultados das análises destas partículas estão apresentados na Figura 4.1 do Anexo A.

Tabela 4.1 – Concentração (mg/mL), relação CH/TPP (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/TPP.

Amostras	Concentração (mg/mL)		Relação CH/TPP (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	TPP				

CHαTPP₁	1,2	1,2	5	182,9 \pm 71,0	0,382 \pm 0,08	21,1 \pm 1,0
CHαTPP₂	1,2	2,0	3	178,5 \pm 20,4	0,952 \pm 0,04	13,1 \pm 2,4
CHαTPP₃	1,2	3,0	2	340,0 \pm 53,6	0,256 \pm 0,03	18,5 \pm 5,6
CHβTPP₄	1,2	1,2	5	328,4 \pm 17,9	1,283 \pm 0,18	-
CHβTPP₅	1,2	2,0	3	315,1 \pm 1,34	0,445 \pm 0,01	17,5 \pm 3,4
CHβTPP₆	0,6	1,5	2	300,9 \pm 9,48	0,364 \pm 0,05	18,05 \pm 1,4

O tamanho das partículas variou entre cerca de 178 nm e 340 nm. Com o CH α , os menores tamanhos (próximos a 180 nm) foram obtidos com as maiores razões CH/TPP (5 e 3), enquanto reduzindo a relação CH/TPP para 2 o tamanho praticamente dobrou (340 nm). No caso do CH β , os tamanhos mostraram uma menor dependência da relação CH/TPP, com valores entre 300 e 328 nm e uma pequena tendência a diminuir quando a relação CH/TPP diminuiu. Em relação à PI, essa variável foi muito mais dependente da relação CH/TPP. Para ambos os CH's, os menores valores de PI foram obtidos com a relação CH/TPP = 2. Em geral, os valores de PI foram um pouco menores para as partículas de CH α , provavelmente devido à maior massa molecular e maior reatividade do CH β . O potencial Zeta foi positivo em todas as amostras, variando em o intervalo 13 a 21 mV. Apesar do TPP transportar cinco cargas negativas por molécula e o CH apenas uma por unidade repetitiva do polímero, a relação CH/TPP é sempre maior do que um, o que faz com que o potencial Zeta seja positivo.

Na Tabela 4.2 apresentam-se as concentrações (mg/mL) do CH, TPP e HA, a relação CH/HA (m/m), as médias e os desvios padrões das análises das partículas CH/TPP/HA. Todos os resultados das análises destas partículas estão apresentados na Figura 4.2 do Anexo A.

Tabela 4.2 – Concentração (mg/mL), relação CH/TPP/HA (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/TPP/HA.

Amostra	Concentração (mg/mL)			Relação CH/HA (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	TPP	HA				
CHαHA₁	1,0	1,0	2,0	0,33	372,1 \pm 11,2	0,222 \pm 0,06	-15,1 \pm 3,2
CHαHA₂	0,5	0,5	1,0	0,33	332,8 \pm 11,3	0,333 \pm 0,16	-23,4 \pm 4,5
CHβHA₃	1,0	1,0	2,0	0,33	591,5 \pm 76,8	0,394 \pm 0,19	-19,1 \pm 0,9
CHβHA₄	0,5	0,5	1,0	0,33	317,7 \pm 6,2	0,355 \pm 0,08	-22,4 \pm 1,9

Neste teste, diferentes concentrações totais dos polímeros foram testadas, mantendo a razão de massa constante. Em ambos os tipos de partículas (α e β) o tamanho foi aumentado ao duplicar a concentração de polímeros, embora muito mais no caso do CH β (1,12x e 1,86x para o α e β , respectivamente, cujas partículas mostraram novamente um PI ligeiramente superiores aos do CH α . Em relação ao potencial Zeta, nestes testes, a carga negativa adicional aportada por cada unidade repetitiva da molécula de HA resultou em uma carga superficial com valores negativos para todas as partículas, variando entre $-15,1$ mV e $-23,4$ mV.

Na Tabela 4.3 apresentam-se as concentrações (mg/mL) do CH e CS, a relação CH/CS (m/m), as médias e os desvios padrões das análises das partículas CH/CS. Todos os resultados das análises destas partículas estão apresentados na Figura 4.3 do Anexo A.

Tabela 4.3 – Concentração (mg/mL), relação CH/CS (m/m), média e desvio padrão dos resultados à análise das partículas CH/CS.

Amostra	Concentração (mg/mL)		Relação CH/CS (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	CS				
CH α CS ₁	0,5	0,5	1	411,1 \pm 42	0,582 \pm 0,28	24,7 \pm 1,1
CH α CS ₂	1,0	0,5	2	422,8 \pm 7,8	0,362 \pm 0,03	24,3 \pm 4,9
CH β CS ₃	0,5	0,5	1	250,2 \pm 8,7	0,302 \pm 0,08	64,0 \pm 1,2
CH β CS ₄	1,0	0,5	2	741,6 \pm 24	0,511 \pm 0,07	78,3 \pm 1,0

Nesta série de ensaios, parece que a maior reatividade do CH β representa a maior fonte de variabilidade nos resultados obtidos. Nas partículas de CH α , os valores de tamanho, PI e potencial Zeta sofreram apenas pequenas alterações à medida que a concentração de CH e a relação CH/CS aumentaram. No entanto, nas partículas de CH β as variações foram muito maiores, com incrementos de 3x, 1,7x e 1,2x para o tamanho, PI e potencial Zeta, respectivamente. Em todos os casos, o balanço entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ do CH e $-\text{SO}_3^-$ do CS foi favorável à obtenção de partículas com carga superficial positiva, com valores que, no caso do CH β com relação CH/CS = 2, alcançaram + 78,3 mV.

Os valores de tamanho obtidos para os diferentes tipos de partículas estão dentro do intervalo descrito por outros autores para partículas de CH produzidas sob condições similares, que geralmente têm tamanhos relatados entre 100 e 2500 nm [112, 113]. Como em outros

trabalhos encontrados na literatura disponível [112], a concentração de CH mostrou-se um fator relevante para o tamanho das partículas. Contudo, é mais difícil comparar o efeito das proporções entre os diferentes polímeros ou entre eles e o TPP, pois em muitos casos os diferentes autores descrevem tendências opostas para a relação entre estas proporções e o tamanho de partícula [112–115]. Isso certamente está relacionado à variabilidade intrínseca do CH, um polímero de origem natural que pode ser obtido com purezas muito diferentes, e também diferentes massas moleculares e graus de acetilação, que por sua vez afeta o grau de protonação em diferentes valores de pH e, portanto, à formação de partículas.

Além das condições de síntese resumidas nas Tabela 4.1, Tabela 4.2 e Tabela 4.3, outras condições foram testadas nas quais não foi possível obter partículas devido à precipitação na forma de grandes agregados ou a formação de partículas instáveis que se agregaram após um curto período de tempo após a síntese. Este é um comportamento também já relatado por outros autores, em cujos trabalhos são frequentemente descritas, dentro dos intervalos de concentrações selecionados, combinações específicas de polímeros e TPP nos quais não é possível formar nanopartículas [112].

Com base nos critérios de tamanho e PI, foi selecionado um tipo de partícula de cada grupo (CH/TPP, CH/TPP/AH e CH/CS) para ser testado nos ensaios descritos nas seções a seguir. As partículas selecionadas foram: CH α TPP₃; CH β TPP₆; CH α HA₂; CH β HA₄; CH α CS₂ e CH β CS₃.

4.1.2 Avaliação das propriedades mucoadesivas das nanopartículas

Neste subcapítulo apresentam-se os principais resultados das avaliações das propriedades mucoadesivas das nanopartículas. O método da microbalança de quartzo (QCM) e as avaliações de adesão das mucinas via tamanho das partículas e potencial Zeta, via ensaio colorimétrico e via medição da transmitância.

4.1.2.1 Método da microbalança de quartzo (QCM)

Foram realizados dois ensaios com cada tipo de partículas, apresentando-se como exemplo um gráfico que mostra a frequência com o tempo nas diferentes fases do ensaio.

A Figura 4.1 representa um gráfico do tempo (min) *versus* frequência (10^7) (Hz) das partículas CH β /TPP.

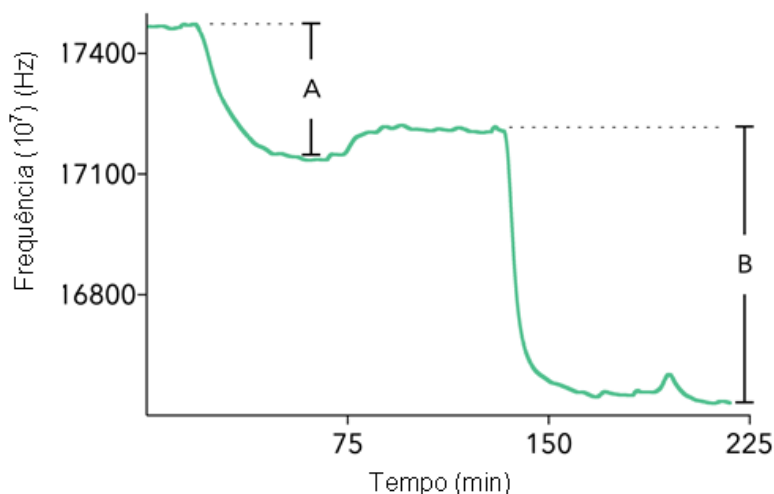


Figura 4.1 – Gráfico do tempo (min) versus frequência (10^7) (Hz) das partículas CH β /TPP. A – Diminuição da frequência correspondente à solução das mucinas; B – Diminuição da frequência após a passagem das nanopartículas sobre as mucinas aderidas ao cristal.

Como é possível visualizar na Figura 4.1, à medida que o tempo passa, a frequência vai diminuindo. A partir da diminuição da frequência é possível calcular a massa/espessura de amostra absorvida. A primeira diminuição de frequência representa a solução de mucinas que vai depositar-se no cristal. A segunda diminuição de frequência representa as partículas que vão depositar-se em cima da camada de mucinas aderida. Quanto mais mucoadesivas forem as partículas maior será a diminuição da frequência. A Figura 4.1 vai de encontro às apresentadas em [45], no entanto o tempo e as frequências são diferentes, pois as mucinas e o polímero são diferentes das utilizadas neste ensaio.

Na Figura 4.2, verifica-se de cada tipo de partículas, as que apresentam uma mucoadesividade superior foram as formuladas com CH β , comparativamente com as partículas sintetizadas com CH α . Além disso, a maior diminuição de frequência acontece nas partículas CH β /TPP/HA, sendo esta diminuição 628 vezes maior do que as segundas mais mucoadesivas que foram as de CH β /TPP, o que significa que de todas as partículas analisadas são que possuem a maior mucoadesividade.

A Figura 4.2 representa a diminuição das frequências (Hz) de cada síntese de partículas.

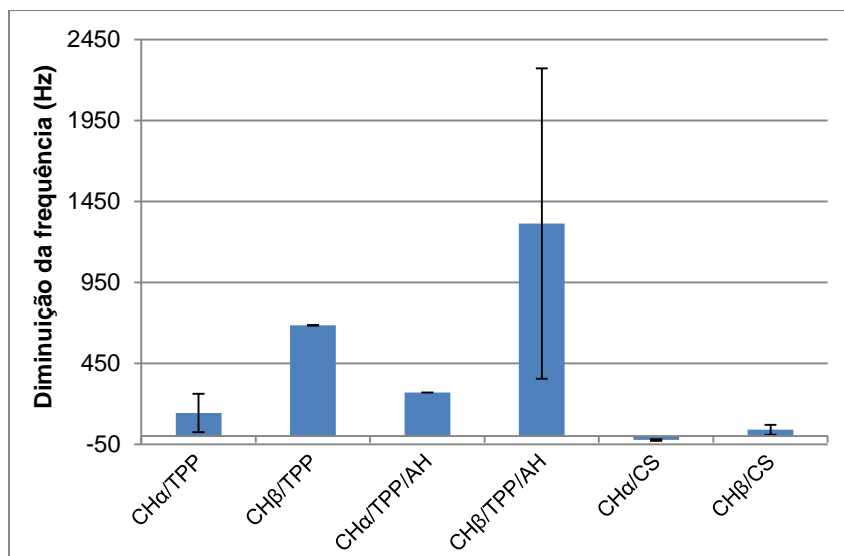


Figura 4.2 – Gráfico com a diminuição das frequências (Hz) de cada síntese de partículas.

4.1.2.2 Avaliação da adesão das mucinas via tamanho das partículas e potencial Zeta

Na Tabela 4.4 estão apresentados os valores do tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas antes e depois da incubação com as mucinas com uma concentração de 0,6 mg/mL.

Tabela 4.4 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas e das nanopartículas + mucinas, com uma concentração de mucinas de 0,6 mg/mL.

Tipo	Nanopartículas			Nanopartículas + mucinas		
	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
CH α /TPP	182,2	0,324	5,10	-	-	2,30
CH β /TPP	332,5	0,607	19,0	-	-	-0,90
CH α /TPP/HA	361,0	0,200	-26,1	439,4	0,383	-13,2
CH β /TPP/HA	332,2	0,338	-27,8	406,6	0,305	-9,24
CH α /CS	321,5	0,389	-19,8	-	-	-16,6
CH β /CS	319,4	0,206	26,0	-	-	-0,68

Observando a tabela, verifica-se que após incubação com as mucinas, alguns dos sistemas foram impossíveis de medir, nomeadamente as partículas CH α /TPP e CH β /TPP pois formaram agregados o que tornou impossível a sua medição no DLS e nas partículas CH α /CS e CH β /CS, onde a medição no DLS não foi clara. Comparando os valores dos tamanhos e PI's das CH α /TPP/HA e CH β /TPP/HA, com e sem mucinas, verifica-se que houve um aumento significativo dos tamanho das partículas e no caso dos PI's apenas nas primeiras houve um aumento significativo. Estes factos são explicados porque, quando mais mucoadesivas são as nanopartículas mais mucinas vão ter ligados a si, logo o tamanho das partículas vai aumentar.

Na Figura 4.3, apresenta-se um gráfico com os potenciais Zeta (mV) das nanopartículas e das nanopartículas após incubação com as mucinas com o respetivo desvio padrão.

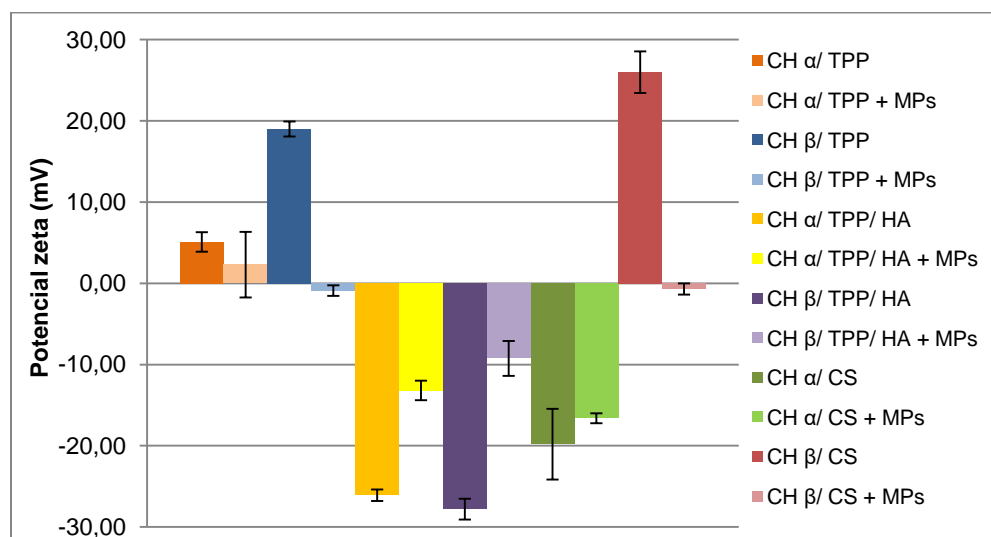


Figura 4.3 – Potencial Zeta (mV) das nanopartículas e das nanopartículas + mucinas.

Nos Anexos A2, verifica-se que o potencial Zeta das mucinas é de $-14,5 \pm 2,72$ mV.

Ao analisar o gráfico verifica-se que para as partículas CH α /TPP, a diferença de potencial Zeta entre as partículas com e sem mucinas é de apenas 2,8 mV. No entanto, o desvio padrão das partículas com as mucinas é alto, o que faz com que o potencial Zeta possa ser ainda mais próximo das partículas sem mucinas. Com estes resultados pode-se afirmar que estas partículas são pouco mucoadesivas, pois como o potencial Zeta das mucinas é negativo, se estas revestissem as partículas estas ficariam com carga negativa.

Relativamente às partículas CH β /TPP, a diferença de potenciais Zeta é significativa, cerca de 19,9 mV, passando de um potencial Zeta positivo para negativo. Assim, é possível afirmar que estas partículas são mucoadesivas, pois as mucinas revestiram-nas tornando-as negativas.

A diferença de potencial Zeta das partículas de CH α /TPP/HA é cerca de 12,9 mV, sendo que as partículas sem mucinas apesar de negativas, com a interação das mucinas tornam-se menos negativas. Com estes resultados pode-se afirmar que estas partículas são mucoadesivas, pois o potencial Zeta das partículas tende a tornar-se menor e a ir de encontro ao potencial Zeta das mucinas.

Verificando os valores das partículas de CH β /TPP/HA, a diferença de potencial é de 18,56 mV. As partículas eram negativas e com a presença de mucinas passaram a tornar-se menos negativas, o que mostra que estas partículas são mucoadesivas.

Comparando os valores de CH α /CS com e sem mucinas, verifica-se que a sua diferença de potencial é de 3,2. Sem mucinas as partículas são negativas, com um desvio padrão alto e com mucinas o potencial Zeta torna-se menos negativo. No entanto a diferença de potenciais é relativamente baixa, o que mostra que estas nanopartículas são pouco adesivas.

Ao observar os valores de CH β /CS, percebe-se que a diferença de potencial é de 26,68 mV. Ao observar o gráfico, observa-se que o potencial Zeta passa de positivo a negativo. Esta diferença mostra que estas partículas são mucoadesivas.

Ao comparar todas as partículas e os seus potenciais Zetas, pode-se afirmar que as nanopartículas mais mucoadesivas são as CH β /TPP, CH β /TPP/HA e as CH β /CS, verificando que o CH β produz partículas mais mucoadesivas do que o CH α . Novamente, as partículas que mostraram uma maior diferença no potencial Zeta, antes e depois da incubação com as mucinas foram as partículas CH β /TPP/HA. No entanto, este método revelou que as partículas CH β /CS também mudam muito a sua carga superficial na presença de mucinas, indicando que a interação destas partículas com as proteínas do epitélio é também forte.

4.1.2.3 Avaliação da adesão das mucinas via ensaio colorimétrico

A Figura 4.4 representa o valor médio da percentagem das mucinas ligadas após incubação com as nanopartículas nas condições assinaladas no Capítulo 3.2.2.3.3 com o respetivo desvio padrão.

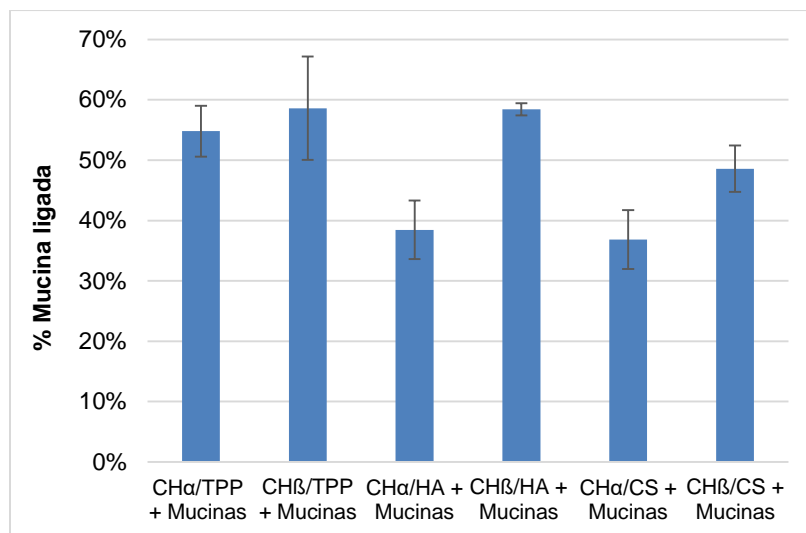


Figura 4.4 – Percentagem de mucina ligada.

Este método permitiu calcular, a percentagem de mucina ligada que é quantificada de acordo com a quantidade de mucina que fica livre na solução. Assim, as partículas que obtenham uma maior percentagem de mucina ligada são as partículas mais mucoadesivas.

Ao observar o gráfico verifica-se que, as partículas com maior percentagem de mucina ligada são as CH β /TPP e as CH β /TPP/HA. No entanto, as partículas CH β /TPP têm um desvio padrão mais alto relativamente às partículas CH β /TPP/HA. Estes resultados estão de acordo aos resultados do tamanho e do potencial Zeta, pois estas partículas também são as mais mucoadesivas.

4.1.2.4 Avaliação da adesão das mucinas via medição da transmitância

Na Figura 4.5, está representado o gráfico da percentagem da razão entre a transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e transmitância das mucinas.

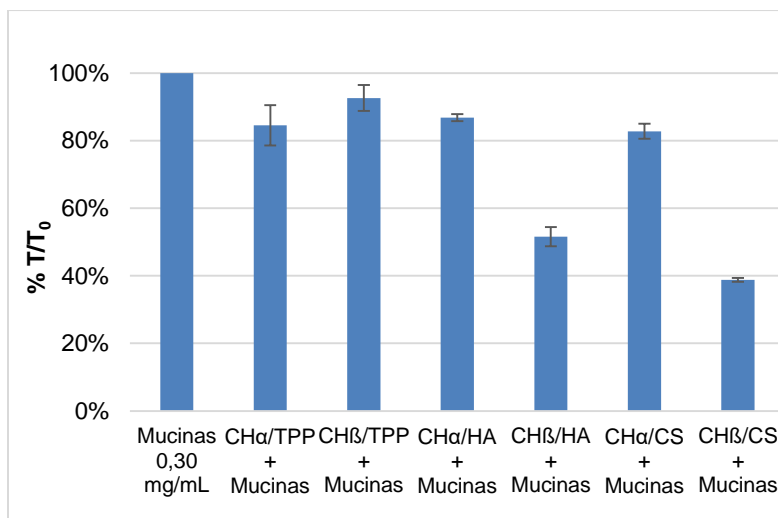


Figura 4.5 – Percentagem da razão entre a transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e transmitância das mucinas a 0,3 mg/mL.

Neste método, as partículas com uma percentagem de T/T_0 (%) menor, são as partículas mais mucoadesivas, de acordo com o artigo [59].

Observando o gráfico verifica-se que as partículas com os menores valores são as CH β /TPP/HA e as CH β /CS, logo são as partículas mais mucoadesivas. Estes resultados vêm ao encontro aos dos ensaios anteriores.

Observando os resultados dos dois métodos de quantificação das mucinas, podemos concluir que as nanopartículas com uma maior mucoadesividade em todos os ensaios realizados são as nanopartículas CH β /TPP/HA. Por esse motivo todos os ensaios a seguir são realizados com estas nanopartículas.

4.1.3 Análise de morfologia mediante microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A Figura 4.6 representa as nanopartículas de CH β /TPP/HA através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

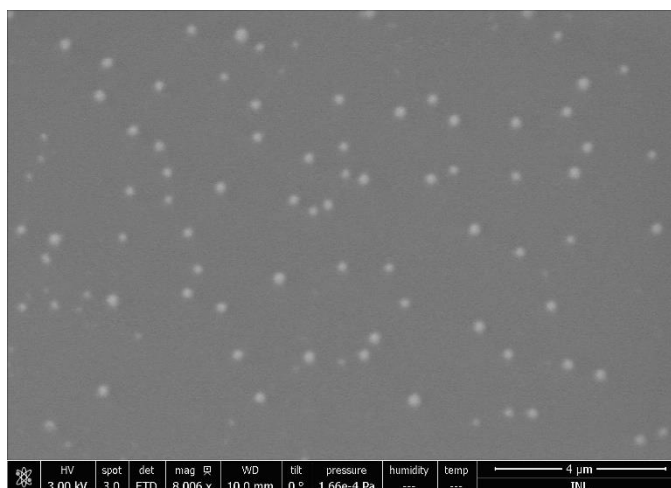


Figura 4.6 – Partículas de CH β /TPP/HA através da microscopia eletrônica de varrimento (SEM).

A Figura 4.7 representa a distribuição dos tamanhos das partículas observadas através do SEM.

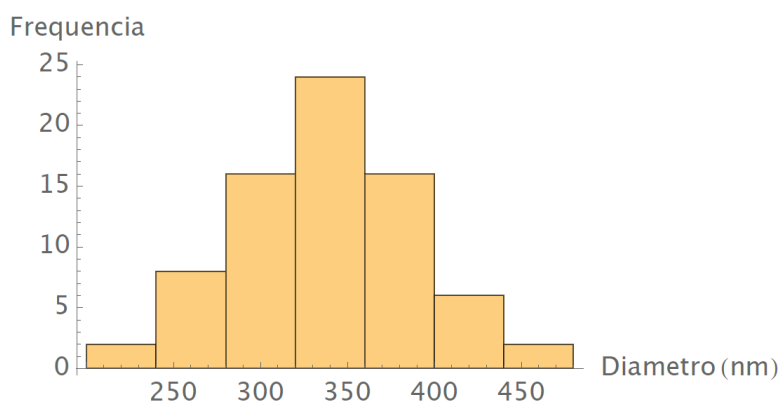


Figura 4.7 – Histograma da distribuição dos tamanhos das partículas medidos.

Através do SEM, foi possível observar que as partículas tinham uma morfologia esférica. No entanto não foi possível tirar imagens mais ampliadas, pois as partículas tem material orgânico na sua constituição que é muito sensível ao feixe de elétrões.

Relativamente aos tamanhos das partículas, o gráfico mostra que o tamanho médio é de $339,8 \pm 39,6$ nm (calculado em base a 74 partículas identificadas). Este tamanho é um pouco maior ao tamanho mostra através do DLS. Isto acontece porque o SEM mostra o tamanho das partículas real enquanto que o DLS mede o tamanho hidrodinâmico (o que faz com que os

tamanhos das partículas sejam maiores). O facto de no DLS as partículas medidas serem maiores também é devido à constituição das partículas, pois o HA atrai partículas de água.

4.2 Caracterização funcional das partículas otimizadas

Neste subcapítulo estão apresentados os principais resultados e discussões às análises realizadas para a caracterização funcional das partículas otimizadas, como a eficiência de encapsulação do PSS, a estabilidade das nanopartículas ao longo do tempo, a permeabilidade do PSS e a toxicidade em células Caco-2.

Como foi mostrado nos resultados anteriores, as nanopartículas com as melhores propriedades mucoadesivas são as CH β /TPP/HA. Com isso, todos os estudos que são realizados a seguir efetuam-se com essas nanopartículas.

4.2.1 Otimização da eficiência de encapsulação do PSS

Para calcular a percentagem de encapsulamento foram sintetizadas nanopartículas na presença de diferentes concentrações de PSS. O PSS livre foi separado mediante centrifugação nas seguintes condições: 40 min a 13300 rpm e filtrado utilizando um filtro (PES de 0,45 μ m), determinando-se a sua concentração mediante HPLC (reta de calibração no Anexo B1). A eficiência de encapsulamento foi calculado através da Equação 2. Na Figura 4.8 apresenta-se o gráfico da percentagem de encapsulamento com o respetivo desvio padrão.

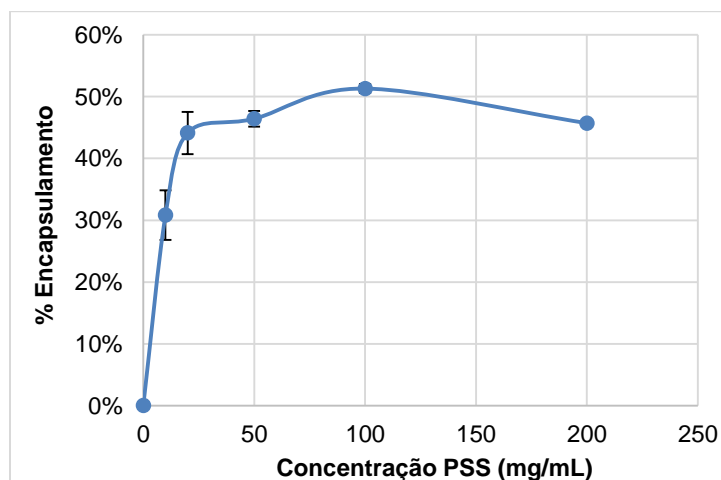


Figura 4.8 – Concentração do PSS (mg/mL) versus a percentagem de encapsulamento.

Analisando o gráfico, verifica-se que a percentagem de encapsulamento do PSS nas nanopartículas aumenta da concentração de 10 até à concentração de 100 mg/mL, sendo que depois diminui ligeiramente até à concentração de 200 mg/mL.

Como é possível observar a percentagem ótima de encapsulamento do PSS nas nanopartículas é de 51% que corresponde a uma concentração de 100 mg/mL. Além de ser a percentagem ótima, também é a que contém um menor desvio-padrão. Esta eficiência é favorável, pois uma eficiência maior pode levar ao risco de vazamento do PSS da partícula e uma eficiência muito baixa faz com que o uso do PSS seja insuficiente, logo a quantidade de PSS encapsulado teria que ser maior.

Com este estudo foi possível mostrar que a percentagem ótima de encapsulamento do PSS acontece a uma concentração de 100 mg/mL. Por esse motivo, os capítulos 4.2.3, 4.2.4 e 4.4 foram realizados com O PSS encapsulado a 100 mg/mL nas partículas CH β /TPP/HÁ.

4.2.2 Estudo da estabilidade das partículas

O estudo da estabilidade das nanopartículas consistiu em realizar medições para o tamanho (nm) e PI ao longo do tempo para as nanopartículas e para o PSS nanoencapsulado. Como estas mostraram que eram termodinamicamente instáveis, diluiu-se as nanopartículas (x5) em água. Todos os resultados estão apresentados no Anexo B2.

Na Tabela 4.5, estão apresentadas as médias do tamanho (nm) e PI das nanopartículas diluídas (x5) em água, não diluídas e para o PSS nanoencapsulado.

Tabela 4.5 – Tamanho (nm) e PI das nanopartículas ao longo do tempo, nanopartículas diluídas (x5) em água, não diluídas e o PSS nanoencapsulado.

Tempo (dias)	Com PSS		Sem PSS		Diluída 5x com água	
	Tamanho (nm)	PI	Tamanho (nm)	PI	Tamanho (nm)	PI
1	334,0	0,316	372,5	0,330	355,2	0,389
2	416,2	0,365	398,2	0,338	321,6	0,301
3	440,6	0,331	472,0	0,391	-	-
4	526,0	0,427	503,4	0,525	-	-
5	-	-	-	-	292,1	0,252
6	-	-	-	-	269,1	0,214
7	-	-	-	-	276,7	0,278

8	857,0	0,599	652,3	0,885	-	-
9	-	-	-	-	277,0	0,274

Na Figura 4.9, apresenta-se o gráfico do tempo (dias) *versus* o tamanho das partículas (nm).

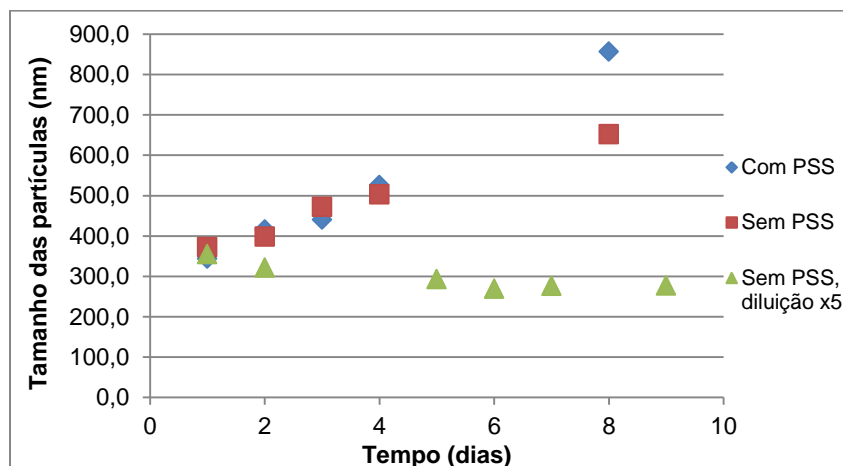


Figura 4.9 – Tempo (dias) *versus* tamanho das partículas (nm).

Observando o gráfico, verifica-se que o tamanho das nanopartículas e do PSS nanoencapsulado aumenta com o passar do tempo. Para as nanopartículas diluídas o mesmo não acontece, pois apesar do tamanho diminuir um pouco do primeiro para o quinto dia, depois mantém-se estável. Comparando as nanopartículas e o PSS nanoencapsulado, verifica-se os tamanhos entre si são pouco variáveis, no entanto a partir do quarto dia o tamanho das nanopartículas aumenta significativamente. Este aumento do tamanho já era notório na própria solução antes de analisar, pois a partir do terceiro dia conseguia-se visualizar partículas agregadas.

A diferença nos tamanhos, no caso das nanopartículas diluídas, pode dever-se ao facto de como a solução está diluída as partículas estão mais afastadas, logo não existe agregação das mesmas. Relativamente à diferença nos tamanhos das nanopartículas e do PSS nanoencapsulado pode dever-se ao facto do PSS poder ajudar a estabilidade das interações entre os polímeros.

Na Figura 4.10, apresenta-se o gráfico do tempo (dias) *versus* o PI.

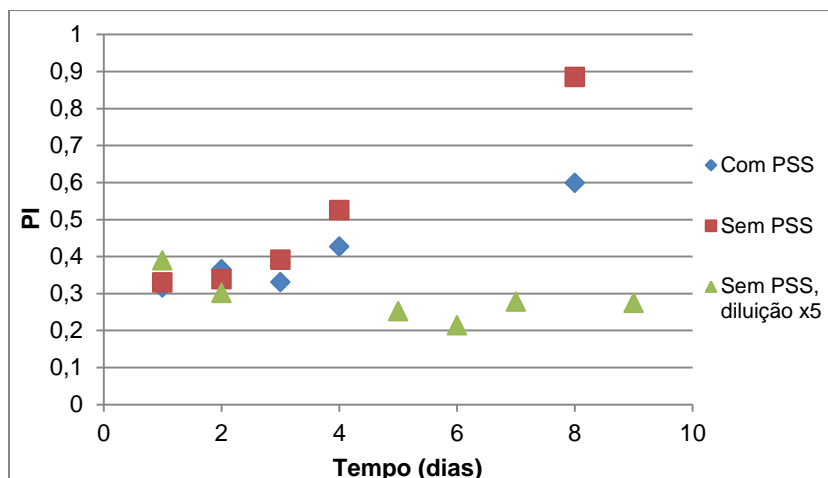


Figura 4.10 – Tempo (dias) versus PI.

Ao observar o gráfico, verifica-se que o PI das nanopartículas e do PSS nanoencapsulado aumenta ao longo do tempo, enquanto que para as nanopartículas diluídas o PI mantém-se relativamente estável ao longo do tempo.

Comparando nanopartículas e do PSS nanoencapsulado, percebe-se que ao longo do tempo, o PI é maior quando as partículas estiverem sem o PSS. Este resultado indica mais uma vez que o PSS ajuda a manter a estrutura das nanopartículas, verificando-se uma união estável com os polímeros que compõem as partículas.

4.2.3 Estudo da permeabilidade em células Caco-2+HT29-MTX

O estudo da permeabilidade do PSS livre e o PSS nanoencapsulado foi avaliado em monocamada de células (Caco-2/ HT29-MTX) suportadas em *inserts* para placas de 12 poços. Foi também efetuado um estudo controlo usando *inserts* sem células para verificar a passagem de PSS livre através da membrana. O ensaio teve uma duração total de 4h e foram retiradas amostras a cada hora de ensaio. As amostras foram posteriormente analisadas por HPLC.

A Figura 4.11 representa a percentagem (%) de massa de PSS permeado versus tempo (h) de incubação. A percentagem (%) foi calculada de acordo com a Equação 3.

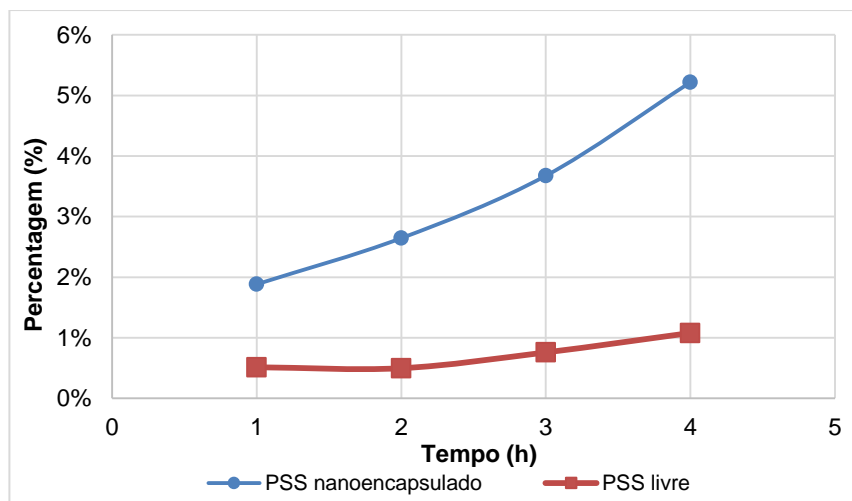


Figura 4.11 – Percentagem (%) de massa de PSS permeado *versus* tempo (h) de incubação.

Observando a Figura 4.11, é possível afirmar que para as 4 horas de ensaio no lado basolateral, a percentagem de PSS livre que passa pela membrana aumenta gradualmente, no entanto para PSS nanoencapsulado a percentagem que passa é 5 vezes maior, o que sugere que as nanopartículas favorecem a permeabilidade do PSS.

Relativamente à análise do PSS que foi internalizado, verifica-se que quando este está encapsulado, a internalização do PSS é cerca de 2,4 vezes maior do que quando está livre. Isto pode dever-se ao facto do PSS estar encapsulado em partículas com polímeros mucoadesivos, que faz com que o PSS fique aderido ao epitélio favorecendo a passagem do PSS para o lado basolateral.

Na Figura 4.12, representa o gráfico da cinética de passagem do PSS livre através da membrana (sem células), em percentagem (%), relativamente à quantidade de PSS inicial.

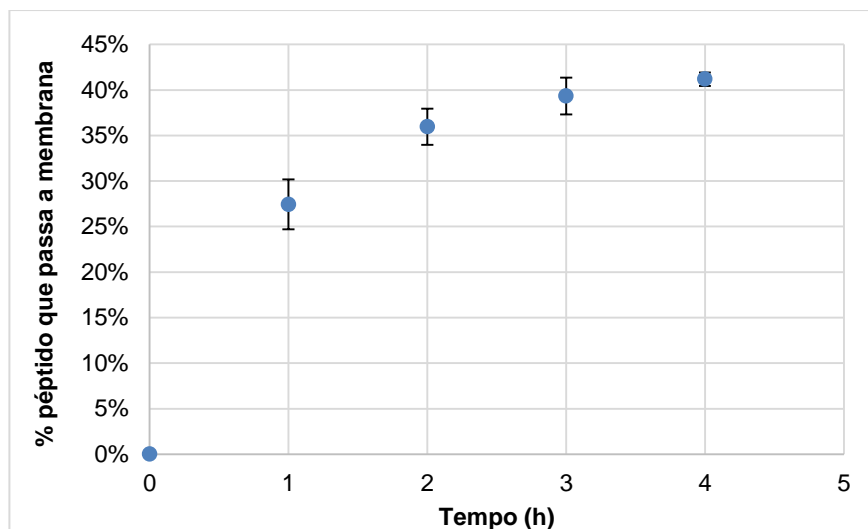


Figura 4.12 – Cinética da passagem do PSS livre através da membrana (sem células), sem percentagem (%), relativamente à quantidade de PSS inicial.

Neste ensaio a passagem do PSS para o lado basolateral é determinada pela sua capacidade de atravessar a barreira de células (monocamada de células Caco-2/ HT29-MTX). A integridade da monocamada é assegurada pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) ao longo do ensaio (até às 4h), apresentadas no Anexo B3.

Através da Figura 4.12, é possível verificar que ao longo do tempo, a percentagem de PSS que passa a membrana aumenta. O PSS tem uma certa afinidade com a membrana e não consegue passar na sua totalidade, no entanto passa uma quantidade suficiente para garantir que é possível quantificar e ver diferenças nas outras condições analisadas.

Verifica-se que existe uma diminuição na permeabilidade do PSS livre na presença das células o que garante que a monocamada atua como uma barreira à passagem do PSS.

4.2.4 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2

A toxicidade foi avaliada em células Caco-2, com os testes de MTT e resazurina para os tempos de incubação de 4 e 24h. As amostras para este teste foram o PSS livre a 50 mg/L, as nanopartículas e o PSS nanoencapsulado a 50 mg/L.

A Figura 4.13 representa a percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação, determinada pelo método de MTT.

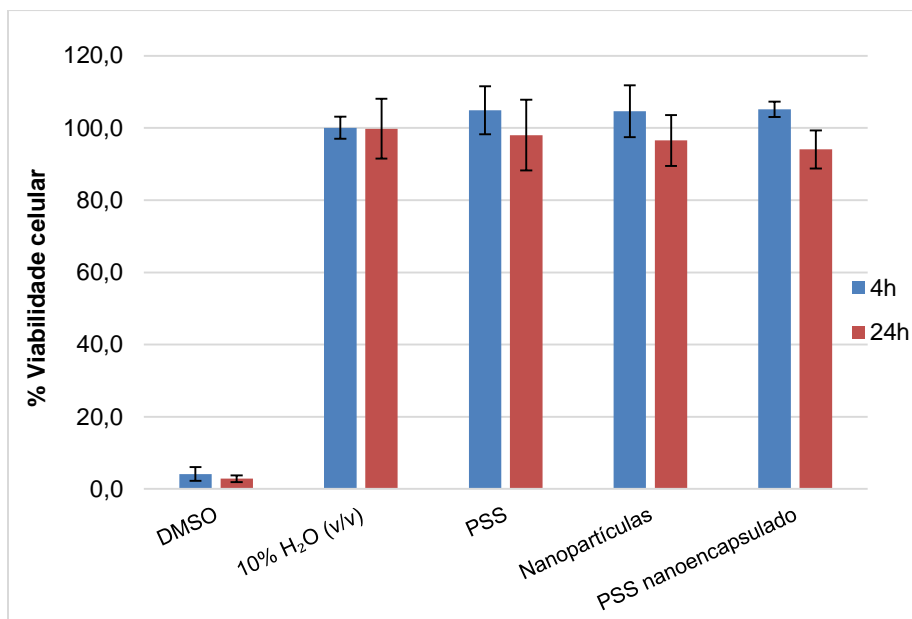


Figura 4.13 – Percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação com as amostras, determinada pelo método de MTT.

Como é possível verificar através da Figura 4.13, as várias amostras testadas: o PSS livre, nanopartículas e PSS nanoencapsulado, não comprometem a viabilidade celular das células Caco-2 após 4 e 24h de contacto mostrando-se por isso não citotóxicas.

A Figura 4.14 representa a percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação, determinada pelo método da resazurina.

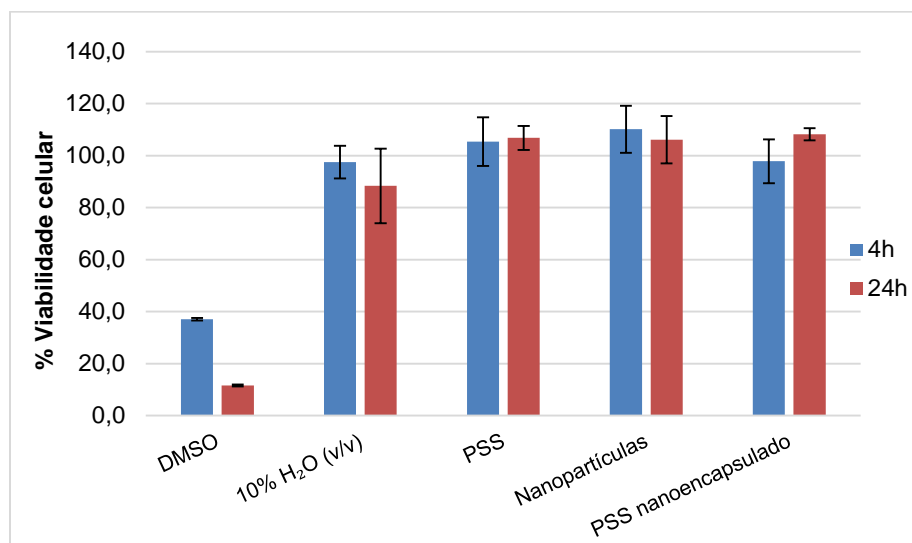


Figura 4.14 – Percentagem de viabilidade celular após 4 e 24h de incubação com as amostras, determinada pelo método da resazurina.

Relativamente ao teste da resazurina, verifica-se pela observação da Figura 4.14 que tal como no teste do MTT, nenhum dos sistemas é tóxico para as células, pois a percentagem de viabilidade celular permanece próxima de 100% ao longo do ensaio.

Em conclusão, nenhum dos sistemas estudados afeta a viabilidade celular após 24h de contacto.

4.3 Estudo da internalização das partículas

A Figura 4.14 representa a captação celular de nanogéis HA-cy5.5, avaliada em monocamadas diferenciadas de Caco-2, HT29-MTX após 4h de incubação. As células foram observadas por microscopia confocal de monocamadas. Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). A actina foi corada com isotiocianato de faloidina-tetrametil-rodamina B (verde). Os nanogéis foram corados com cy5.5 (vermelho).

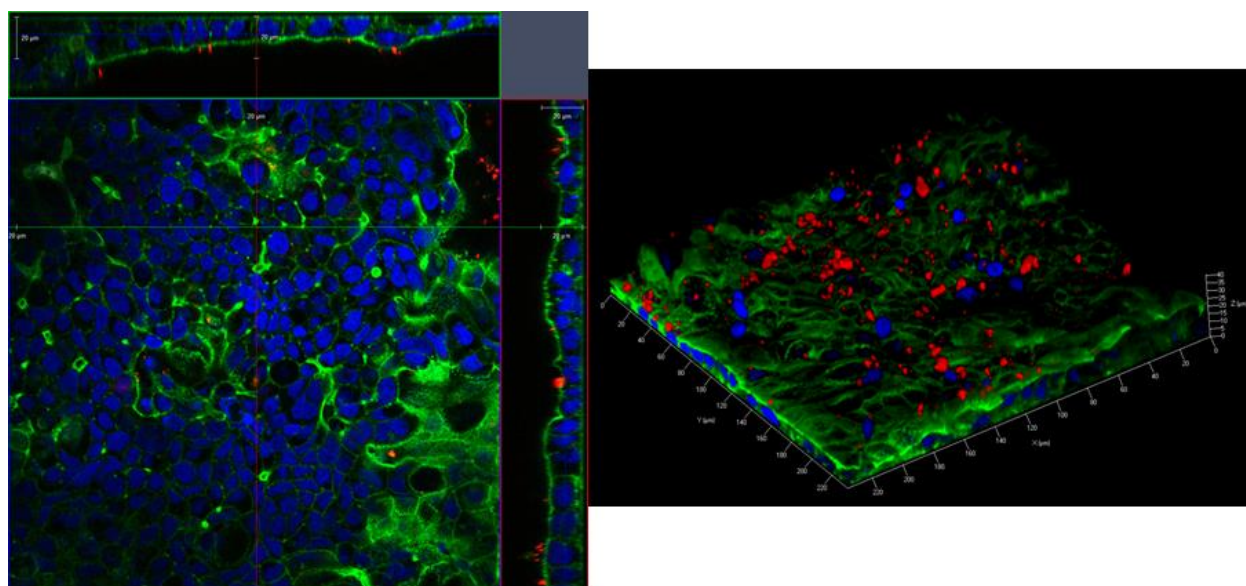


Figura 4.15 – Observação por microscopia confocal de monocamadas, após 21 dias de diferenciação de células Caco-2, HT29-MTX incubadas com nanogéis HA-cy5.5 durante 4h. Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). A actina foi corada com isotiocianato de faloidina-tetrametil-rodamina B (verde). Os nanogéis foram corados com cy5.5 (vermelho).

As observações no microscópio confocal, mostram que a monocamada não internaliza o nanogel, que é adsorvido no lado apical das células, provavelmente devido à propriedade mucoadesiva do HA. Estes resultados confirmam os resultados de mucoadesividade e de permeabilidade, pois mostram que as partículas além de mucoadesivas não passam pelas células, ficando à superfície destas.

4.4 Estudo *in vitro* do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais

Observando as Figura C.1 e Figura C.2 dos Anexos C, quando o PSS está livre, apenas é visível pico deste até à fase gástrica. Isto acontece porque quando o PSS está livre hidrolisa-se nesta fase, não chegando à fase intestinal.

No caso do PSS nanoencapsulado, através das Figura C.3 e Figura C.4, observa-se pico na fase intestinal, o que era pretendido, pois o objetivo era que o PSS quando fosse encapsulado chegasse até à fase intestinal. No entanto existe uma redução da área dos picos, pois parte das partículas podem estar a desintegrar-se.

Para que este sistema funcionasse como sistema oral era necessário reforçar a proteção das nanopartículas, incorporando estas em micropartículas que proporcionem uma melhor barreira.

5. Conclusão

Esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de sistemas para a distribuição direcionada de PSS no trato gastrointestinal baseados em biopolímeros mucoadesivos.

A obesidade é uma epidemia do século XXI e um dos maiores problemas e desafios da saúde atualmente. A obesidade, aumenta o risco do aparecimento de doenças como os diabetes tipo 2, doença cardíaca, acidentes cardiovasculares e cancro. A libertação de péptidos de soja poderá ser uma solução para este problema. Estes péptidos têm a capacidade de suprimir a ingestão de alimentos e inibir o esvaziamento gástrico, dando o efeito de saciedade. A sua baixa biodisponibilidade após ingestão leva à necessidade da sua encapsulação para proteção e libertação controlada.

Inicialmente sintetizou-se várias nanopartículas com os biopolímeros naturais escolhidos, através do método da coacervação. Para seleccionar qual a síntese que levava às características pretendidas, realizou-se um estudo de mucoadesividade, através de dois métodos diferentes. Este estudo revelou que a síntese que produziu melhores características foi a CH β /TPP/HA. Todo o trabalho a seguir foi realizado com estas nanopartículas.

O estudo da internalização das nanopartículas, através da microscopia confocal, efetuado durante 4h reforçou a teoria da mucoadesividade das nanopartículas, já que não foram internalizadas pelas células, ficando à superfície destas.

Como referido inicialmente, o PSS tem que ser nanoencapsulado e para isso foi necessário perceber qual a percentagem ótima de PSS que é possível encapsular nas nanopartículas. Com a otimização da eficiência de encapsulação foi possível perceber que a percentagem ótima de encapsulamento do PSS foi de 51% que corresponde a uma concentração inicial de 100 mg/mL de PSS.

A estabilidade das partículas é uma questão importante, tendo sido por isso elaborado um estudo para perceber qual a estabilidade das partículas ao longo do tempo. Conclui-se que as partículas não diluídas não são estáveis pois agregam ao longo do tempo, porque o CH é termodinamicamente instável. A diferença do PSS livre e do PSS nanoencapsulado deve-se ao facto de o PSS poder ajudar na estabilidade das interações entre os polímeros.

Para perceber o comportamento das nanopartículas em contacto com as células do intestino humano foi efetuado um estudo de viabilidade celular com as células Caco-2. Uma vez que as formulações não se mostraram citotóxicas até 24h contacto, avaliou-se a permeabilidade e a internalização do PSS em monocamadas de Caco-2/HT29-MTX. Como

esperado grande parte do PSS nanoencapsulado não atravessa a monocamada, mostrando mais uma vez que as nanopartículas são mucoadesivas.

Por fim, foi realizado o estudo de digestão *in vitro*, onde o PSS livre e o PSS nanoencapsulado foram expostos às condições gastrointestinais. Conclui-se que o PSS livre se hidrolisa na fase gástrica não chegando à fase intestinal. No caso do PSS nanoencapsulado, este chega até à fase intestinal, no entanto parte das partículas parecem desintegrar-se neste ponto.

Para que este sistema funcionasse como sistema oral era necessário reforçar a proteção das nanopartículas, incorporando-as em micropartículas que proporcionem uma melhor barreira.

Bibliografia

1. Shah, M.A., Mir, S.A., Bashir, M.: Nanoencapsulation of Food Ingredients. In: Integrating Biologically- Inspired Nanotechnology into Medical Practice. pp. 132–152. IGI Global, Índia (2016)
2. Fathi, M., Mozafari, M.R., Mohebbi, M.: Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 13–27 (2012). doi:10.1016/j.tifs.2011.08.003
3. Paul de Vos, Marijke M. Faas, Milica Spasojevic, J.S.: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. J. ChemTech Res.* 8, 587–598 (2010). doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008
4. Field, B.C.T., Chaudhri, O.B., Bloom, S.R.: Bowels control brain: Gut hormones and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 444–453 (2010). doi:10.1038/nrendo.2010.93
5. Adams, T.D., Gress, R.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Rosamond, W.D., Lamonte, M.J., Stroup, A.M., Hunt, S.C.: Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N.Engl.J Med.* 357, 753–761 (2007). doi:10.1056/NEJMoa066603
6. Pemble, C.W., Johnson, L.C., Kridel, S.J., Lowther, W.T.: Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 704–709 (2007). doi:10.1038/nsmb1265
7. Martinez-Villaluenga, C., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., Gonzalez De Mejia, E.: Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. *FEBS J.* 277, 1481–1493 (2010). doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07577.x
8. Fajardo, A.R., Lopes, L.C., Valente, A.J.M., Rubira, A.F., Muniz, E.C.: Effect of stoichiometry and pH on the structure and properties of Chitosan/Chondroitin sulfate complexes. *Colloid Polym. Sci.* 289, 1739–1748 (2011). doi:10.1007/s00396-011-2497-6
9. Setchell, K., Zhao, X., Jha, P., Heubi, J.E., Brown, N.M.: The pharmacokinetic behavior of the soy isoflavone metabolite S - (2) equol and its diastereoisomer R - (+) equol in healthy adults determined by using stable-isotope-labeled tracers 1 – 4. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1029–1037 (2009). doi:10.3945/ajcn.2009.27981.1
10. Luo, Y., Wang: Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science. *J Food Process. Beverages.* J Food Process. Beverages July. 1, (2013)
11. Grumezescu, A.M.: *Nanotechnology in the Agri-Food Industry* ,. Elsevier, Bucareste,

Roméia (2016)

12. Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N.: Encapsulation in the food industry: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 213–224 (1999). doi:10.1080/096374899101256
 13. Azeredo, H.M.C., Division, C., Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L., Alves, A., de Azeredo, H.M.C., Azeredo, H.M.C.: *Drying Technology : An International Journal*. *Aliment. e Nutr. Araraquara.* 16, 89–97 (2005). doi:10.1016/j.tifs.2013.04.001
 14. Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., Liang, L.: Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 143–182 (2016). doi:10.1111/1541-4337.12179
 15. Mohan, A., Rajendran, S.R.C.K., He, Q.S., Bazinet, L., Udenigwe, C.C.: Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Adv.* 5, 79270–79278 (2015). doi:10.1039/C5RA13419F
 16. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B.: An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* 1, 1806–1815 (2011). doi:10.1016/j.profoo.2011.09.265
 17. Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Princípios de bioquímica de Lehninger*. W.H Freeman and Company, Nova Iorque (2014)
 18. McClements, D.J.: *Nanoparticle and microparticle based delivery systems*. CRC Press, Nova Iorque (2015)
 19. Ricardo, I., Victorino, D.S.: *Encapsulamento em Lipossomas de Proteínas Individuais e em Misturas Simulando Extratos Alergênicos*, (2000)
 20. Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., Maji, T.K.: Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Adv. Colloid Interface Sci.* 239, 136–145 (2017). doi:10.1016/j.cis.2016.05.009
 21. De Kruif, C.G., Weinbreck, F., De Vries, R.: Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 340–349 (2004). doi:10.1016/j.cocis.2004.09.006
 22. Rawat, K.: Coacervation in Biopolymers. *J. Phys. Chem. Biophys.* 4, (2014). doi:10.4172/2161-0398.1000165
 23. Team, A.F., Bahn, D.: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, Belgrado, Sérvia (2012)
 24. Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A.: Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142 (2010). doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
-

25. Carvalho, J.S.R.: Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose, (2009)
 26. Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F.: Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação, (2003)
 27. Eghbal, N., Choudhary, R.: Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *Lwt - Food Sci. Technol.* 90, 254–264 (2018). doi:10.1016/j.lwt.2017.12.036
 28. McClements, D.J.: Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 253, 1–22 (2018). doi:10.1016/j.cis.2018.02.002
 29. Kulkarni, V.S.: *Handbook of non-invasive drug delivery systems*. Elsevier (2010)
 30. Rezende, S., Stanisçuaski, S., Lucca, L. De, Raffin, A.: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. 26, 726–737 (2003)
 31. Press, A.A.: *Natural polymers, biopolymers, biomaterials and their composites, blends, and IPNS*. Apple Academic Press (2012)
 32. Joye, I.J., McClements, D.J.: Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 19, 417–427 (2014). doi:10.1016/j.cocis.2014.07.002
 33. Dodou, D., Breedveld, P., Wieringa, P.A.: Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: Revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60, 1–16 (2005). doi:10.1016/j.ejpb.2005.01.007
 34. Ravi Kumar, M.N.V.: A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46, 1–27 (2000). doi:10.1016/S1381-5148(00)00038-9
 35. Boni, F.I.: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de metotrexato, (2017)
 36. Souza, V.: *Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas de Ácido Hialurônico com Encapsulação do Extrato Bruto Vegetal da Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) Verlot para Aplicações Farmacêuticas e Cosméticas*, (1994)
 37. Bicudo, R.C.S.: *Nanopartículas de Ácido Hialurônico produzidas por Nanoprecipitação e Reticulação Química : Processos e Caracterização*, (2011)
 38. Kubo, T.M.O.: *Preparação e caracterização de micropartículas de hialuronato de sódio para encapsulação e liberação controlada de proteínas para aplicação nasal*, (2005)
-

39. Matsushita, K., Nakata, T., Takeda-Okuda, N., Nadanaka, S., Kitagawa, H., Tamura, J. ichi: Synthesis of chondroitin sulfate CC and DD tetrasaccharides and interactions with 2H6 and LY111. *Bioorganic Med. Chem.* 26, 1016–1025 (2018).
doi:10.1016/j.bmc.2018.01.011
 40. Jardim, K.V.: Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana/sulfato de condroitina para nanoencapsulação da curcumina visando sua liberação controlada e avaliação de sua atividade antitumoral, (2013)
 41. Bobula, T., Buffa, R., Hermannová, M., Vágnerová, H., Dolečková, I., Velebný, V.: The synthesis of a new unsaturated derivative of chondroitin sulfate with increased antioxidant properties. *Carbohydr. Polym.* 190, 175–183 (2018). doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.080
 42. Ma, Y., Wei, M., Zhang, X., Zhao, T., Liu, X., Zhou, G.: Spectral study of interaction between chondroitin sulfate and nanoparticles and its application in quantitative analysis. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 153, 445–450 (2016).
doi:10.1016/j.saa.2015.08.045
 43. Harding, S.E., Deacon, M.P., Fiebrig, I., Davis, S.S.B., Deacon, M.P., Fiebrig, I., Davis, S.S.B.: Biopolymer Mucoadhesives. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16, 41–86 (1999).
doi:10.1080/02648725.1999.10647971
 44. Varum, F.O., Basit, A.W., Sousa, J., Veiga, F.: Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos, (2008)
 45. Oh, S., Wilcox, M., Pearson, J.P., Borrós, S.: Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 477–483 (2015). doi:10.1016/j.ejpb.2015.08.002
 46. Peppas, N.A., Sahlin, J.J.: Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. *Biomaterials.* 17, 1553–1561 (1996). doi:10.1016/0142-9612(95)00307-X
 47. Mucosa Intestinal,
<http://www.atlasdocorpohumano.com/p/imagem/tecidos/membranas/membrana-mucosa/mucosa-intestinal/>
 48. Bansil, R., Turner, B.S.: Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164–170 (2006).
doi:10.1016/j.cocis.2005.11.001
 49. Mohanraj, V.J., Chen, Y.: Nanoparticles – A Review. *J. Pharm. Res.* 5, 561–573 (2006).
doi:10.4314/tjpr.v5i1.14634
 50. Wang, L., Nagesha, D.K., Selvarasah, S., Dokmeci, M.R., Carrier, R.L.: Toxicity of CdSe
-

- nanoparticles in Caco-2 cell cultures. *J. Nanobiotechnology*. 6, 1–15 (2008).
doi:10.1186/1477-3155-6-11
51. Pichardo, S., Devesa, V., Puerto, M., Vélez, D., Cameán, A.M.: Intestinal transport of Cylindrospermopsin using the Caco-2 cell line. *Toxicol. Vitro*. 38, 142–149 (2017).
doi:10.1016/j.tiv.2016.09.021
52. Loh, J.W., Saunders, M., Lim, L.Y.: Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 273–282 (2012).
doi:10.1016/j.taap.2012.04.037
53. Woertz, C., Preis, M., Breitreutz, J., Kleinebudde, P.: Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 843–853 (2013). doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.023
54. Andrews, G.P., Laverty, T.P., Jones, D.S.: Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 505–518 (2009).
doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.028
55. Cook, S.L., Bull, S.P., Methven, L., Parker, J.K., Khutoryanskiy, V. V.: Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocoll.* 72, 281–296 (2017).
doi:10.1016/j.foodhyd.2017.05.043
56. Chen, J.Y., Penn, L.S., Xi, J.: Quartz crystal microbalance: Sensing cell-substrate adhesion and beyond. *Biosens. Bioelectron.* 99, 593–602 (2018).
doi:10.1016/j.bios.2017.08.032
57. Grießinger, J., Dünnhaupt, S., Cattoz, B., Griffiths, P., Oh, S., Gómez, S.B.I., Wilcox, M., Pearson, J., Gumbleton, M., Abdulkarim, M., Pereira De Sousa, I., Bernkop-Schnürch, A.: Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96, 464–476 (2015). doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.005
58. Kilcoyne, M., Gerlach, J.Q., Farrell, M.P., Bhavanandan, V.P., Joshi, L.: Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. *Anal. Biochem.* 416, 18–26 (2011). doi:10.1016/j.ab.2011.05.006
59. Bongiovì, F., Di Prima, G., Palumbo, F.S., Licciardi, M., Pitarresi, G., Giammona, G.: Hyaluronic Acid-Based Micelles as Ocular Platform to Modulate the Loading, Release, and Corneal Permeation of Corticosteroids. *Macromol. Biosci.* 17, 1–13 (2017).
doi:10.1002/mabi.201700261
60. Sawtarie, N., Cai, Y., Lapitsky, Y.: Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 157, 110–117 (2017). doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.055
-

61. Yang, J., Han, S., Zheng, H., Dong, H., Liu, J.: Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 123, 53–66 (2015). doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.029
 62. Ai, J., Liao, W., Ren, Z.-L.: Enhanced anticancer effect of copper-loaded chitosan nanoparticles against osteosarcoma. *RSC Adv.* 7, 15971–15977 (2017). doi:10.1039/C6RA21648J
 63. Jiang, Z., Dong, X., Sun, Y.: Charge effects of self-assembled chitosan-hyaluronic acid nanoparticles on inhibiting amyloid β -protein aggregation. *Carbohydr. Res.* 461, 11–18 (2018). doi:10.1016/j.carres.2018.03.001
 64. Polexe, R.C., Delair, T.: Elaboration of stable and antibody functionalized positively charged colloids by polyelectrolyte complexation between chitosan and hyaluronic acid. *Molecules.* 18, 8563–8578 (2013). doi:10.3390/molecules18078563
 65. Umerska, A., Corrigan, O.I., Tajber, L.: Design of chondroitin sulfate-based polyelectrolyte nanoplexes: Formation of nanocarriers with chitosan and a case study of salmon calcitonin. *Carbohydr. Polym.* 156, 276–284 (2017). doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.035
 66. Nasti, A., Zaki, N.M., De Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M.G., Tirelli, N.: Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharm. Res.* 26, 1918–1930 (2009). doi:10.1007/s11095-009-9908-0
 67. 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 Biomater.* 7, 3804–3812 (2011). doi:10.1016/j.actbio.2011.06.026
 68. Nazir, I., Leichner, C., Le-Vinh, B., Bernkop-Schnürch, A.: Surface phosphorylation of nanoparticles by hexokinase: A powerful tool for cellular uptake improvement. *J. Colloid Interface Sci.* 516, 384–391 (2018). doi:10.1016/j.jcis.2018.01.082
 69. Sogias, I.A., Williams, A.C., Khutoryanskiy, V. V.: Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules.* 9, 1837–1842 (2008). doi:10.1021/bm800276d
 70. Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H.: Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Reports.* 64, 1020–1037 (2012). doi:10.1016/S1734-1140(12)70901-5
 71. Abreu, F.O.M.S., Forte, M.M.C., Kist, T.B.L., Honaiser, L.P.: Effect of the preparation method on the drug loading of alginate-chitosan microspheres. *Express Polym. Lett.* 4, 456–464 (2010). doi:10.3144/expresspolymlett.2010.58
 72. Moura, M.J.: Aplicações Do Quitosano Em Libertação Controlada De Fármacos: Algumas
-

- Considerações. Enciclopédia Biosf. 814, 1489–1509 (2012)
73. Lin, Y.H., Liang, H.F., Chung, C.K., Chen, M.C., Sung, H.W.: Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 26, 2105–2113 (2005). doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.011
 74. Chen, S.C., Wu, Y.C., Mi, F.L., Lin, Y.H., Yu, L.C., Sung, H.W.: A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J. Control. Release*. 96, 285–300 (2004). doi:10.1016/j.jconrel.2004.02.002
 75. Harris, R., Lecumberri, E., Heras, A.: Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: Clarithromycin, tramadol and heparin. *Mar. Drugs*. 8, 1750–1762 (2010). doi:10.3390/md8061750
 76. Karnchanajindanun, J., Srisa-ard, M., Srihanam, P., Baimark, Y.: Preparation and characterization of genipin-cross-linked chitosan microparticles by water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Nat. Sci.* 02, 1061–1065 (2010). doi:10.4236/ns.2010.210131
 77. Mi, F., Shyu, S., Kuan, C., Lee, S., Lu, K., Jang, S.: Chitosan – Polyelectrolyte Complexation for the Preparation of Gel Beads and Controlled Release of Anticancer Drug . I . Effect of Phosphorous Polyelectrolyte Complex and Enzymatic Hydrolysis of Polymer. *Polymer (Guildf)*. 74, 1868–1879 (1999)
 78. Lee, H., Jeong, C., Ghafoor, K., Cho, S., Park, J.: Oral delivery of insulin using chitosan capsules cross-linked with phytic acid. *Biomed. Mater. Eng.* 21, 25–36 (2011). doi:10.3233/BME-2011-0654
 79. Li, P., Wang, Y., Peng, Z., She, F., Kong, L.: Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydr. Polym.* 85, 698–704 (2011). doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.045
 80. Azevedo, J.R., Sizilio, R.H., Brito, M.B., Costa, A.M.B., Serafini, M.R., Araújo, A.A.S., Santos, M.R.V., Lira, A.A.M., Nunes, R.S.: Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *J. Therm. Anal. Calorim.* 106, 685–689 (2011). doi:10.1007/s10973-011-1429-5
 81. Makhlof, A., Tozuka, Y., Takeuchi, H.: Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, 445–451 (2011). doi:10.1016/j.ejps.2010.12.007
 82. Gan, Q., Wang, T.: Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 59, 24–34 (2007). doi:10.1016/j.colsurfb.2007.04.009
-

83. Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P.C., Maitra, A.N.: Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release.* 74, 317–323 (2001). doi:10.1016/S0168-3659(01)00342-X
84. Li, P., Dai, Y.-N., Zhang, J.-P., Wang, A.-Q., Wei, Q.: Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 221–8 (2008)
85. Das, R.K., Kasoju, N., Bora, U.: Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6, 153–160 (2010). doi:10.1016/j.nano.2009.05.009
86. Ieva, E., Trapani, A., Cioffi, N., Ditaranto, N., Monopoli, A., Sabbatini, L.: Analytical characterization of chitosan nanoparticles for peptide drug delivery applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 207–215 (2009). doi:10.1007/s00216-008-2463-4
87. Arias, J.L., Reddy, L.H., Couvreur, P.: Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules.* 12, 97–104 (2011). doi:10.1021/bm101044h
88. Gaspar, V.M., Correia, I.J., Sousa, Â., Silva, F., Paquete, C.M., Queiroz, J.A., Sousa, F.: Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. *J. Control. Release.* 156, 212–222 (2011). doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.007
89. Iqbal, M., Lin, W., Jabbal-Gill, I., Davis, S.S., Steward, M.W., Illum, L.: Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine.* 21, 1478–1485 (2003). doi:10.1016/S0264-410X(02)00662-X
90. Molina Ortiz, S.E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A., Santana, A.S., Favaro-Trindade, C.S.: Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 919–923 (2009). doi:10.1016/j.lwt.2008.12.004
91. Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S.E., Favaro-Trindade, C.S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., Thomazini, M.: Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Res. Int.* 42, 1099–1104 (2009). doi:10.1016/j.foodres.2009.05.007
92. Favaro-Trindade, C.S., Santana, A.S., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A., Netto, F.M.: The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocoll.* 24, 336–340 (2010). doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.012
93. Ma, J.J., Mao, X.Y., Wang, Q., Yang, S., Zhang, D., Chen, S.W., Li, Y.H.: Effect of spray drying and freeze drying on the immunomodulatory activity, bitter taste and hygroscopicity

- of hydrolysate derived from whey protein concentrate. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 296–302 (2014). doi:10.1016/j.lwt.2013.12.019
94. Wang, Z., Ju, X., He, R., Yuan, J., Wang, L.: The Effect of Rapeseed Protein Structural Modification on Microstructural Properties of Peptide Microcapsules. *Food Bioprocess Technol.* 8, 1305–1318 (2015). doi:10.1007/s11947-015-1472-5
95. O'Neill, G.J., Egan, T., Jacquier, J.C., O'Sullivan, M., Dolores O'Riordan, E.: Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. *Food Chem.* 160, 46–52 (2014). doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.002
96. O'Neill, G.J., Egan, T., Jacquier, J.C., O'Sullivan, M., Dolores O'Riordan, E.: Kinetics of immobilisation and release of tryptophan, riboflavin and peptides from whey protein microbeads. *Food Chem.* 180, 150–155 (2015). doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.131
97. Ruiz, J.C., Segura, M.R., Betancur, D., Chel, L.A.: Encapsulation of Phaseolus lunatus Protein Hydrolysate with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *ISRN Biotechnol.* 2013, 341974 (2013). doi:10.5402/2013/341974
98. Barbosa, C.M.D.S., Morais, H.A., Lopes, D.C.F., Mansur, H.S., Oliveira, M.C., Silvestre, M.P.C.: Microencapsulamento de hidrolisados de caseína em lipoesferas para mascarar o sabor amargo: avaliação físico-química e sensorial. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 38, 361–370 (2002). doi:10.1590/S1516-93322002000300012
99. Yang, S., Mao, X.Y., Li, F.F., Zhang, D., Leng, X.J., Ren, F.Z., Teng, G.X.: The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 91–97 (2012). doi:10.1007/s00217-012-1735-6
100. Allen Zhang, J.A., Pawelchak, J.: Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 357–364 (2000). doi:10.1016/S0939-6411(00)00127-2
101. da Rosa Zavareze, E., Telles, A.C., Mello El Halal, S.L., da Rocha, M., Colussi, R., Marques de Assis, L., Suita de Castro, L.A., Guerra Dias, A.R., Prentice-Hernández, C.: Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 841–848 (2014). doi:10.1016/j.lwt.2014.05.013
102. Mosquera, M., Giménez, B., Da Silva, I.M., Boelter, J.F., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C., Brandelli, A.: Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chem.* 156, 144–150 (2014). doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.011
-

103. Morais, H.A., Da Silva Barbosa, C.M., Delvivo, F.M., Mansur, H.S., De Oliveira, M.C., Silvestre, M.P.C.: Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J. Food Biochem.* 28, 21–41 (2004). doi:10.1111/j.1745-4514.2004.tb00053.x
 104. Yokota, D., Moraes, M., Pinho, S.C.: Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: A case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Brazilian J. Chem. Eng.* 29, 325–335 (2012). doi:10.1590/S0104-66322012000200013
 105. Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J., Singh, H.: Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chem.* 175, 16–24 (2015). doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.108
 106. Barbosa, C.M.S., Morais, H.A., Delvivo, F.M., Mansur, H.S., De Oliveira, M.C., Silvestre, M.P.C.: Papain hydrolysates of casein: Molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1891–1900 (2004). doi:10.1002/jsfa.1855
 107. Vázquez, J.A., Noriega, D., Ramos, P., Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pastrana, L., Reis, R.L., Pérez-Martín, R.I.: Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus* pens by a combination of enzymatic and chemical processes. *Carbohydr. Polym.* 174, 262–272 (2017). doi:10.1016/j.carbpol.2017.06.070
 108. Vázquez, J.A., Pastrana, L., Piñeiro, C., Teixeira, J.A., Pérez-Martín, R.I., Amado, I.R.: Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scyliorhinus canicula* discards. *Mar. Drugs.* 13, 6537–6549 (2015). doi:10.3390/md13106537
 109. Novoa-Carballal, R., Pérez-Martín, R., Blanco, M., Sotelo, C.G., Fassini, D., Nunes, C., Coimbra, M.A., Silva, T.H., Reis, R.L., Vázquez, J.A.: By-products of *Scyliorhinus canicula*, *Prionace glauca* and *Raja clavata*: A valuable source of predominantly 6S sulfated chondroitin sulfate. *Carbohydr. Polym.* 157, 31–37 (2017). doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.050
 110. Skoog, D; West, D; Holler, F; Crouch, S.: *Fundamentals of analytical chemistry.* Brooks/Cole (2014)
 111. Ye, D., Dawson, K.A., Lynch, I.: A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *Analyst.* 140, 83–97 (2015). doi:10.1039/c4an01276c
 112. Sreekumar, S., Goycoolea, F.M., Moerschbacher, B.M., Rivera-Rodriguez, G.R.: Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Sci. Rep.* 8, 1–11 (2018). doi:10.1038/s41598-018-23064-4
-

113. de Pinho Neves, A.L., Milioli, C.C., Müller, L., Riella, H.G., Kuhnen, N.C., Stulzer, H.K.: Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 445, 34–39 (2014). doi:10.1016/j.colsurfa.2013.12.058
114. Subhpradha, N., Shanmugam, A.: Fabrication of β -chitosan nanoparticles and its anticancer potential against human hepatoma cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 94, 194–201 (2017). doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.10.016
115. Abdel-Hafez, S.M., Hathout, R.M., Sammour, O.A.: Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. *Int. J. Biol. Macromol.* 64, 334–340 (2014). doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041
116. Grela, E., Kozłowska, J., Grabowiecka, A.: Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem.* 120, 303–311 (2018). doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
117. Wan, H., Williams, R., Doherty, P., Williams, D.F.: A study of the reproducibility of the MTT test. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5, 154–159 (1994). doi:10.1007/BF00053336
118. Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y.: Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 42, 321–324 (2007). doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006

Anexos

A. Caracterização físico-química das partículas

Neste anexo apresentam-se os resultados as análises realizadas para a caracterização físico-química das partículas, nomeadamente tamanho, PI, potencial Zeta e a mucoadesividade.

A.1 Tamanho, carga superficial e índice de polidispersão (PI)

O tamanho, a carga e o PI foram analisados através do DLS. Foram analisadas as seguintes sínteses de partículas, CH/TPP, CH/TPP/HA e CH/CS.

A.1.1 Partículas CH/TPP

Na Tabela A.1 apresentam-se os resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV), das análises realizadas a todas as sínteses CH/TPP com a respetiva média e desvio padrão.

Tabela A.1 – Resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das partículas de CH/TPP.

Tipo	Concentração (mg/mL)		Relação CH/TPP (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	TPP				
CH α	1,2	2,0	3:1	214,9	0,91	14,0
				168,7	0,92	14,5
				167,1	1,00	16,0
				172,0	0,93	10,5
				169,9	1,00	10,7
				Média	178,5	0,952
S.D	20,42	0,044	2,43			
CH α	1,2	1,2	5:1	309,8	0,273	21,9
				145,1	0,459	22,3
				155,4	0,362	20,6
				154,8	0,371	20,3
				149,6	0,445	20,3
				Média	182,9	0,382
S.D	71,04	0,075	0,95			
CH α	1,2	3,0	2:1	17,97	0,181	10,0
				339,3	0,231	19,0
				383,4	0,255	19,1

					333,5	0,297	18,0
					255,2	0,236	26,2
				Média	340,0	0,256	18,5
				S.D	53,57	0,026	5,75
					316,2	1,415	-
					327,1	1,513	-
			5:1		306,1	1,268	-
					347,5	1,119	-
					345,1	1,099	-
				Média	328,4	1,283	-
				S.D	17,97	0,181	-
					316,3	0,448	19,7
					316,6	0,428	13,0
			3:1		313,5	0,441	16,9
					314,6	0,456	20,5
					314,3	0,452	-
				Média	315,1	0,445	17,5
				S.D	1,335	0,011	3,39
					296,4	0,422	18,7
					292,4	0,388	15,8
			2:1		314,5	0,339	17,4
					305,3	0,321	18,8
					-	-	12,9
				Média	300,9	0,364	18,05
				S.D	9,842	0,046	1,403

A.1.2 Partículas CH/TPP/HA

Na Tabela A.2 apresentam-se os resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV), das análises realizadas a todas as sínteses CH/TPP/HA com a respetiva média e desvio padrão.

Tabela A.2 – Resultados dos tamanhos das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das partículas de CH/TPP/HA.

Tipo	Concentração (mg/mL)			Relação CH/HA (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	TPP	AH				
					325,0	0,35	-15,5
					352,8	0,61	-26,0
					328,6	0,28	-24,9
					329,9	0,22	-25,3
CH α	0,5	0,5	1,0	1:3			

					327,6	0,21	-25,5
				Média	332,8	0,33	-23,4
				S.D	11,33	0,16	4,46
					389,8	0,14	-20,0
					375,9	0,21	-12,9
			1:3		362,7	0,29	-12,9
					363,4	0,25	-12,9
					368,7	0,22	-16,6
				Média	372,1	0,22	-15,1
				S.D	11,22	0,06	3,19
					537,0	0,79	-20,5
					498,3	0,50	-19,0
			1:3		657,7	0,33	-18,3
					525,3	0,45	-19,9
					658,5	0,34	-19,1
				Média	591,5	0,39	-19,1
				S.D	76,82	0,19	0,85
					316,7	0,35	-22,0
					324,5	0,41	-24,0
			1:3		309,2	0,36	-22,6
					317,7	0,46	-18,9
					323,5	0,23	-22,4
				Média	317,7	0,36	-22,4
				S.D	6,148	0,08	1,88

A.1.3 Partículas CH/CS

Na Tabela A.3 apresentam-se os resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV), das análises realizadas as todas as sínteses CH/TPP/HA com a respetiva média e desvio padrão.

Tabela A.3 – Resultados do tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV), das partículas de CH/CS.

Tipo	Concentração (mg/mL)		Relação CH/CS (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
	CH	CS				
				395,5	0,51	25,7
CH α	0,5	0,5	1:1	483,8	1,02	25,0
				376,6	0,39	25,7

				393,4	0,32	23,5
				406,2	0,66	23,5
			Média	411,1	0,58	24,7
			S.D	42,00	0,28	1,11
				-	-	26,5
				-	-	26,6
			2:1	422,7	0,37	27,2
CH α	1,0	0,5		430,6	0,33	25,6
				415,0	0,38	15,4
			Média	422,8	0,36	24,3
			S.D	7,800	0,03	4,99
				257,3	0,29	64,1
				261,7	0,18	65,4
			1:1	245,6	0,33	66,0
CH β	0,5	0,5		243,5	0,36	66,6
				243,0	0,35	64,0
			Média	250,2	0,30	65,2
			S.D	8,668	0,08	1,15
				756,4	0,52	79,5
				752,2	0,45	78,3
			2:1	754,9	0,50	78,5
CH β	1,0	0,5		700,4	0,62	76,7
				743,6	0,46	78,5
			Média	741,5	0,51	78,3
			S.D	23,50	0,07	1,01

A.2 Caracterização da mucoadesividade

A caracterização da mucoadesividade das partículas foi estudada através de dois métodos, a microbalança de quartzo (QCM) e a interação das nanopartículas com as mucinas.

A.2.1 Microbalança de quartzo (QCM)

O método QCM foi realizado utilizando as sínteses escolhidas através da análise ao tamanho, carga e PI de todas as sínteses.

A Tabela A.5 representa a média e os desvios padrão das variações de frequência de cada síntese de nanopartículas. A variação é calculada através dos gráficos construídos com os valores da QCM. O gráfico exemplo está apresentado na parte dos resultados.

Tabela A.4 – Média de desvio padrão das variações de frequência da cada síntese de nanopartículas.

Amostra	Média (Hz)	Desvio padrão (Hz)
CH α /TPP	143	119
CH β /TPP	684	2
CH α /TPP/AH	269	1
CH β /TPP/AH	1313	959
CH α /CS	-24	5
CH β /CS	39	31

A.2.2 Avaliação da adesão das mucinas via tamanho das partículas e potencial Zeta

As três avaliações da interação das nanopartículas com as mucinas apresentadas a seguir, foram realizadas com as sínteses escolhidas através da análise ao tamanho, carga e PI de todas as sínteses.

Na Tabela A.5 apresenta-se o tamanho (nm) o PI e o potencial Zeta (mV) das nanopartículas e potencial Zeta (mV) das mucinas a uma concentração de 0,3 mg/mL.

Tabela A.5 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas e potencial Zeta (mV) das mucinas a uma concentração de 0,3 mg/mL.

Tipo	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
			-17,5
			-16,5
Mucinas 0,3 mg/mL	-		-14,0
			-13,9
			-10,5
Média	-	-	-14,5

Desvio Padrão	-	-	2,72
	189,9	0,263	6,0
	183,9	0,306	4,8
CH α/ TPP	178,3	0,365	6,4
	178,9	0,352	3,3
	180,1	0,335	5,2
Média	182,2	0,324	5,1
Desvio Padrão	4,814	0,041	1,21
	332,5	0,607	20,5
	-	-	18,9
CH β/ TPP	-	-	18,1
	-	-	18,5
	-	-	18,9
Média	332,5	0,607	19,0
Desvio Padrão	-	-	0,91
	358,6	0,152	-25,3
	370,4	0,200	-27,0
CH α/ TPP/ HA	357,2	0,226	-25,6
	356,1	0,230	-26,7
	362,8	0,191	-26,1
Média	361,0	0,200	-26,1
Desvio Padrão	5,827	0,031	0,72
	359,1	0,368	-30,0
	335,4	0,330	-27,7
CH β/ TPP/ HA	349,1	0,393	-26,8
	293,2	0,333	-27,5
	324,4	0,267	-27,1
Média	332,2	0,338	-27,8
Desvio Padrão	25,50	0,048	1,27
	317,0	0,390	-19,9
	327,9	0,429	-20,5
CH α/ CS	319,7	0,348	-24,5
	-	-	-21,6
	-	-	-12,7
Média	321,5	0,389	-19,8
Desvio Padrão	5,677	0,041	4,37
	336,0	0,182	30,0
CH β/ CS	314,9	0,243	27,0
	319,4	0,172	25,2

	316,1	0,196	24,4
	310,5	0,239	23,6
Média	319,4	0,206	26,0
Desvio Padrão	9,822	0,033	2,55

Na Tabela A.6 apresenta-se a concentração das mucinas (mg/ml), o tamanho (nm) o PI e o potencial Zeta (mV) dos sistemas “nanopartículas + mucinas”, com uma concentração de mucinas de 0,6 mg/mL.

Tabela A.6 – Tamanho (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas + mucinas, com uma concentração de mucinas de 0,6 mg/mL.

Tipo	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
			-4,6
			3,2
CHα/ TPP	Formação de agregados		5,4
			2,4
			5
Média	-	-	2,3
Desvio Padrão	-	-	4,04
			-0,6
			-0,8
CHβ/ TPP	Formação de agregados		-0,3
			-1,0
			-2,0
Média	-	-	-0,9
Desvio Padrão	-	-	0,65
	440,2	0,481	-12,0
	442,9	0,455	-14,3
CHα/ HA	447,1	0,310	-14,5
	436,5	0,336	-12,0
	430,1	0,333	-13,4
Média	439,4	0,383	-13,2
Desvio Padrão	6,460	0,079	1,21
	407,1	0,301	-10,8
CHβ/ HA	418,4	0,269	-12,2
	402,3	0,327	-7,30

	402,5	0,306	-7,80
	402,7	0,320	-8,10
Média	406,6	0,305	-9,24
Desvio Padrão	6,892	0,022	2,14
	-	-	-16,6
	-	-	-17,0
CHα/ CS	-	-	-15,6
	-	-	-16,7
	-	-	-17,2
Média	-	-	-16,6
Desvio Padrão	-	-	0,62
	-	-	-1,50
	-	-	0,00
CHβ/ CS	-	-	-0,20
	-	-	-1,30
	-	-	-0,40
Média	-	-	-0,68
Desvio Padrão	-	-	0,68

A.2.3 Avaliação da adesão das mucinas via ensaios colorimétricos

Na Tabela A.7, esta apresentada a concentração de mucinas (mg/mL), a absorvância a 550 nm das mucinas.

Tabela A.7 – Concentração (mg/mL) e absorvâncias a 550 nm das mucinas.

[Mucinas] (mg/mL)	Ab _{S550nm}	Ab _{S550nm} - Ab _{Sbranco}
0	0,058	0,000
0,050	0,074	0,016
0,125	0,109	0,052
0,250	0,153	0,095
0,600	0,345	0,287

A Figura A.1 representa a concentração das mucinas (mg/mL) *versus* a absorvância.

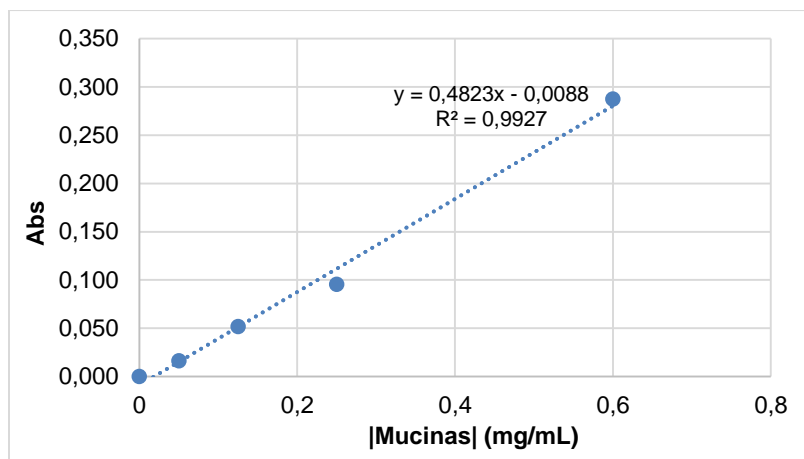


Figura A.1 – Concentração das mucinas (mg/mL) versus absorvância.

Na Tabela A.8, apresenta-se as absorvâncias a 550 nm, a concentração (mg/mL), a massa (mg) de mucina livre e percentagem de mucina ligada, com respetiva média e desvio padrão. A concentração das mucinas adicionadas é 0,6 mg/mL.

Tabela A.8 – Absorvâncias a 550 nm, concentração de mucina livre (mg/mL), massa de livre (mg) e percentagem de mucina ligada às nanopartículas com respetiva média e desvio padrão.

Amostra	Abs _{550 nm}			Mucina livre (mg/mL)			Mucina livre (mg)			% Mucina ligada (mg)			Média (%)	Desvio Padrão (%)
CHα/TPP + Mucinas	0,1 36	0,11 6	0,11 4	0,30 0	0,25 9	0,25 5	0,30 0	0,25 9	0,25 5	50	57	58	55	4
CHβ/TPP + Mucinas	0,0 92	0,13 9	0,10 2	0,20 9	0,30 6	0,23 0	0,20 9	0,30 6	0,23 0	65	49	62	59	9
CHβ/HÁ + Mucinas	0,1 68	0,18 4	0,15 6	0,36 7	0,40 0	0,34 2	0,36 7	0,40 0	0,34 2	39	33	43	38	5
CHβ/HÁ + Mucinas	0,1 94	0,20 1	0,20 3	0,24 2	0,25 0	0,25 2	0,48 4	0,49 9	0,50 3	60	58	58	58	1
CHα/CS + Mucinas	0,1 61	0,17 2	0,18 9	0,35 2	0,37 5	0,41 0	0,35 2	0,37 5	0,41 0	41	38	32	37	5
CHβ/CS + Mucinas	0,1 28	0,15 0	0,14 2	0,28 4	0,32 9	0,31 3	0,28 4	0,32 9	0,31 3	53	45	48	49	4

Exemplo de cálculo para o sistema “CHα/TPP + Mucinas”:

Através da equação da reta de calibração:

$$\text{Absorvância} = 0,4823 |\text{Mucina livre}| - 0,0088$$

Para calcular a concentração de mucina livre:

$$0,136 = 0,4823 |\text{Mucina livre}| - 0,0088$$

$$\Leftrightarrow |\text{Mucina livre}| = 0,3 \text{ mg/mL}$$

Para calcular a massa de mucina livre:

$$\text{Massa}_{\text{mucina livre}} = [\text{Mucina livre}] * \text{Volume}_{\text{Mucinas adicionadas}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa}_{\text{mucina livre}} = 0,3 * 1$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa}_{\text{mucina livre}} = 0,3 \text{ mg}$$

Para calcular a percentagem de mucina ligada:

$$\% \text{ Mucina ligada} = \frac{\text{Massa}_{\text{mucina inicial}} - \text{Massa}_{\text{mucina livre}}}{\text{Massa}_{\text{mucina inicial}}} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Mucina ligada} = \frac{0,6 - 0,3}{0,6} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Mucina ligada} = 50$$

A.2.4 Avaliação da adesão das mucinas via medição da transmitância

Na Tabela A.9, estão apresentados os valores da absorvância a 550 nm, a percentagem de transmitância e percentagem da razão entre transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e da transmitância das mucinas a uma concentração de 0,3 mg/mL, com a respetiva média e desvio padrão.

Tabela A.9 – Absorvância a 550 nm, percentagem de transmitância e percentagem da razão entre transmitância do sistema “nanopartículas + mucinas” e da transmitância das mucinas a 0,3 mg/mL, com respetiva média e desvio padrão.

Amostra	Abs _{500nm}			%T				Média	%T/T ₀			Média (%)	Desvio Padrão (%)
Mucinas 0,30 mg/mL	0,15	0,15	0,17	70	71	68	0,70	100				100	-
CHα/TPP + Mucinas	0,22	0,26	0,20	60	55	63	-	85	78	90		85	6
CHβ/TPP + Mucinas	0,18	0,21	0,18	67	62	66	-	95	88	95		93	4
CHα/HA + Mucinas	0,21	0,22	0,22	62	60	60	-	88	86	86		87	1
CHβ/HA + Mucinas	0,40	0,44	-	40	36	-	-	54	50	-		52	3
CHα/CS + Mucinas	0,23	0,24	0,25	59	58	56	-	85	83	80		83	2
CHβ/CS + Mucinas	0,57	0,56	0,57	27	27	27	-	38	39	39		39	1

Exemplo de cálculo para o sistema “CHα/TPP + Mucinas”:

Para calcular a percentagem de transmitância:

$$T = 10^{-Abs} * 100$$

$$\Leftrightarrow T = 10^{-0,22} * 100$$

$$\Leftrightarrow T = 60\%$$

Para calcular a razão entre percentagem de transmitância das “nanopartículas + mucinas” e transmitância das mucinas a 0,3 mg/mL:

$$\%T/T_0 = \frac{\%T}{Média_{Tmucinas}} * 100$$

$$\Leftrightarrow \%T/T_0 = \frac{\%T}{\text{Média transmitância mucinas}} * 100$$

$$\Leftrightarrow \%T/T_0 = \frac{60\%}{0,70}$$

$$\Leftrightarrow \%T/T_0 = 85\%$$

B. Caracterização funcional das partículas otimizadas

Neste subcapítulo, são apresentados os resultados referentes à eficiência de encapsulação do PSS, através do estudo da estabilidade das nanopartículas, estudo da permeabilidade do PSS e a avaliação da toxicidade em células Caco-2.

B.1 Otimização da eficiência de encapsulação do PSS

A otimização da eficiência de encapsulação foi realizada no HPLC. Inicialmente foram analisados diferentes concentrações do PSS para a reta de calibração e em seguida foi analisada a percentagem de encapsulação ótima do PSS na síntese de partículas escolhida.

A Figura B.1, representa a reta de calibração do PSS realizada no HPLC.

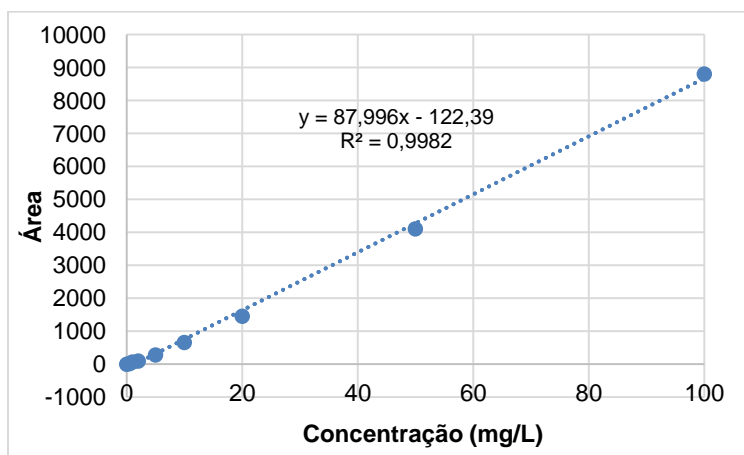


Figura B.1 – Reta de calibração referente ao PSS.

Na Tabela B.1, estão apresentados os resultados referentes às análises da eficiência de encapsulação do PSS realizadas no HPLC.

Tabela B.1 – Concentração do PSS (mg/mL), área, concentração final do PSS (mg/mL), e % PSS encapsulado.

PSS inicial (mg/ mL)	Área			PSS _{final} (mg/mL)			% Encapsulamento			Média (%)	Desvio Padrão (%)
	Ensaio			Ensaio			Ensaio				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
10	440,8	440,5	-	6,92	6,916	-	30,81	30,84	-	31	0,02
20	773,6	781,0	900,4	10,67	10,75	12,10	46,65	46,23	39,50	44	4,01
50	2304,2	2278,1	2029,2	27,92	27,63	24,82	44,16	44,75	50,36	46	3,42
100	4067,4	4100,1	4272,8	47,79	48,16	50,11	52,21	51,84	49,89	51	1,24
200	4687,8	4598,7	-	109,57	107,57	-	45,21	46,22	-	46	0,71

Exemplo de cálculo para uma concentração de PSS de 10 mg/mL, ensaio 1.

Através da equação da reta de calibração:

$$\text{Área} = 88,723 |\text{PSS}| - 173,067$$

Para calcular a concentração de PSS final:

$$440,7 = 88,723 |\text{PSS}| - 173,067$$

$$\Leftrightarrow |\text{PSS}| = 6,92 \text{ mg/mL}$$

Para saber a percentagem de PSS encapsulado:

$$\% \text{ PSS livre} = \frac{|\text{PSS inicial} - \text{PSS final}|}{|\text{PSS inicial}|} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ PSS livre} = \frac{10 - 6,92}{10} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ PSS livre} = 30,81$$

B.2 Estudo da estabilidade das partículas

O estudo da estabilidade das nanopartículas foi realizado ao longo do tempo para o tamanho das partículas (nm) e para o PI.

Na Tabela B.2, estão apresentados o tamanho das partículas (nm), o PI e o potencial Zeta (mV) do PSS nanoencapsulado, ao longo do tempo.

Tabela B.2 – Tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) do PSS nanoencapsulado, ao longo do tempo.

Data	Relação (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
05/06/2018	7:1	347,6	0,316	-26,6
		352,6	0,266	-22,6
		339,4	0,329	-26,4
		343,4	0,312	-24,7
		344,0	0,359	-23,0
	Média	344,0	0,316	-24,7
Desvio Padrão	4,966	0,034	1,86	
06/06/2018	7:1	421,7	0,381	-
		416,2	0,331	-
		428,2	0,504	-
		403,5	0,365	-
		408,5	0,358	-
	Média	416,2	0,365	-
Desvio Padrão	9,914	0,067	-	
07/06/2018	7:1	442,6	0,331	-
		440,6	0,341	-
		429,6	0,356	-
		434,7	0,294	-
		444,2	0,268	-
	Média	440,6	0,331	-
Desvio Padrão	6,067	0,036	-	
08/06/2018	7:1	537,3	0,448	-
		514,6	0,405	-
		-	-	-
		-	-	-
		-	-	-
	Média	526,0	0,427	-
Desvio Padrão	16,05	0,030	-	
12/06/2018	7:1	857,0	0,599	-23,8
		724,8	0,636	-24,8
		923,6	0,448	-23,7
		-	-	-26,3
		-	-	-22,2
	Média	857,0	0,599	-23,8
Desvio Padrão	101,19	0,100	1,51	

Na Tabela B.3, estão apresentados o tamanho das partículas (nm), o PI e o potencial Zeta (mV) das nanopartículas, ao longo do tempo.

Tabela B.3 – Tamanho das partículas (nm), PI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas, ao longo do tempo.

Data	Relação (m/m)	Tamanho (nm)	PI	Potencial Zeta (mV)
05/06/2018	1:3	372,5	0,355	-25,1
		474,2	0,455	-23,6
		367,4	0,324	-25,4
		374,6	0,223	-25,4
		367,9	0,330	-21,7
	Média	372,5	0,330	-25,1
	Desvio Padrão	46,43	0,083	1,60
06/06/2018	1:3	409,6	0,346	-
		394,1	0,350	-
		396,6	0,338	-
		398,2	0,310	-
		414,6	0,231	-
	Média	398,2	0,338	-
	Desvio Padrão	8,953	0,049	-
07/06/2018	1:3	481,9	0,397	-
		472,0	0,387	-
		467,1	0,44	-
		459,9	0,391	-
		485,2	0,322	-
	Média	472,0	0,391	-
	Desvio Padrão	10,43	0,04	-
08/06/2018	1:3	508,1	0,544	-
		495,6	0,505	-
		512,8	0,633	-
		498,6	0,395	-
		-	-	-
	Média	503,4	0,525	-
	Desvio Padrão	8,037	0,10	-
12/06/2018	1:3	656,3	0,831	-24,5
		648,3	0,938	-24,1
		-	-	-24,6
		-	-	-21,5
		-	-	-25,1
	Média	652,3	0,885	-24,5
	Desvio Padrão	5,657	0,076	1,42

Na Tabela B.4, estão apresentados o tamanho das partículas (nm), o PI e o potencial Zeta (mV) das nanopartículas com um fator de diluição de (1/5) em água, ao longo do tempo.

Tabela B.4 – Tamanho das partículas (nm), PI das nanopartículas com um fator de diluição de (1/5) em água, ao longo do tempo.

Data	Relação (m/m)	Tamanho (nm)	PI
22/06/2018	1:3	317,1	0,226
		364,9	0,607
		348,4	0,407
		333,4	0,404
		412,0	0,299
	Média	355,2	0,389
	Desvio Padrão	36,38	0,14
23/06/2018	1:3	310,2	0,352
		442,5	0,277
		284,7	0,327
		284,9	0,267
		285,5	0,280
	Média	321,6	0,301
	Desvio Padrão	68,48	0,037
25/06/2018	1:3	288,5	0,216
		280,0	0,253
		256,8	0,125
		363,1	0,377
		275,6	0,287
	Média	292,8	0,252
	Desvio Padrão	40,98	0,093
26/06/2018	1:3	273,6	0,266
		275,3	0,183
		282,3	0,17
		233,7	0,062
		280,6	0,387
	Média	269,1	0,214
	Desvio Padrão	20,11	0,121
27/06/2018	1:3	267,3	0,318
		278,0	0,28
		277,6	0,267
		282,1	0,209
		278,3	0,315
	Média	276,7	0,278

	Desvio Padrão	5,536	0,044
		281,4	0,249
		272,7	0,355
	1:3	277	0,273
29/06/2018		275	0,249
		278,7	0,242
	Média	277,0	0,274
	Desvio Padrão	3,344	0,047

B.3 Estudo da permeabilidade em células Caco-2+HT29-MTX

O estudo da permeabilidade do PSS foi realizado de duas formas, com e sem células Caco-2, por HPLC.

Os resultados do estudo da permeabilidade com as células Caco-2 encontra-se a seguir. Para o estudo da permeabilidade foi necessário construir uma reta de calibração do PSS em HBSS. Na Tabela B.5, apresenta-se a concentração de PSS (mg/L) e a sua respetiva área.

Tabela B.5 – Concentração do PSS em (mg/L) e a sua respetiva área.

Concentração (mg/L)	Área
0	0
0,05	10
0,1	18,3
0,2	33,4
0,5	84,8
1	166,8
2	319,6
5	869,1
10	1433,1
50	6309,3

Na Figura B.2, apresenta-se a concentração do PSS de 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mg/L *versus* a área.

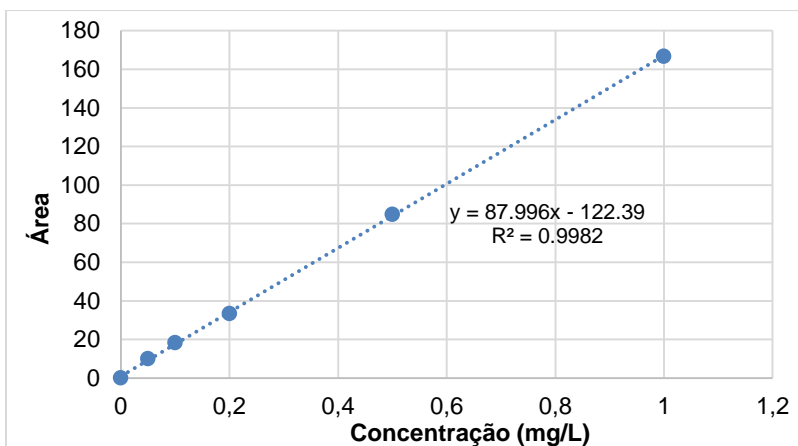


Figura B.2 – Concentração do PSS (mg/L) *versus* área.

Na Figura B.3, apresenta-se a área *versus* a concentração do PSS de 0; 1; 2; 5; 10 e 50 mg/L.

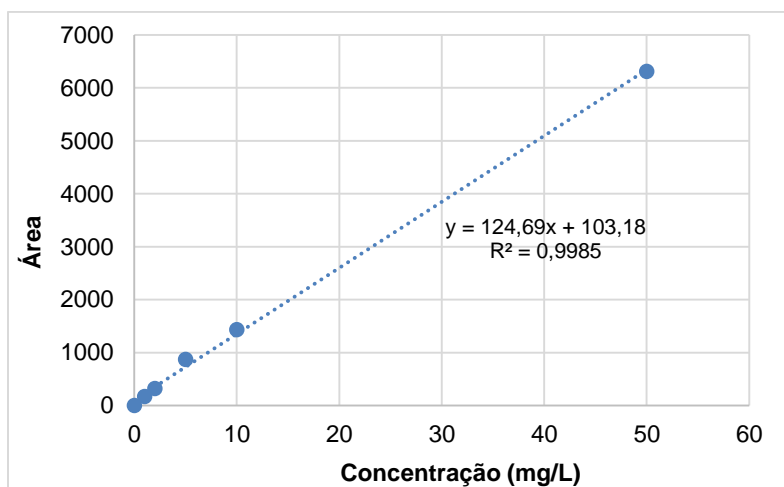


Figura B.3 – Concentração do PSS (mg/L) *versus* área.

Na Tabela B.6 estão apresentados os resultados do tempo de retenção (min), área, concentração de PSS (mg/L), massa de PSS na amostra e na basolateral (μg), para as amostras com PSS e PSS nanoencapsulado. Em que o volume da amostra é de 200 μL e o volume da basolateral é de 1,5 mL.

Tabela B.6 – Resultados do tempo de retenção (min), área, concentração de PSS (mg/L), massa de PSS na amostra e na basolateral (μg).

Amostra	Tempo (min)	Área	[PSS] (mg/L)	Massa PSS na amostra (µg)	Massa PSS na basolateral (µg)	Tempo (min)	Massa PSS na amostra (µg)	Massa PSS na basolateral (µg)	
1 hora Basolateral	1	4,887	47,1	0,28	0,06				
	PSS nanoencapsulado	2	4,783	59,4	0,35	0,07			
		3	4,786	57,2	0,34	0,07	4,812	0,06	0,47
		4	4,791	49,0	0,29	0,06			
	PSS	5	5,230	10,20	0,06	0,01			
		6	5,249	9,30	0,05	0,01	5,236	0,02	0,13
		7	5,230	26,2	0,15	0,03			
2 horas Basolateral	1	4,783	67,3	0,40	0,08				
	PSS nanoencapsulado	2	4,775	65,4	0,39	0,08			
		3	4,783	74,6	0,44	0,09	4,788	0,08	0,60
		4	4,809	61,8	0,37	0,07			
	PSS	5	5,231	10,9	0,06	0,01			
		6	5,237	17,4	0,10	0,02	5,236	0,01	0,11
		7	5,240	10,4	0,06	0,01			
3 horas Basolateral	1	4,794	83,4	0,50	0,10				
	PSS nanoencapsulado	2	4,794	73,3	0,44	0,09			
		3	4,797	87,4	0,52	0,10	4,796	0,10	0,78
		4	4,799	103,7	0,62	0,12			
	PSS	5	5,240	15,8	0,09	0,02	5,245	0,02	0,16

		6	5,256	24,5	0,14	0,03	0,21				
		7	5,240	15,3	0,09	0,02	0,13				
4 horas Basolateral		1	4,806	107,1	0,64	0,13	0,96				
	PSS nanoemulsão psulada	2	4,809	110,3	0,66	0,13	0,99	4,808	0,14	1,06	
		3	4,808	126,7	0,76	0,15	1,14				
		4	4,807	128,7	0,77	0,15	1,15				
			5	5,244	20,9	0,12	0,02	0,18			
	PSS	6	5,232	33,9	0,20	0,04	0,30	5,236	0,03	0,22	
		7	5,233	20,4	0,12	0,02	0,18				
4 horas Apical		1	4,804	87,9	0,52	0,10	0,26				
	PSS nanoemulsão psulada	2	4,801	87,3	0,52	0,10	0,26	4,798	0,10	0,25	
		3	4,798	73,1	0,43	0,09	0,22				
		4	4,789	92,8	0,55	0,11	0,28				
			5	5,432	5244,3	41,23	8,25	20,62			
	PSS	6	5,434	5583,0	43,95	8,79	21,97	5,435	8,44	21,10	
		7	5,439	5271,4	41,45	8,29	20,72				
4 horas Células		1	4,765	333,9	1,85	0,37	2,78				
	PSS nanoemulsão psulada	2	4,746	361,1	2,07	0,41	3,10	4,735	0,41	3,09	
		3	4,727	401,8	2,39	0,48	3,59				
		4	4,703	341,9	1,91	0,38	2,87				
	PSS	5	4,675	219	0,93	0,19	1,39	4,649	0,17	1,25	

		6	4,641	191,6	0,71	0,14	1,06
		7	4,630	211,3	0,87	0,17	1,30
0 horas	PSS nanoenca psulado inicial sem filtrar	1	5,097	62,1	0,37	0,07	0,18
	PSS nanoenca psulado inicial filtrado (0.45 µm)	2	5,086	62,4	0,37	0,07	0,18
	PPS inicial sem filtrar	1	5,303	5286,6	41,57	8,31	20,79
	PSS inicial filtrado (0.22 µm)	2	5,249	7598,5	60,11	12,02	30,06

Exemplo de cálculo para o tempo de 1h, PSS nanoencapsulado, amostra 1.

Quando a área tem um resultado entre 0 e 166,8, utiliza-se a reta de calibração da Figura B.2. Para áreas entre 166,8 e 6309,3 utiliza-se a reta de calibração da Figura B.3.

Através da equação da reta de calibração:

$$\text{Área} = 166,11 |\text{PSS}| - 0,998$$

Para calcular a concentração de PSS final:

$$47,1 = 166,11 |\text{PSS}| - 0,998$$

$$\Leftrightarrow |\text{PSS}| = 0,28 \text{ mg/L}$$

Para calcular a massa de PSS na amostra:

$$\text{Massa PSS na amostra} = |\text{PSS}| \times \text{Volume}_{\text{amostra}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa PSS na amostra} = 0,28 \times 0,2$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa PSS na amostra} = 0,06 \mu\text{g}$$

Para calcular a massa de PSS na amostra:

$$\text{Massa PSS na amostra} = |\text{PSS}| \times \text{Volume}_{\text{basolateral}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa PSS na amostra} = 0,28 \times 1,5$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa PSS na amostra} = 0,42 \mu\text{g}$$

Na Figura B.4 estão representados os cromatogramas do PSS nanoencapsulado, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.

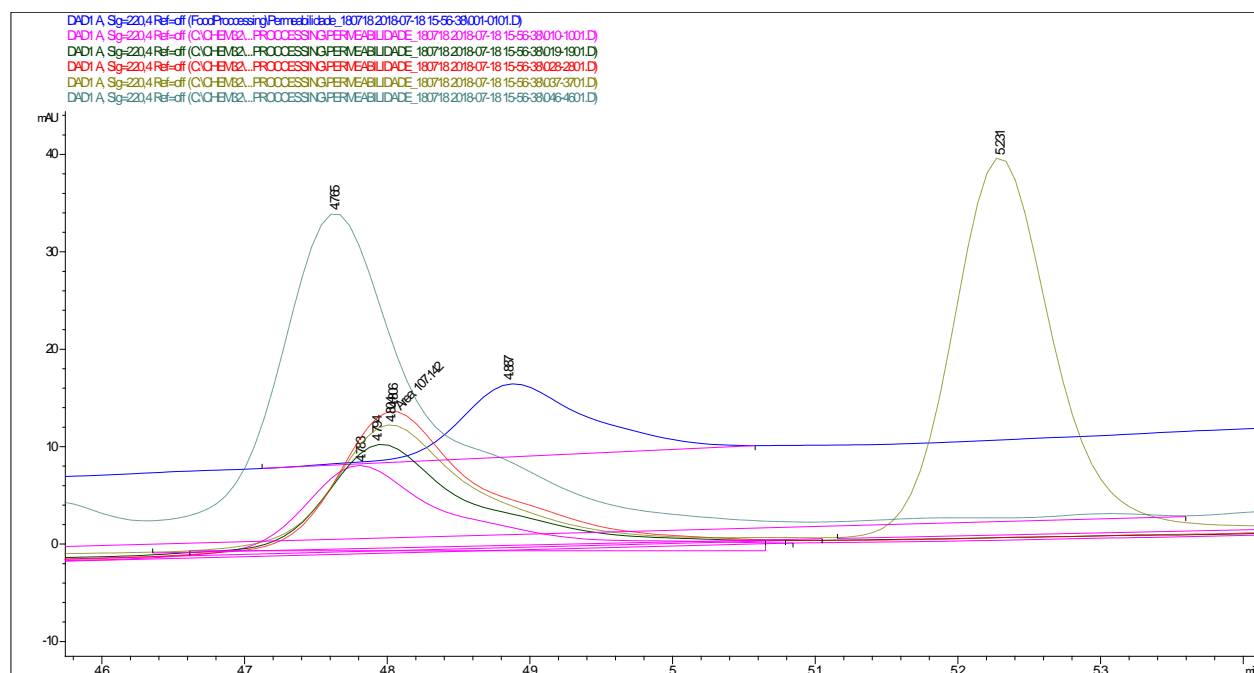


Figura B.4 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.

Na Figura B.5 e na Figura B.6 estão representados os cromatogramas do PSS, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.

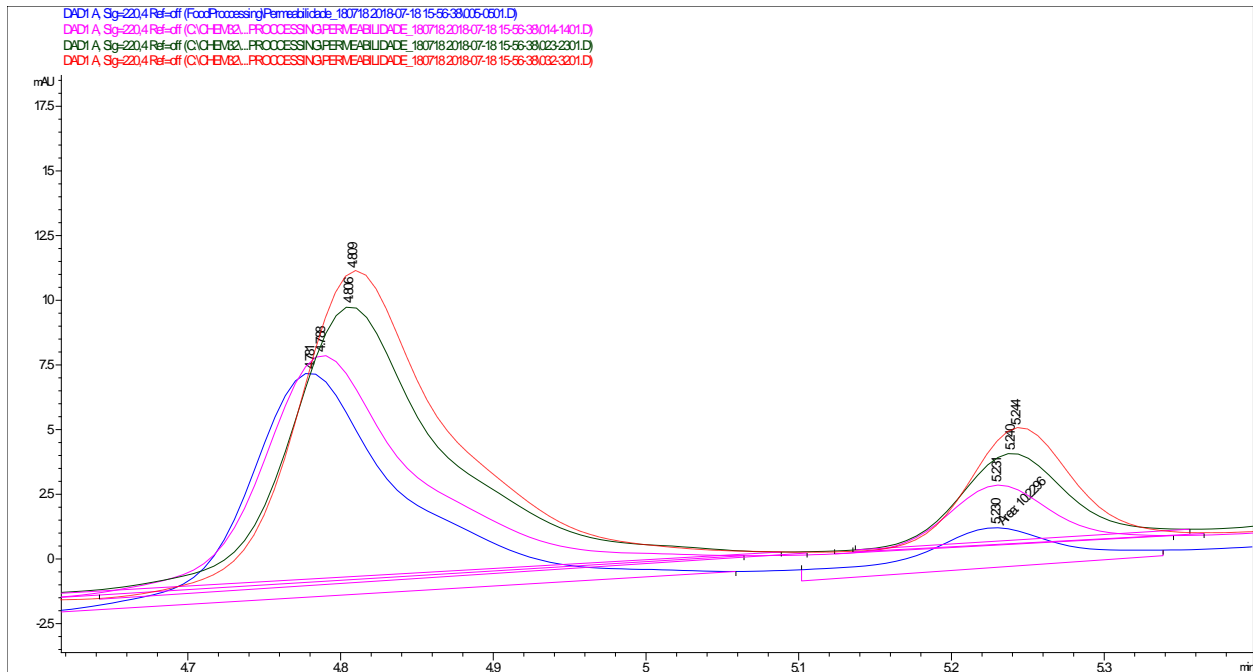


Figura B.5 – Cromatograma do PSS, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.

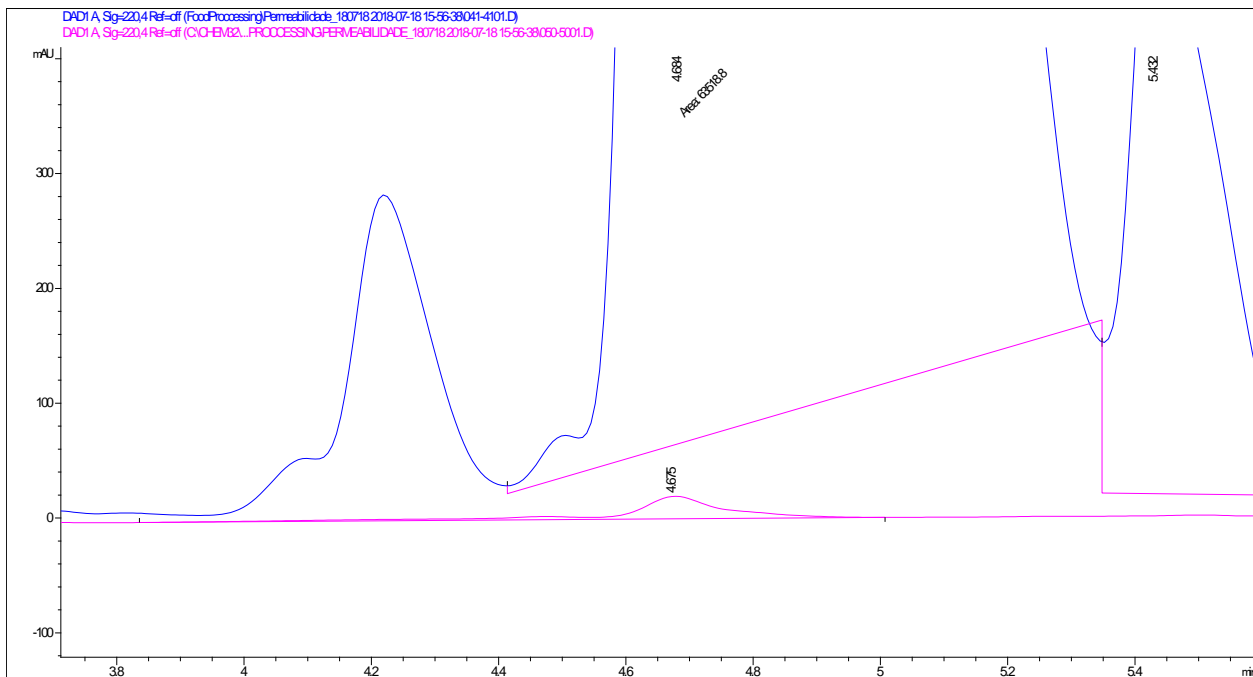


Figura B.6 – Cromatograma do PSS, dos ensaios com células, para as amostras 1 da basolateral, apical e nas células lizadas.

Na Figura B.7 estão representados os cromatogramas do PSS nanoencapsulado, dos ensaios sem células, para as amostras 8 da basolateral e apical.

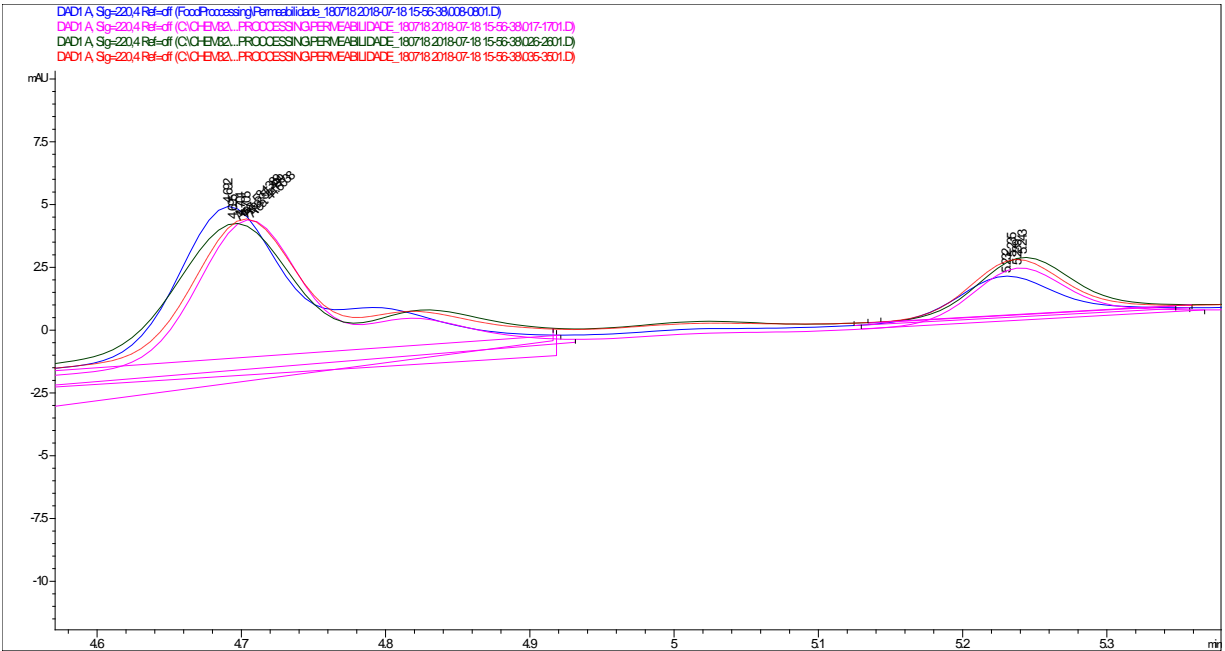


Figura B.7 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado, dos ensaios sem células, para as amostras 8 da basolateral e apical.

Na Figura B.8 estão representados os cromatogramas do PSS filtrado por 0,22 μm e não filtrado.

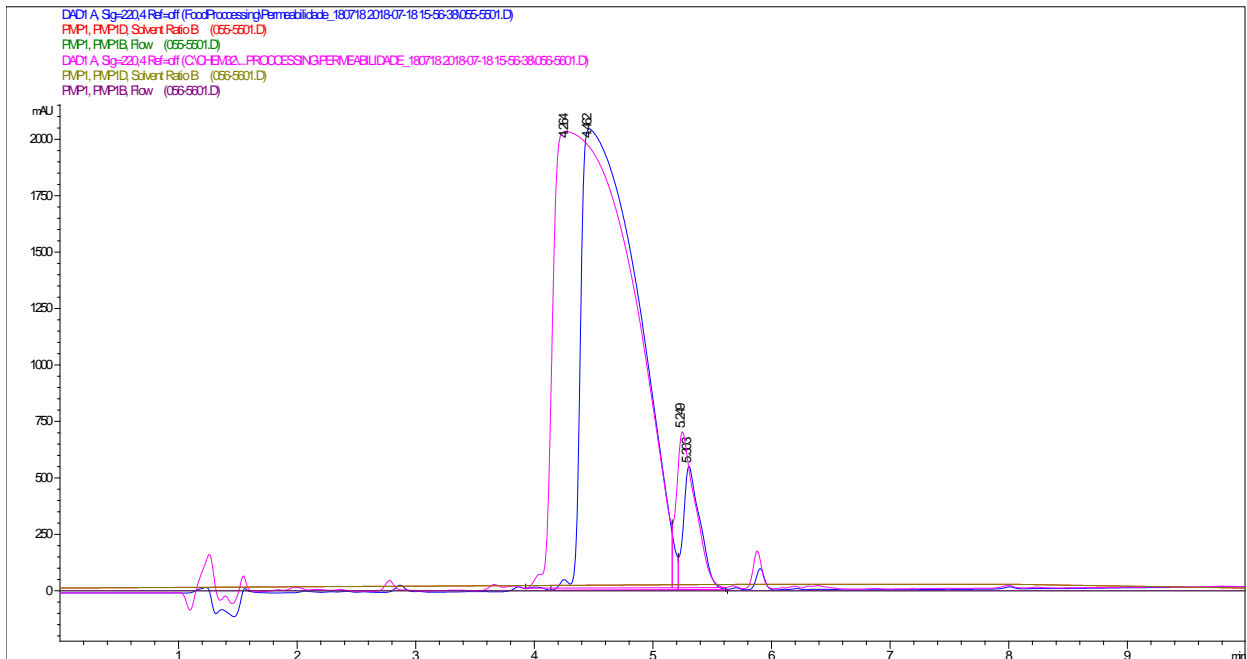


Figura B.8 – Cromatograma do PSS filtrado e não filtrado.

Figura B.9 estão representados os cromatogramas do PSS nanoencapsulado filtrado por 0,45 µm e não filtrado.

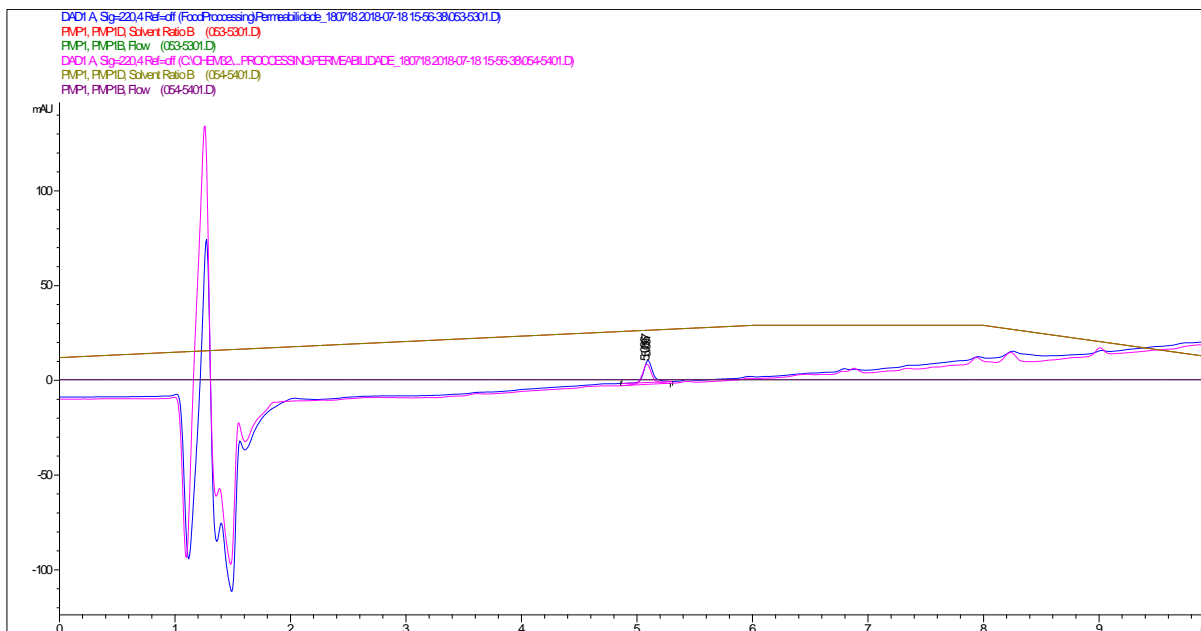


Figura B.9 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado filtrado e não filtrado.

A Figura B.10, representa a resistência elétrica transepitelial (TERR) ao longo do ensaio.

Figura B.10 – Resistência elétrica transepitelial (TEER), ao longo do ensaio.

Tempo (h)	PSS nanoencapsula do 1	PSS nanoencapsula do 2	PSS nanoencapsula do 3	PSS nanoencapsula do 4	PSS 5	PSS 6	PSS 7
0	730	766	902	670	922	873	920
1	770	772	929	860	1215	1125	1260
2	750	730	890	775	1050	995	1060
3	723	705	833	710	930	900	960
4	650	605	720	690	870	840	900
4*	650	600	730	632	805	708	730

*Medido às 4h no final das lavagens com HBSS.

A seguir, encontram-se os resultados referentes ao estudo da permeabilidade sem células Caco-2.

Na Tabela B.7, estão apresentados os valores iniciais de volume, concentração e massa do PSS.

Tabela B.7 – Volume inicial (mL), concentração inicial de PSS (mg/L) e massa inicial de PSS (μg).

Volume inicial (mL)	0,5
Concentração inicial de PSS (mg/L)	100
Massa inicial de PSS (μg)	50

Na Tabela B.8 e Tabela B.9 apresentam-se os resultados do ensaio de permeabilidade do PSS.

Tabela B.8 – Tempo (h), área com as respetivas médias, concentração (mg/L) e ($\mu\text{g/mL}$), a massa das amostras (μg).

Tempo (h)	Área			Concentração (mg/L) = ($\mu\text{g/mL}$)			Massa das amostras em 200 μL (μg)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
1	550,3	654,6	710,1	8,15	9,33	9,95	1,63	1,87	1,99
2	728,6	798,6	820,5	10,16	10,95	11,20	2,03	2,19	2,24
3	803,7	879,0	906,0	11,01	11,86	12,16	2,20	2,37	2,43
4	891,4	908,3	920,8	12,00	12,19	12,33	2,40	2,44	2,47

Tabela B.9 – Massa total de PSS acumulado (μg) e a percentagem de PSS que passa a membrana, respetivas médias e desvios padrão.

Massa total de péptido acumulado (μg)					% Péptido que passa a membrana				
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
12,23	13,99	14,93	13,72	1,37	24,5	28,0	29,9	27	2,74
16,87	18,29	18,79	17,99	0,99	33,7	36,6	37,6	36	1,99
18,55	19,98	20,48	19,67	1,00	37,1	40,0	41,0	39	2,01

20,20	20,65	20,93	20,59	0,37	40,4	41,3	41,9	41	0,74
-------	-------	-------	-------	------	------	------	------	----	------

O exemplo de cálculo a seguir refere às tabelas Tabela B.8 e Tabela B.9.

Exemplo de cálculo para o tempo de 1h, ensaio 1.

Através da equação da reta de calibração:

$$\text{Área} = 88,723 |\text{PSS}| - 173,067$$

Para calcular a concentração de PSS final:

$$550,3 = 88,723 |\text{PSS}| - 173,067$$

$$\Leftrightarrow |\text{PSS}| = 8,15 \mu\text{g/mL}$$

A massa das amostras num volume de 200 μL :

$$\text{Massa das amostras} = |\text{PSS}| * V_{\text{retirado}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa das amostras} = 8,15 * 0,2$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa das amostras} = 1,63 \mu\text{g}$$

A massa total acumulada:

$$\text{Massa total de PSS acumulado} = |\text{PSS}| * V_{\text{HBSS total}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa total de PSS acumulado} = 8,15 * 1,5$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa total de PSS acumulado} = 12,23 \mu\text{g}$$

$$\text{Massa total de PSS acumulado} = |\text{PSS}| * V_{\text{HBSS total}}$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa total de PSS acumulado} = 8,15 * 1,5$$

$$\Leftrightarrow \text{Massa total de PSS acumulado} = 12,23 \mu\text{g}$$

Para calcular a massa total de PSS acumulado dos tempos seguintes, soma-se à massa das amostras a massa das amostras a (200 μL).

A percentagem de PSS que passa pela membrana é calculada por:

$$\% \text{ PSS que passa a membrana} = \frac{\text{Massa total de PSS acumulado}}{\text{Massa de PSS inicial}}$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ PSS que passa a membrana} = \frac{12,23}{50,00}$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ PSS que passa a membrana} = 24,5$$

B.4 Avaliação da toxicidade em células Caco-2

A avaliação da toxicidade foi realizada através do método do MTT e do método da resazurina, em tempos de incubação de 4 e 24h.

Na Tabela B.10 e na Tabela B.11 apresentam-se os valores das absorvâncias com um λ - 570 nm, para o ensaio 1 e 2 com MTT para 4h.

Tabela B.10 – Absorvâncias a 570 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 1.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,123	0,461	0,456	0,448	0,454	0,461
B	0,118	0,449	0,46	0,454	0,462	0,453
C	0,129	0,443	0,452	0,444	0,454	0,457
D	0,121	0,415	0,424	0,419	0,431	0,448

Tabela B.11 – Absorvâncias a 570 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 2.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,115	0,37	0,62	0,376	0,441	0,398
B	0,110	0,382	0,426	0,419	0,429	0,402
C	0,113	0,392	0,399	0,425	0,398	0,408
D	0,119	0,391	0,383	0,405	0,384	0,424

Na Tabela B.12 e na Tabela B.13 apresentam-se os valores das absorvâncias λ - 690 nm, para o ensaio 1 e 2 com MTT para 4h.

Tabela B.12 – Absorvâncias a 690 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 1.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,123	0,111	0,115	0,112	0,112	0,11
B	0,107	0,104	0,111	0,109	0,112	0,107
C	0,115	0,113	0,117	0,106	0,124	0,108
D	0,105	0,096	0,103	0,090	0,097	0,098

Tabela B.13 – Absorvâncias a 690 nm, para 4h de incubação, para o ensaio 2.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,101	0,092	0,252	0,096	0,117	0,098
B	0,097	0,115	0,112	0,102	0,116	0,103
C	0,1	0,105	0,095	0,107	0,103	0,122
D	0,101	0,115	0,098	0,106	0,115	0,129

Na Tabela B.14 e Tabela B.15 estão apresentados os valores das subtrações das absorvâncias, média e desvio padrão do meio de cultura, do ensaio com MTT para 4h, para o ensaio 1 e 2.

Tabela B.14 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão do meio de incubação, para 4h de contacto, para o ensaio 1.

A570-A690	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,000	0,350	0,341	0,336	0,342	0,351
B	0,011	0,345	0,349	0,345	0,350	0,346
C	0,014	0,330	0,335	0,338	0,33	0,349
D	0,016	0,319	0,321	0,329	0,334	0,350
Média	-	0,336	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	0,014	-	-	-	-

Tabela B.15 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão do meio de cultura, para 4h de incubação, para o ensaio 2.

A570-A690	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,014	0,278	0,368	0,28	0,324	0,3
B	0,013	0,267	0,314	0,317	0,313	0,299
C	0,013	0,287	0,304	0,318	0,295	0,286
D	0,018	0,276	0,285	0,299	0,269	0,295
Média	-	0,277	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	0,008	-	-	-	-

Na Tabela B.16 apresentam-se os resultados dos cálculos efetuados para a percentagem de viabilidade celular, no ensaio com MTT para 4h, para os ensaios 1 e 2.

Tabela B.16 – Percentagem de viabilidade celular, média e respetivo desvio padrão para 4h de incubação, para o ensaio 1 e 2.

% Viabilidade celular	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
Ensaio 1	0,000	104,2	101,5	100,0	101,8	104,5
	3,274	102,7	103,9	102,7	104,2	103,0
	4,167	98,21	99,7	100,6	98,2	103,9
	4,762	94,94	95,5	97,9	99,4	104,2
Ensaio 2	5,054	132,9	100,4	101,1	117,0	108,3
	4,693	113,4	96,40	114,4	113,0	107,9
	4,693	109,7	103,6	114,8	106,5	103,2
	6,498	102,9	99,6	107,9	97,10	106,5
Média	4,143	107,37	100,08	104,93	104,65	105,19
Desvio Padrão	1,901	11,855	3,024	6,631	7,172	2,091

O cálculo para a percentagem de viabilidade celular é o mesmo para as 4 e 24h de incubação e o exemplo encontra-se depois das tabelas para as 24h de contacto.

Na Tabela B.17 e na

Tabela B.18 apresentam-se os valores das absorvâncias com um λ de 570 nm, para o ensaio 1 e 2 com MTT para 24h.

Tabela B.17 – Absorvâncias a 570 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 1.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,116	0,532	0,54	0,606	0,563	0,506
B	0,143	0,519	0,508	0,505	0,5	0,458
C	0,149	0,506	0,487	0,448	0,445	0,467
D	0,128	0,413	0,44	0,471	0,475	0,441

Tabela B.18 – Absorvâncias a 570 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 2.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,105	0,622	0,586	0,588	0,581	0,594
B	0,100	0,583	0,562	0,600	0,532	0,550
C	0,098	0,613	0,528	0,554	0,495	0,503
D	0,120	0,482	0,472	0,471	0,519	0,526

Na Tabela B.19 e na Tabela B.20 apresentam-se os valores das absorvâncias com λ - 690 nm, para o ensaio 1 e 2 com MTT para 24h.

Tabela B.19 – Absorvâncias a 690 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 1.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,108	0,099	0,104	0,138	0,135	0,119
B	0,137	0,105	0,106	0,105	0,113	0,103
C	0,134	0,114	0,104	0,087	0,108	0,107
D	0,113	0,083	0,098	0,100	0,103	0,099

Tabela B.20 – Absorvâncias a 690 nm, para 24h de incubação, para o ensaio 2.

	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,094	0,148	0,126	0,165	0,126	0,135
B	0,087	0,123	0,123	0,165	0,101	0,121
C	0,088	0,162	0,123	0,118	0,079	0,104
D	0,102	0,086	0,096	0,089	0,112	0,101

Na Tabela B.21 e Tabela B.22 estão apresentados os valores das subtrações das absorvâncias, a média e desvio padrão do meio de cultura, do ensaio com MTT para 24h, para o ensaio 1 e 2.

Tabela B.21 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão para o meio de cultura, às 24h de contacto, para o ensaio 1.

A570-A690	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,008	0,433	0,436	0,468	0,428	0,387
B	0,006	0,414	0,402	0,400	0,387	0,355
C	0,015	0,392	0,383	0,361	0,337	0,360
D	0,015	0,330	0,342	0,371	0,372	0,342
Média	-	0,392	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	0,045	-	-	-	-

Tabela B.22 – Subtração das absorvâncias dos λ de 570 e 690 nm, média e o respetivo desvio padrão para o meio de cultura, às 24h de contacto, para o ensaio 2.

A570-A690	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	0,011	0,474	0,460	0,423	0,455	0,459
B	0,013	0,460	0,439	0,435	0,431	0,429
C	0,010	0,451	0,405	0,436	0,416	0,399

D	0,018	0,396	0,376	0,382	0,407	0,425
Média	-	0,445	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	0,034	-	-	-	-

Na Tabela B.23 apresentam-se os resultados dos cálculos efetuados para a percentagem de viabilidade celular, no ensaio com MTT para 24h, para o ensaio 1 e 2.

Tabela B.23 – Percentagem de viabilidade, média e respetivo desvio padrão às 24h de contacto, para o ensaio 1 e 2.

% Viabilidade celular	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
Ensaio 1	2,04	110,4	111,2	119,3	109,1	98,66
	1,53	105,5	102,5	102,0	98,66	90,50
	3,82	99,94	97,64	92,03	85,91	91,78
	3,82	84,13	87,19	94,58	94,84	87,19
Ensaio 2	2,47	103,31	106,46	95,00	102,2	103,09
	2,92	98,60	103,31	97,70	96,80	96,35
	2,25	90,96	101,29	97,92	93,43	89,61
	4,04	84,45	88,94	85,79	91,41	95,45
Média	2,86	97,16	99,816	98,04	96,54	94,08
Desvio Padrão	0,943	9,727	8,262	9,820	7,032	5,274

Exemplo de cálculo para as 24h, amostra A para DMSO, do ensaio 1.

Para calcular a percentagem de viabilidade celular:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Abs}_{\text{Tabela B.18}}}{\text{Média Abs}_{\text{B.18 meio cultura}}} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Viabilidade celular} = \frac{0,008}{0,392} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Viabilidade celular} = 2,04$$

Na Tabela B.24 apresentam-se os valores das absorvâncias a 560 e 590 nm, média e o desvio padrão do meio de cultura do ensaio com resazurina para 4h, para o ensaio 2.

Tabela B.24 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 4h de incubação, para o ensaio 2.

Ganho 70	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	5479	15038	15396	14552	15319	15317
B	5422	14279	14596	17121	17206	14981
C	5422	14962	14439	14981	-	13018
D	5570	-	13138	-	-	-
Média	-	14760	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	418	-	-	-	-

Na Tabela B.25 e Tabela B.26 apresentam-se os valores das absorvâncias a 560 e 590 nm, média e o desvio padrão do meio de cultura do ensaio com resazurina para 24h, para o ensaio 1 e 2.

Tabela B.25 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 24h de incubação, para o ensaio 1.

Ganho 80	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
A	8990	73078	69800	74076	77822	75958
B	8421	72749	69554	76483	76465	75855
C	8145	71270	74075	76455	78348	79069
D	8196	70755	72809	76136	77293	80171
Média	-	71963	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	1125,5	-	-	-	-

Tabela B.26 – Absorvâncias a 560 e 590 nm, média e respetivo desvio padrão do meio de cultura para 24h de incubação, para o ensaio 2.

Ganho 70	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
----------	------	--------------	----------------------	-----	----------------	---------------------

A	5161	47759	35779	52554	49808	49219
B	5218	48863	32718	46906	51771	48007
C	5121	38319	30836	47429	38871	49223
D	5184	-	-	-	-	-
Média	-	44980	-	-	-	-
Desvio Padrão	-	5795	-	-	-	-

Na Tabela B.27 apresentam-se os resultados dos cálculos efetuados para a percentagem de viabilidade celular, no ensaio com resazurina para 4h, para o ensaio 2.

Tabela B.27 – Percentagem de viabilidade, média e respetivo desvio padrão para 4h de incubação, para o ensaio 2.

% Viabilidade celular	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
Ensaio 2	37,12	101,89	104,31	98,59	103,8	103,78
	36,74	96,74	98,89	116,0	116,6	101,50
	36,74	101,37	97,83	101,5	-	88,20
	37,74	-	89,01	-	-	-
Média	37,09	100,00	97,51	105,36	110,18	97,83
Desvio Padrão	0,472	2,835	6,338	9,326	9,037	8,415

Na Tabela B.28 apresentam-se os resultados dos cálculos efetuados para a percentagem de viabilidade celular, no ensaio com resazurina para 24h, para o ensaio 1 e 2.

Tabela B.28 – Percentagem de viabilidade celular para 24h de incubação.

% Viabilidade celular	DMSO	Meio cultura	10% H ₂ O	PSS	Nanopartículas	PSS nanoencapsulado
Ensaio 1	12,49	101,5	96,99	102,9	108,1	105,6
	11,70	101,1	96,65	106,3	106,3	105,4
	11,32	99,04	102,9	106,2	108,9	109,9
	11,39	98,32	101,2	105,8	107,4	111,4
Ensaio 2	11,47	106,18	79,54	116,84	110,7	109,42

	11,60	108,63	72,74	104,28	115,1	106,73
	11,38	85,19	68,55	105,44	86,42	109,43
	11,53	-	-	-	-	-
Média	11,61	99,99	88,37	106,82	106,14	108,27
Desvio Padrão	0,377	7,519	14,339	4,579	9,159	2,340

Exemplo de cálculo para as 24h, amostra A para DMSO, do ensaio 1.

Para calcular a percentagem de viabilidade celular:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Abs}_{\text{Tabela B.22}}}{\text{Média Abs}_{\text{B.22 meio cultura}}} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Viabilidade celular} = \frac{8990}{71963} * 100$$

$$\Leftrightarrow \% \text{ Viabilidade celular} = 12,49$$

C. Estudo *in vitro* do efeito do encapsulamento do PSS na sua estabilidade em condições gastrointestinais

As amostras do estudo do efeito do encapsulamento do PSS em condições gastrointestinais foram analisadas por HPLC.

Na Figura C.1 está apresentado o cromatograma do PSS a 50 mg/L para a fase oral e gástrica.

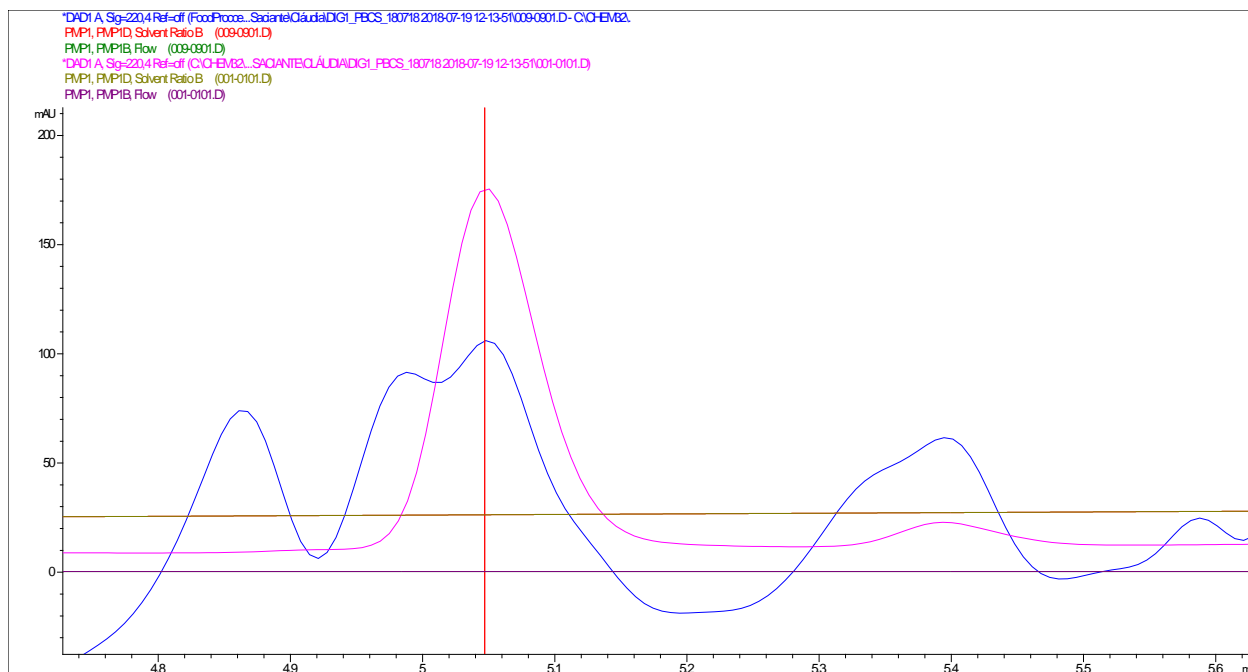


Figura C.1 – Cromatograma do PSS a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e gástrica respetivamente. O pico assinalado com a linha vermelha representa o PSS.

Na Figura C.2 está apresentado o cromatograma do PSS a 50 mg/L para a fase oral e intestinal.

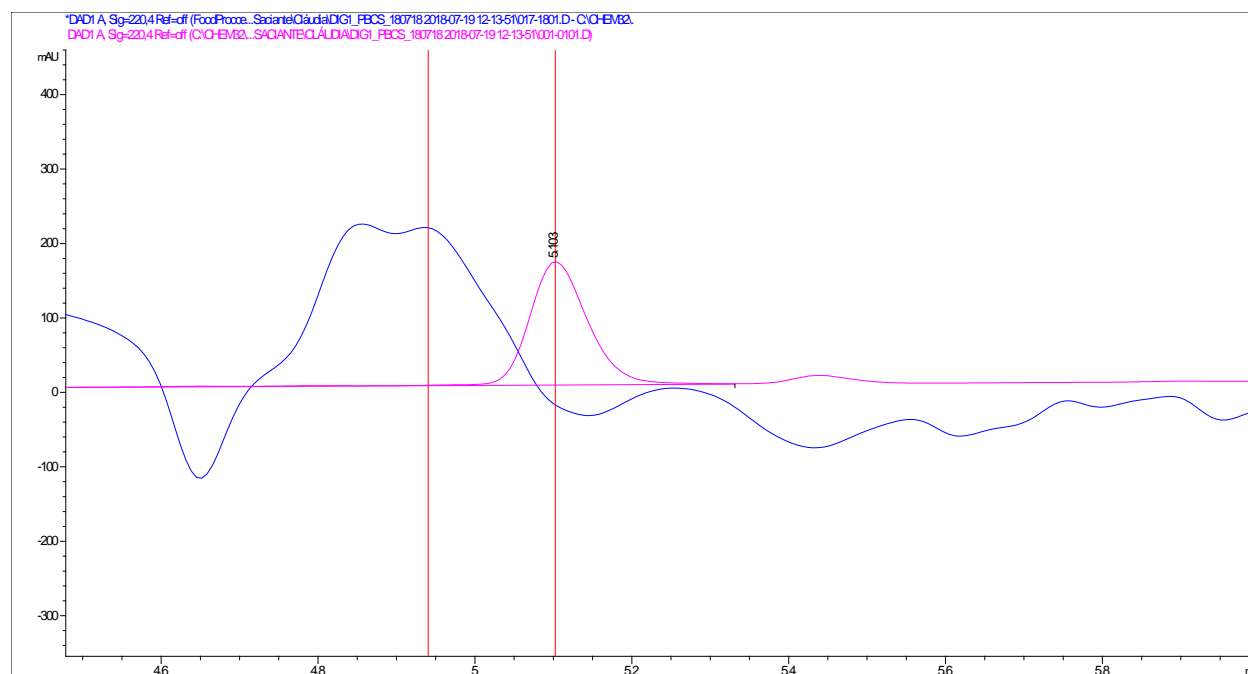


Figura C.2 – Cromatograma do PSS a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e intestinal respetivamente. Os picos assinalados com a linha vermelha representam o PSS.

Na Figura C.3 está apresentado o cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L para a fase oral e gástrica.

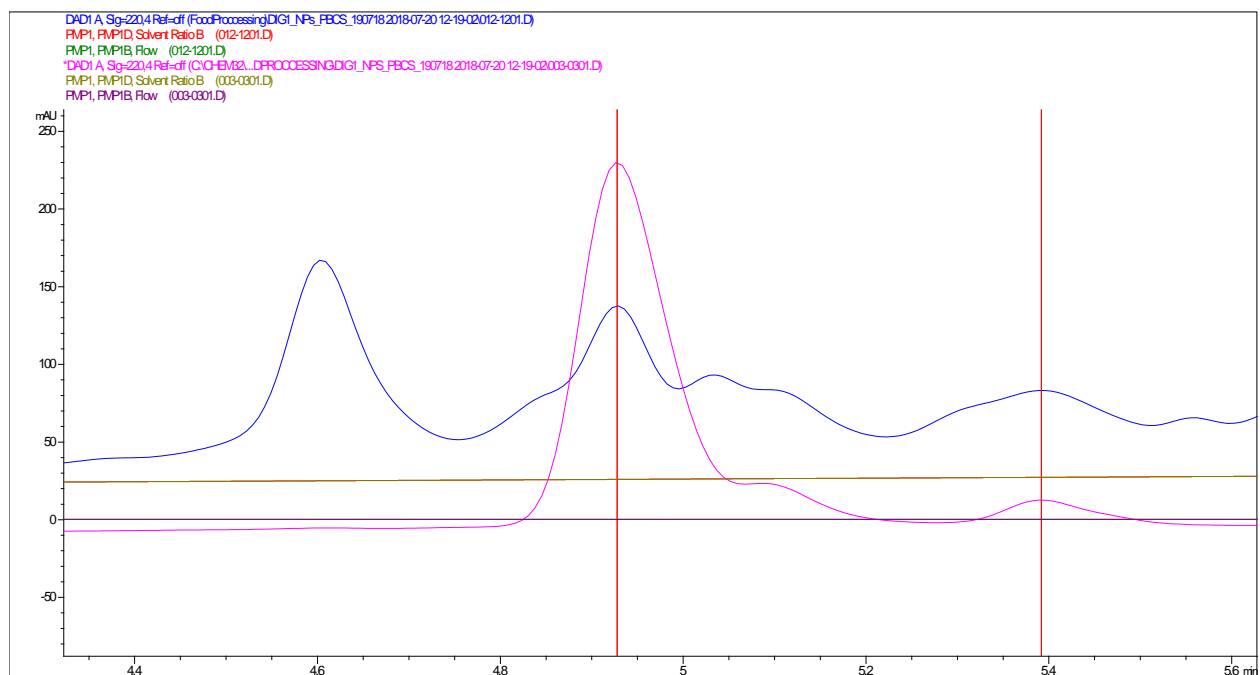


Figura C.3 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e gástrica respetivamente. Os picos assinalados com a linha vermelha representam o PSS.

Na Figura C.4 está apresentado o cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L para a fase oral e intestinal.

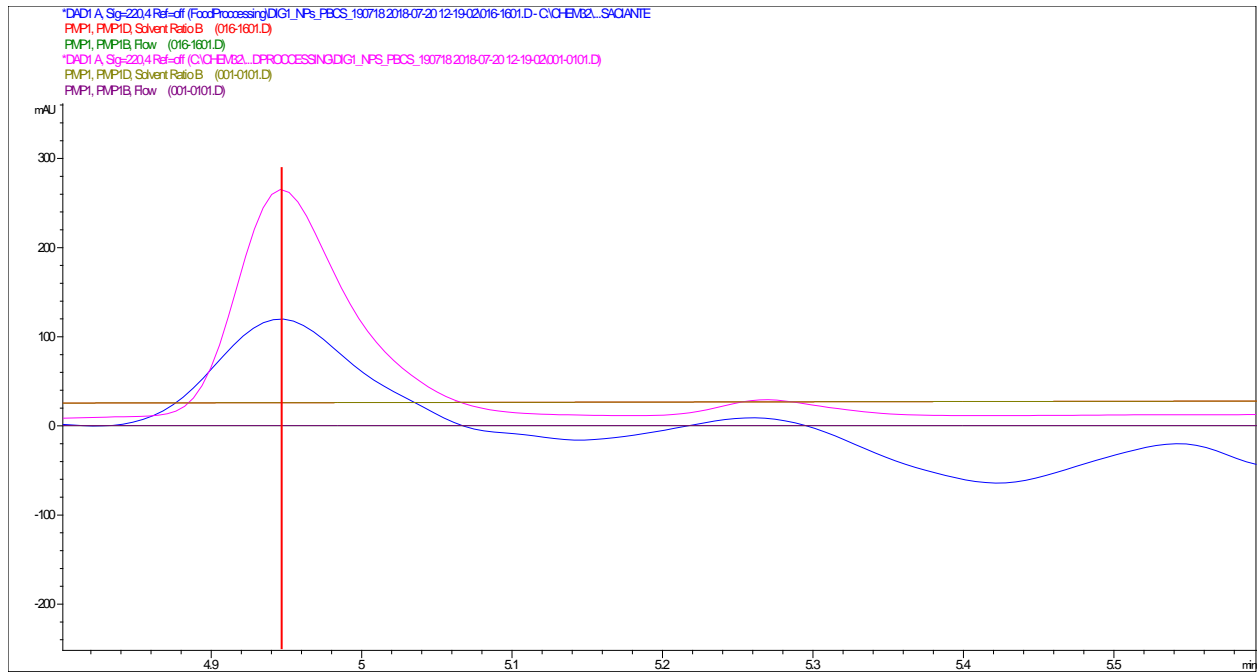


Figura C.4 – Cromatograma do PSS nanoencapsulado a 50 mg/L. As linhas rosa e azul representam a fase oral e intestinal respetivamente. O pico assinalado com a linha vermelha representa o PSS.