



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga

CAROLINE SANTOS ALVES DE LIMA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo
2023

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga

Versão Corrigida

CAROLINE SANTOS ALVES DE LIMA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo
2023

Fonte de Financiamento: Processos nº 2019/01315-1 e 2021/09636-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

SANTOS ALVES DE LIMA, C. ***Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga.*** 2023. 101 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos Alves de Lima, Caroline

Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga. / Caroline Santos Alves de Lima; orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2023.

101 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. câncer de bexiga. 2. papaína. 3. hidrogel. 4. gencitabina. 5. terapia intravesical. I. Lugão, Ademar Benévolo, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Caroline Santos Alves de Lima

Título: Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 15/ 05/ 2023

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Amedea Barozzi Seabra

Instituição: Universidade Federal do ABC

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Wagner José Fávaro

Instituição: UNICAMP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Mônica Beatriz Mathor

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amélia e Eduardo, que nunca mediram esforços para me apoiar em todos os passos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp pelas bolsas de estudos concedidas - Processos número 2019/01315-1 (bolsa no país) e número 2021/09636-1 (BEPE – Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior).

A Deus e aos guias espirituais que me fortaleceram sempre que os caminhos pareceram difíceis demais.

A minha mãe Amélia por sempre acreditar no meu potencial, me apoiar incondicionalmente, e me resgatar tantas vezes. Ao meu pai, Eduardo, por estar sempre ao meu lado, por me dar o suporte necessário para seguir na vida acadêmica e não desistir de mim. À minha irmã, Giovanna, que sempre foi fonte de inspiração e que sempre me ajudou a ver o meu lado bom. À minha avó, Maria de Lourdes (*in memoriam*), que sempre me incentivou a estudar e nunca deixou de me proteger. O amor da minha família é o principal responsável por toda e qualquer conquista da minha vida. Obrigada por serem meu alicerce, meu lar e minha luz. Meu amor por vocês é indescritível.

Ao Professor Ademar B. Lugão pela oportunidade de fazer um doutorado, de compor uma equipe extraordinária e por todas as portas que ele me abriu.

Ao Dr. Leopoldo do departamento de Urologia do Hospital das Clínicas pelas valiosas discussões e assessorias no desenvolvimento do projeto.

Aos Professores Carmen Alvarez-Lorenzo e Angel Concheiro por terem me aceitado em seu grupo de pesquisa, no Laboratório I+D Farma, na Universidade de Santiago de Compostela (Espanha), onde pude realizar parte substancial deste trabalho e conhecer pessoas maravilhosas.

Aos Doutores Gustavo Henrique Costa Varca, Lucas Freitas de Freitas e Isabel Hermida-Rial por terem oferecido muito mais que orientação para o desenvolvimento deste trabalho, mas serem verdadeiros exemplos de liderança. Obrigada por cada reunião, cada conselho, cada revisão e cada palavra que vocês dedicaram a mim. Obrigada pela amizade. Vocês são pessoas que me fazem acreditar numa academia com futuro humanizado e de extrema qualidade.

Aos amigos do laboratório Nanothera (Justine, Kamila, Cássia, Gabriela, Adriana, Ana Paula, Lucas, Gustavo, Aryel, Victória, Fabi, Thayná e Murilo) que desde o primeiro dia me receberam de forma muito carinhosa e que foram fundamentais em todo o processo de desenvolvimento do doutorado. Nos momentos difíceis vocês me ajudaram a encontrar soluções, e nos momentos felizes vocês organizaram surpresas, compartilharam risadas, me deram muitos abraços e tornaram cada dia de trabalho infinitamente melhor. Eu tenho consciência do tamanho da minha sorte por compor uma equipe tão unida que chega cada vez mais longe porque sabe trabalhar junto. Obrigada por tudo e por tanto. Eu amo vocês.

Aos amigos do laboratório I+D Farma (Isa, Ana Filipa, Iago, María V., Patri Blanco, Axel, Xian, Diana, Inês, Rita, Shorooq, Rodrigo, Maria de Lucca, Mariana) que também foram extremamente queridos e solícitos comigo no meu período de intercâmbio. Obrigada por me receberem, me integrarem e me ajudarem todos os dias. Eu vivi o melhor ano da minha vida ao lado de vocês. Obrigada por todo o aprendizado, apoio, risadas, jantares e cafés. *Os quiero siempre!*

Aos técnicos João, Takeshi e Valdelei por todo o suporte fantástico à pesquisa e ao nosso laboratório. Agradeço também pelos cafés, almoços, conversas, confraternizações e, mais que tudo, pela amizade. Vocês são pessoas especiais!

Aos funcionários do irradiador multipropósito Paulinho e Juan que foram sempre muito solícitos. À secretária de pós-graduação do IPEN, Bruna Roque, por todo o suporte e eficiência.

À minha psicóloga Sofia que me ajudou a me reencontrar e a manter o equilíbrio emocional durante essa jornada. Obrigada por me ajudar a lidar comigo mesma, com as dificuldades de se fazer pesquisa no Brasil, com um período tão turbulento como a pandemia da covid-19 e com todos os medos que eu encontrei nesse caminho. Obrigada por abrir minha mente, meus olhos, meu coração e me possibilitar ser a melhor versão de mim.

A todos os amigos que a vida me presenteou (no Brasil, em Portugal e na Espanha), e que me fazem lembrar sempre que eu tenho muita sorte. Vocês tornam a vida mais leve e feliz. Carolina, Luísa, Vivian, Thaís, Hernane, Cátia, Ticiano, Érika, Santiago, Toa, Marga, Fábio, Juliana, eu amo vocês.

Ao meu namorado, Martín Alvarez, que resgatou minha fé no amor e se tornou meu lar do outro lado do atlântico. Obrigada por ter me acolhido sempre que precisei e me ajudado a chegar ao fim desta etapa. Te amo, *cariño*.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.” Cora Coralina

RESUMO

LIMA, Caroline S. A. **Desenvolvimento de hidrogéis biodegradáveis e mucoadesivos para a liberação controlada de drogas para o tratamento de câncer de bexiga**. 2023. 101 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

O câncer de bexiga é o décimo tipo de carcinoma mais comum no mundo e representa cerca de 2.1% das mortes por câncer. O tratamento do câncer de bexiga se dá, primeiramente, por uma ressecção transuretral para a remoção do tumor visível, seguida por quimioterapia intravesical, de acordo com o estágio da doença. Entretanto, a instilação de medicamentos na bexiga humana apresenta alguns desafios, dentre os quais se destacam a permeação do ativo no urotélio - que é um tecido altamente impermeável – e o tempo de residência desse fármaco, que é limitado devido à presença da urina que acaba o diluindo e lavando-o completamente. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver estratégias para aumento da adesão, permeação e tempo de residência da terapia intravesical por meio da aplicação de hidrogéis mucoadesivos para administração de quimioterápicos como o cloridrato de gencitabina. A papaína, uma enzima proteolítica capaz de quebrar pontes peptídicas presentes nas glicoproteínas que compõem a mucina, foi adicionada aos géis com o intuito de favorecer a permeação do quimioterápico. Neste trabalho foi proposta a utilização dos polímeros goma gelana, CMC (carboximetilcelulose) e PVA (polivinil álcool) para o preparo dos hidrogéis em virtude de propriedades como ausência de toxicidade, elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os hidrogéis foram estudados e avaliados em relação à sua mucoadesividade e comportamento reológico. Também foram analisadas possíveis interações entre o ativo e as matrizes. Ensaios biológicos preliminares foram realizados visando fornecer conhecimento específico sobre a biocompatibilidade do material, a fim de investigar a segurança para um futuro uso clínico. As formulações apresentaram resultados promissores, com capacidade de mucoadesão, retenção no urotélio e interação com a mucina presente na mucosa da bexiga. A liberação do ativo foi sustentada por até 8 horas, prolongando de forma significativa o tratamento atualmente disponível que, de maneira geral, se limita ao tempo em que é possível evitar a micção do paciente. A permeabilidade das formulações também foi aumentada na presença da papaína. Além disso, as formulações apresentaram comportamento reológico pseudoplástico e, portanto, adequado para aplicação intravesical. Os ensaios de biocompatibilidade mostraram baixa ou nenhuma citotoxicidade e não irritabilidade por parte das formulações, indicando potencialidade para futuros estudos pré-clínicos. Desta forma, as formulações propostas podem representar uma alternativa de tratamento associado a uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Palavras-chave: Câncer de bexiga, Papaína, hidrogel, gencitabina, terapia intravesical

ABSTRACT

LIMA, Caroline S. A. **Development of biodegradable and mucoadhesive hydrogels for the controlled release of drugs in the bladder cancer treatment** 2023. 101 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

Bladder cancer is the tenth most common type of cancer worldwide and represents 2.1% of cancer deaths. Treatment of bladder cancer is done primarily by a transurethral resection to remove the visible tumor, followed by intravesical chemotherapy, depending on the stage of the disease. However, the instillation of drugs into the human bladder presents some challenges, among which stand out the permeation of the active in the urothelium - a highly impermeable tissue - and the residence time of this drug, which is limited due to the presence of urine that ends up diluting it and washing it thoroughly. Thus, the main objective of this work was to develop strategies to increase adherence, permeation and residence time of intravesical therapy through the application of mucoadhesive hydrogels for the administration of chemotherapy drugs such as gemcitabine hydrochloride. Papain, a proteolytic enzyme capable of breaking peptide bonds of glycoproteins that compose the mucin, was added to the gels in order to favor the permeation of the chemotherapy agent. In this work, it was proposed the use of hydrogels such as gellan gum, CMC (carboxymethyl cellulose) and PVA (polyvinyl alcohol), already widely applied in the biomedical area, due to properties such as absence of toxicity, high biocompatibility and biodegradability. The studied hydrogels were evaluated concerning their mucoadhesiveness and rheological behavior. Possible interactions between the active and the matrices were also analyzed. Preliminary biological tests were carried out aiming to provide specific knowledge about the biocompatibility of the material, in order to investigate its safety for future clinical use. The formulations showed promising results, with mucoadhesion capacity, retention in the urothelium and interaction with the mucin present in the bladder mucosa. The release of the drug substance was sustained for up to 8 hours, extending in a significative way the available treatment nowadays that, in general, tend to be limited by the number of hours in which is possible to avoid patients' micturition. Permeability of the formulations was also increased in the presence of papain. In addition, the formulations presented pseudoplastic rheological behavior and, therefore, suitable for intravesical application. Biocompatibility tests showed low or no cytotoxicity and non-irritability by the formulations, indicating they may be suitable for future preclinical studies. Thus, the proposed formulations constitute possible treatment alternative associated to better quality of life for patients.

Keywords: bladder cancer, papain, hydrogel, gemcitabine, intravesical therapy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações propostas para os hidrogéis.....	35
Tabela 2. Formulações preparadas a partir de goma gelana	36
Tabela 3. Formulações preparadas a partir da blenda de CMC com PVA	37
Tabela 4 - Reagentes para preparo de urina artificial.....	40
Tabela 5 - Picos endotérmicos do DSC das amostras liofilizadas e controles	59
Tabela 6. Componente de viscosidade devido à bioadesão para cada formulação	68
Tabela 7. Propriedades Organolépticas – Tempo Zero	73
Tabela 8. Tempo de latência e fluxo estacionário das formulações testadas.....	81
Tabela 9. Massa de gencitabina retida nos tecidos de bexiga urinária após 7 horas de ensaio de permeação.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios do câncer de bexiga de acordo com o critério TMN	16
Figura 2 – Esquema com algumas possíveis classificações de tipos de hidrogéis de acordo com Peppas e Hoffman (2020).	21
Figura 3- Formação de forças mucoadesivas entre cadeias poliméricas e mucosa.	26
Figura 4. Estrutura química do cloridrato de gencitabina	31
Figura 5 - Fluxograma do trabalho desenvolvido nesta pesquisa.	33
Figura 6 - Esquema representativo do ensaio de força de bioadesão.	41
Figura 7 - Esquema representativo do teste de permeabilidade com células de Franz.....	45
Figura 8 - Preparo dos ovos para o ensaio de HET-CAM. Em (a) os ovos estão sendo abertos com o auxílio de agulha e pinça e em (b) observa-se a membrana coriolantóica exposta.	47
Figura 9 - Hidrogéis obtidos (a) Avicel® 3%; (b) goma gelana 0,1%; (c) quitosana; (d) quitosana termossensível e (e) CMC com PVA.....	48
Figura 10 - Atividade enzimática relativa da papaína após adição às formulações de CMC com PVA e de goma gelana.	49
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura dos geis (a) G- goma gelana; (b) G2-goma gelana com papaína ; (c) C-CMC e PVA; (d) C2-CMC e PVA com papaína	50
Figura 12 - Espectros de FTIR obtidos dos polímero kelcogel® e formulação G.51	
Figura 13 - Espectros de FTIR obtidos dos polímeros CMC, PVA e da blenda C (CMC com PVA).....	52
Figura 14 - Espectro de FTIR obtido a partir da papaína e da gencitabina	54
Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos das formulações contendo papaína e gencitabina (a) G1, G2, G3 e (b) C1, C2 e C3	55
Figura 16. DSC obtido das amostras de (a) papaína isolada; (b) gencitabina isolada; (c) kelcogel® isolado, formulação G e formulação G2; (d) CMC isolado, PVA isolado e formulação C; (e) formulações C e C2; (f) formulações G1 e G3; (g) formulações C1 e C3	58
Figura 17. Reticulação da goma gelana (a) (a) imagem do gel gelificado e (b) representação dos fenômenos envolvidos neste processo.....	60
Figura 18- <i>Amplitude Sweep</i> , realizado a 37 °C, das formulações preparadas a partir de (a) goma gelana e (b) CMC com PVA.....	62
Figura 19 - <i>Frequency Sweep</i> das formulações realizado 37°C.....	63
Figura 20. Viscosidade complexa em função da taxa de cisalhamento para as formulações de (a) G e G2; e (b) C e C2.	64
Figura 21. (a) Imagens obtidas em microscópio de fluorescência dos fragmentos iluminados com comprimento de onda verde e (b) retenção na mucosa por intensidade de fluorescência. * indica significância estatística (p<0.05).....	66
Figura 22. Resultados de reologia para análise de interação entre os polímeros e mucina das amostras (a) G; (b) G2; (c) C; e (d) C2.	69

Figura 23. Força de descolamento (a) e trabalho de adesão (b) das formulações propostas.	71
Figura 24. Gel de gelana reticulado	72
Figura 25. pHs aferidos no ensaio de estabilidade preliminar.....	73
Figura 26. Variação de pH das formulações com base de (a) goma gelana e de (b) CMC com PVA.....	75
Figura 27. Atividade enzimática relativa das formulações contendo papaína no início do ensaio de estabilidade (tempo zero).....	75
Figura 28. Atividade relativa residual das formulações contendo papaína.....	76
Figura 29. Perfil de liberação acumulativa da gencitabina. Os resultados estão apresentados como valores médios (n=3) em % de gencitabina carregada nas (a) formulações preparadas a partir de goma gelana e (b)formulações preparadas a partir da blenda CMC com PVA.	78
Figura 30. Permeação cumulativa através do tecido da bexiga urinária.	80
Figura 31. Viabilidade celular das linhagens (a) HUVEC e (b) V79-4 após incubação com as formulações propostas	83
Figura 32. Imagens do ensaio de HET-CAM após 5 minutos de contato com as formulações. Os códigos estão em acordo com as tabelas 2 e 3. Os controles + e – foram soluções de 0,1 N NaOH e 0,9% NaCl, respectivamente (n=2).....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2 ESTADO DA ARTE.....	20
2.1 Sistemas de liberação de fármacos	20
2.2 Hidrogéis Carreadores de Fármacos	20
2.3 Biodegradação e bioerosão	23
2.4 Mucoadesividade	25
2.5 Reologia.....	27
2.6 Papaína.....	28
2.7 Quimioterápicos para câncer de bexiga.....	29
3 OBJETIVO	32
3.1 Objetivos específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	33
4.2 Preparo dos hidrogéis.....	35
4.3 Adição da papaína aos géis.....	36
4.4 Quantificação da Atividade Enzimática da Papaína.....	37
4.5 Avaliação da estrutura superficial das formulações: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
4.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polímeros e das formulações.....	38
4.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos polímeros e das formulações	38
4.8 Gelificação da Gelana.....	38
4.9 Comportamento reológico das formulações	38
4.10 Estudo da mucoadesividade: ensaio de retenção dos géis	39
4.11 Ensaio de Força de Bioadesão	40
4.12 Interação polímero e mucina: avaliação reológica.....	42
4.13 Estudo da estabilidade das formulações	42
4.13.1 Estabilidade Preliminar	42
4.13.2 Estabilidade	43
4.14 Ensaio de liberação in vitro do princípio ativo.....	43
4.15 Capacidade de Permeação <i>ex-vivo</i> das formulações.....	44
Fonte: autor da tese.....	45
4.16 Ensaio de Biocompatibilidade	46

4.16.1 Citotoxicidade	46
4.16.2 Avaliação do potencial irritante das formulações pelo método HET CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane)	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Hidrogéis Propostos.....	48
5.1.1 Adição da papaína nos hidrogéis	48
5.2 Quantificação da Atividade Enzimática da Papaína nos géis	49
5.4 Avaliação da estrutura superficial das formulações: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
5.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polímeros e das formulações.....	51
5.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos polímeros e das formulações	56
5.7 Determinação da Gelificação da Goma Gelana.....	59
5.8 Comportamento reológico das formulações	61
5.9 Estudo da mucoadesividade: ensaio de retenção dos géis	65
5.10 Interação polímero e mucina: avaliação reológica.....	67
5.11 Ensaio de Força de Bioadesão	70
5.10 Estudo da estabilidade das formulações	71
5.10.1 Estabilidade Preliminar	71
5.10.2 Estabilidade Acelerada	74
6.11 Ensaio de liberação in vitro do princípio ativo.....	77
5.12 Capacidade de permeação das formulações em <i>ex-vivo</i>	79
5.13 Ensaio de Biocompatibilidade	82
5.13.1 Citotoxicidade	82
5.13.2 Avaliação do potencial irritante das formulações pelo método HET CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane)	84
6. Conclusão	86
6.1 Estudo Futuros.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE - PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA	98
Resumos publicados em anais de congressos	98
Artigos publicados em periódicos internacionais	99
Capítulos de livro publicados	100
Disciplinas cursadas	100

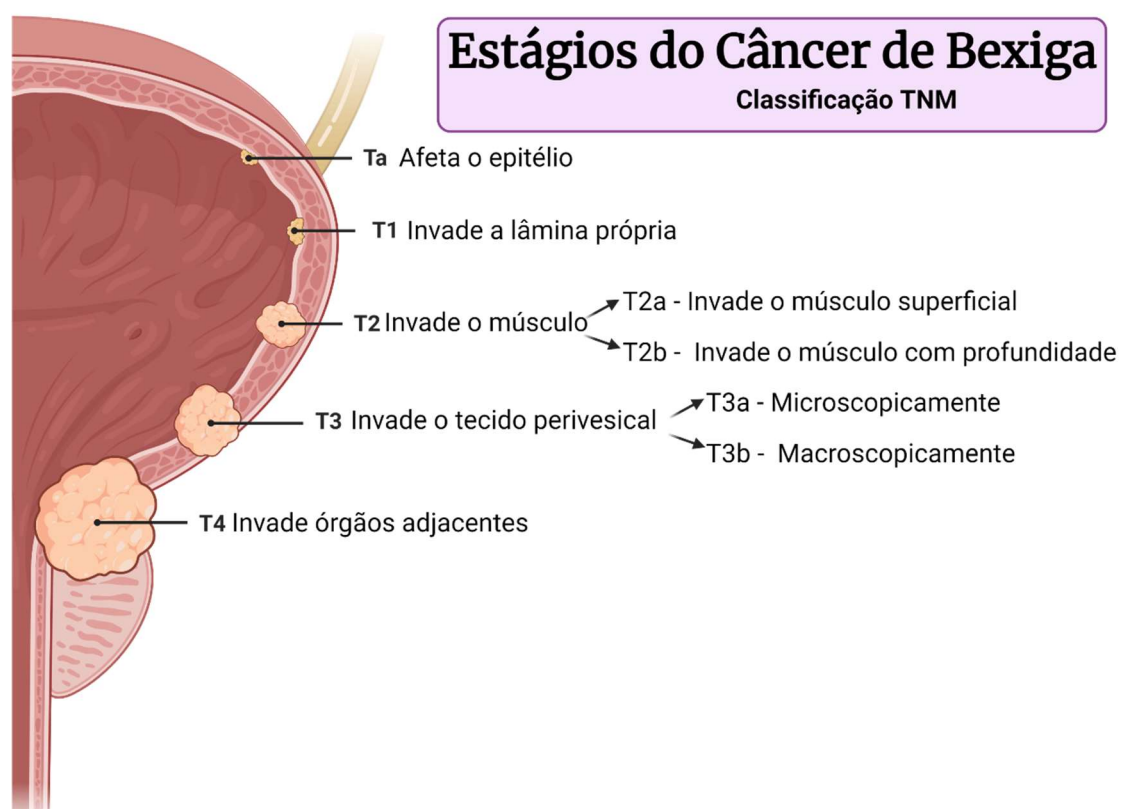
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer de bexiga (CB) é uma das principais doenças que atacam o trato urinário e se dá pela proliferação anormal das células do tecido da parede interna da bexiga conhecida como urotélio. A estimativa de novos casos no Brasil para 2022 foi de 10.640, sendo 7590 em homens e 3050 em mulheres, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2021). O Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde do Brasil relata que em 2019 houve 4.517 mortes devido a essa patologia, sendo 3.115 homens e 1.402 mulheres. Mundialmente, esses números crescem para aproximadamente 430.000 novos casos e 165.000 mortes por ano. Os registros mostram que, em um primeiro diagnóstico dos casos de CB, cerca de 30% dos pacientes apresentam a forma músculo-invasiva da doença e que, dos que apresentam tumores superficiais, de 10% a 15% terminam por desenvolver a forma mais agressiva do carcinoma (LIEDBERG et al., 2015; ZUIVERLOON et al., 2018). Os tumores são classificados de acordo com a escala TNM, que descreve o tamanho/profundidade e se há presença de nódulos ou metástase (Ta, T1, T2, T3 ou T4 – Figura 1). As formas consideradas músculo-invasivas são aquelas classificadas a partir de T2. Entretanto, é necessário fazer um acompanhamento cuidadoso dos nódulos T1, uma vez que estes afetam a lâmina própria, e isto pode ser um indicativo de uma potencial evolução para um tumor invasivo (DOWN; NAIR; THURAIRAJA, 2016; MARTINEZ RODRIGUEZ; BUISAN RUEDA; IBARZ, 2017).

O tratamento do câncer de bexiga se dá, primeiramente, por uma ressecção transuretral para a raspagem do tumor visível, seguida por uma terapia de acordo com o estágio da doença (BUSS et al., 2018). Estudos relacionados à identificação de novos alvos para o direcionamento de terapias para o tratamento de câncer mostraram que grande parte das células cancerosas apresentam expressão aberrante de receptores do tipo *toll* (*toll-like*) TLR-4. Os receptores tipo *toll* são receptores transmembrana com capacidade para reconhecimento de moléculas de origem microbiana ou endógena. Também estão relacionados à reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (GALLI et al., 2010; BOTOS, I. SEGALB, D.M. DAVIES, 2011). Observou-se, no câncer de bexiga, que a ativação da sinalização do TLR-4 acarreta em uma resposta expressiva de interleucina 6 (IL-6), uma citocina pleiotrópica com funções pró-inflamatórias (SWEIS; GALSKY, 2016;

ZHOU et al., 2017). Outro receptor muito importante em carcinomas uroteliais são os FGFRs (receptor de fator de crescimento de fibroblasto) que representam alvos para terapia. Mutações de FGFR3 e expressões anormais de FGFR1, FGFR3 e de FGFs (fatores de crescimento de fibroblasto básicos) também foram identificados (LEE et al., 2014; HÄNZE et al., 2018).

Figura 1. Estágios do câncer de bexiga de acordo com o critério TMN



Fonte: criado com Biorender.com, adaptado de (DOWN; NAIR; THURAIRAJA, 2016).

Atualmente, a instilação da imunoterapia utilizando o bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) ainda é considerada a melhor opção para o tratamento de câncer não músculo-invasivo de alto risco (ASKELAND et al., 2012). A BCG consegue induzir a expressão de citocinas por meio dos receptores *toll-like* (TLRs) 2 e 4, estimulando, portanto o sistema imune (GARCIA et al., 2016). Entretanto, a aplicação desta terapia é limitada devido à dificuldade de previsão da resposta imune e antitumoral- mais de dois terços dos pacientes experimentam efeitos adversos e intolerância, que podem evoluir para complicações severas (PERABO et al., 2005). Além disso, no Brasil, desde 2011 os médicos e pacientes enfrentam a falta de disponibilidade

da BCG no mercado, com contínuas interrupções da sua produção (ONCOGUIA, 2022).

A terapia intravesical também requer inúmeras visitas ao hospital: o tratamento demanda uma instilação por semana no primeiro mês, uma a cada 15 dias no segundo e uma por mês até a completude de um ano que, somados aos efeitos colaterais como náuseas, febre e irritação urinária desestimulam os pacientes (TYLER, 2012; OLIVEIRA; VILLA NOVA; BRUSCHI, 2018). Questões como a falta de disponibilidade desta vacina no mercado também tem sido um grande problema enfrentado pelos médicos e pacientes que, muitas vezes, acabam ficando sem o tratamento mais indicado ao seu quadro clínico.

A utilização da quimioterapia para o tratamento de tumores de bexiga pode ser uma das opções mediante à falta da imunoterapia. Tumores de bexiga não-metastáticos são frequentemente tratados com quimioterapia intravesical. A depender da progressão do tumor, uma ou mais drogas podem ser combinadas. Gencitabina (Gem) e cisplatina, doxorubicina e cisplatina, metotrexato e vimblastina, e gencitabina e placlitaxel são combinações comumente usadas (JAIN; KATHURIA; MOMIN, 2021). Entre as principais dificuldades encontradas na instilação de medicamentos na bexiga humana estão a permeação do ativo no urotélio - que é um tecido pouco irrigado por sangue e altamente impermeável - e o tempo de residência desse fármaco que é curto devido ao efeito de diluição e lavagem da urina que acaba eliminando-o completamente (KOLAWOLE et al., 2017).

Os hidrogéis são estruturas compostas por redes poliméricas tridimensionais, com alta capacidade de absorção de água, sem comprometimento da sua integridade. Estes materiais têm sido largamente estudados e aplicados nas áreas biomédica e farmacêutica, com diversos produtos transferidos ao mercado com êxito. Isso foi possível, entre outras razões, devido às propriedades dos hidrogéis que se assemelham àsquelas encontradas em elementos do corpo humano como músculos, cartilagens, matriz extracelular, entre outros. Além disso, também há a possibilidade de se trabalhar com aspectos de hidrofiliicidade e hidrofobicidade dos hidrogéis, de acordo com as características do meio de difusão. Desta forma, sistemas de liberação de drogas tem sido umas das principais aplicações dos hidrogéis na área farmacêutica. Hidrogéis inteligentes capazes de responder a estímulos compõem sistemas que são pensados para entrega localizada de

diferentes tipos de moléculas, que podem ser liberadas por difusão ou erosão (DE LIMA et al., 2020).

Em virtude destas propriedades, os hidrogéis, dentre outros materiais, também tem sido explorados em diversas pesquisas a fim de se tentar solucionar as questões apresentadas sobre o tratamento do câncer de bexiga. GuhaSakar e colaboradores, por exemplo, desenvolveram um sistema composto por lipossomas em escala nanométrica em um gel polimérico de goma gelana em que a gelificação é estimulada pelos íons presentes na urina. O estudo mostrou que a presença dos lipossomas aumentou a permeação do sistema na parede urotelial. Além disso, o gel proporcionou um tempo de retenção da droga significativo de pelo menos sete dias, contra algumas horas no caso da instilação da droga sem suporte carreador, com liberação de 17.8% dentro de um período de 50 horas (GUHASARKAR; MORE; BANERJEE, 2017).

Kolawole e colaboradores desenvolveram um material mucoadesivo à base de quitosana metacrilada para liberação transmucosa de medicamentos. Os ensaios em bexigas suínas mostraram uma maior capacidade de bioadesão desse material em relação ao controle positivo de quitosana não modificada. Esse comportamento se deveu provavelmente à presença dos grupos metacrilatos que formaram ligações covalentes com os grupos tióis presentes na mucina da mucosa (KOLAWOLE; LAU; KHUTORYANSKIY, 2019). Outro estudo com quitosana mostrou o desenvolvimento de um hidrogel termossensível contendo β -glicerofosfato e nanopartículas de Fe_3O_4 para o carreamento de BCG. Os resultados mostraram que o sistema apresentou capacidade de liberação prolongada por dois dias (ZHANG et al., 2013).

Kaldybekov e colaboradores desenvolveram lipossomas mucoadesivos de polietilenoglicol (PEG) funcionalizados com maleimida para liberação controlada de fármacos em terapia intravesical. Foi comprovado por meio de ensaio *in vivo* que os lipossomas funcionalizados possuem uma maior capacidade de adesão ao urotélio que os lipossomas controle. A partir de análises em *ex vivo*, também foi possível observar maior permeação na mucosa e maior tempo de liberação do ativo por parte dos lipossomas com maleimida (KALDYBEKOV et al., 2018).

Apesar dos avanços já realizados e publicados na área, a maioria destes estudos não apresenta soluções efetivas, relatando ainda muitas desvantagens relacionadas ao custo e complexidade das formulações, bem como à incapacidade

de controle da liberação do ativo, pois verifica-se principalmente com hidrogéis, a presença de uma rápida liberação nas primeiras horas (KOLAWOLE et al., 2017).

Além disso, nota-se que, nos estudos mencionados, não há uma abordagem aprofundada sobre as interações entre o ativo e a matriz e em relação à capacidade de permeação das formulações no urotélio, questões fundamentais para se obter um sistema com liberação efetivamente controlada e para o bom aproveitamento do quimio- ou imunoterápico.

Dito isso, a proposta deste trabalho visou abordar os principais problemas existentes no tratamento atual – nomeadamente, reduzido tempo de residência, efeitos colaterais e baixa permeação – por meio da utilização de materiais com propriedades mucoadesivas e capacidade de liberação controlada e/ou lenta. A utilização da papaína, inédita para este propósito, teve por finalidade auxiliar na permeação do princípio ativo.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Sistemas de liberação de fármacos

Os sistemas de liberação controlada de drogas têm sido explorados nas últimas décadas como estratégia, nas áreas biomédica e farmacêutica, devido às possibilidades de melhorias relacionadas à farmacocinética. Dentre as principais vantagens desses sistemas, está a liberação do ativo no local de interesse, de forma a potencializar a absorção da droga pelo organismo.

Apesar dos avanços das pesquisas na área, a maioria dos sistemas de liberação controlada não possui perfis de liberação capazes de se adequar às necessidades do paciente ou a eventuais mudanças fisiológicas, o que compromete o seu desempenho. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de se desenvolver sistemas capazes de se adequarem a demandas específicas de liberação, de acordo com as particularidades do ambiente em que estão inseridas (DAVOODI et al., 2018). Uma prolongação da liberação por mais de duas horas representaria uma vantagem para o tratamento que, de maneira geral, é realizado dentro deste período em que o paciente evita micção após a instilação intravesical.

Diversas pesquisas desenvolveram sistemas de liberação estímulo-responsivos que possibilitam maior controle da liberação em relação ao tempo e ao local. Dentre os fatores que podem servir como estímulos estão pH, atividade enzimática, campo magnético, entre outros (HU; CHEN; GU, 2018). Nanomateriais de origem polimérica são largamente explorados neste campo de pesquisa porque permitem conjugações com outros sistemas orgânicos ou inorgânicos. Os polímeros de origem natural, como proteínas e polissacarídeos, têm se destacado devido a propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade que são de interesse para aplicações médicas (JACOB et al., 2018).

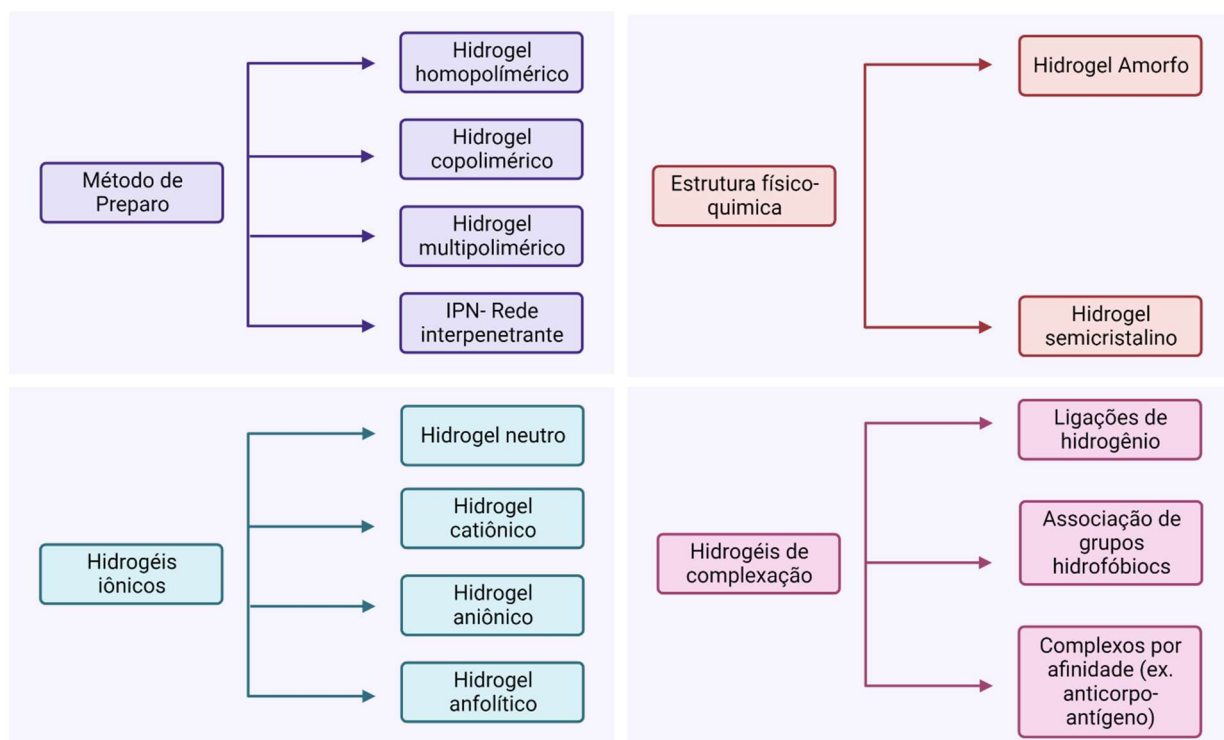
2.2 Hidrogéis Carreadores de Fármacos

Hidrogéis são estruturas poliméricas com alta capacidade de absorção de água sustentadas por (1) ligações cruzadas covalentes; (2) forças iônicas; (3) ligações de hidrogênio; (4) afinidade ou interações de “bio-reconhecimento”; (5) interações hidrofóbicas; (6) cristalinidade do polímero; (7) emaranhamentos físicos das

cadeias poliméricas; ou (8) uma combinação de duas ou mais destas interações (PEPPAS; HOFFMAN, 2020). A alta capacidade de retenção da água está relacionada à presença de grupos hidrofílicos como carboxilas, hidroxilas e aminos (PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009).

Os hidrogéis poliméricos possuem uma estrutura com propriedades viscoelásticas e porque estão inseridos no cotidiano da população, se tornaram um tipo de material bastante conhecido. De acordo com as necessidades de aplicação, os géis são encontrados de diferentes formas, como em pastas de dentes, gel de cabelo, shampoos, sabonetes e lentes de contato (LAFTAH; HASHIM; IBRAHIM, 2011). A Figura 2 ilustra um esquema com algumas das possíveis classificações que podem ser atribuídas aos hidrogéis, de acordo com Peppas e Hoffman (PEPPAS; HOFFMAN, 2020). Além das apresentadas, estes materiais também podem ser classificados em estáveis ou degradáveis, físicos ou químicos, responsivos, naturais ou sintéticos, entre outros (LAFTAH; HASHIM; IBRAHIM, 2011; PEPPAS; HOFFMAN, 2020).

Figura 2 – Esquema com algumas possíveis classificações de tipos de hidrogéis de acordo com Peppas e Hoffman (2020).



Fonte: autor da tese

Esses materiais poliméricos conseguem aprisionar um medicamento e liberá-lo de forma lenta e controlada pelo processo de difusão. Além disso, é possível controlar a taxa de liberação via estímulos como temperatura, pH, campos magnéticos, entre outros, por meio de alterações estruturais no gel (MAHINROOSTA et al., 2018). Os hidrogéis termossensíveis apresentam uma temperatura crítica de solução e sofrem transição de fases a determinadas temperaturas, isto é, são mais fluidos em temperaturas menores e passam a ter comportamento predominantemente elástico quando acima da temperatura crítica (DIMATTEO; DARLING; SEGURA, 2018).

Os polímeros naturais são largamente aplicados à produção de hidrogéis para fins médicos devido a sua alta disponibilidade e propriedades de interesse (biocompatibilidade, biodegradabilidade, entre outras). A quitosana é um copolímero catiônico de origem natural constituído por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β -(1-4). A grande quantidade de grupos aminas livres e, portanto, de cargas positivas em sua estrutura é responsável pelas suas propriedades que são de grande interesse para diversos setores, incluindo o de materiais médicos. A quitosana é o único polímero natural catiônico, o que lhe permite uma série de interações particulares com outras moléculas. Dentre elas, por exemplo, a quitosana é conhecida pela sua alta capacidade de mucoadesão e atividade antimicrobiana (MUXIKA et al., 2017; ALI; AHMED, 2018).

A goma gelana, por sua vez, é um polissacarídeo natural linear produzido por bactérias *Sphingomonas elodea* composto por unidades de α -L-ramnose, β -D-glucose e β -D-glucuronato em proporções molares de 1:2:1. Este polímero possui propriedades de interesse como biodegradabilidade, mucoadesividade e capacidade de gelificação mediante exposição à concentração fisiológica de cátions. A gelana apresenta terminações de grupos acetil e L-gliceril e, quando submetida a hidrólise alcalina, sofre desacetilação (GUHASARKAR; MORE; BANERJEE, 2017). Ambas as formas da gelana (acetilada e desacetilada) formam hidrogéis na presença de cátions, sendo que a primeira forma um material flexível com capacidade de deformação e a última um material rígido e frágil (FLORES-HUICOCHEA et al., 2013)

Outros materiais com propriedades interessantes de mucoadesividade e tixotropia que têm sido estudados na área farmacêutica são suspensões de

microcelulose com carboximetilcelulose (MCC-NaCMC) para sprays nasais. Normalmente, estas suspensões são utilizadas como agentes de modificação reológica por apresentarem versatilidade e serem capazes de dispersar drogas lipofílicas em meio aquoso. A MCC-NaCMC é composta por microfibrilas empacotadas por secagem por aspersão (*Spray Drying*) e que são desempacotadas no preparo da suspensão mediante um processo de alta tensão de cisalhamento e pela hidratação da celulose nas suas regiões hidrofílicas (ROSA, 2016).

2.3 Biodegradação e bioerosão

No final da década de 1960 e 1970, estudos relacionados ao desenvolvimento de biomateriais reabsorvíveis começaram a ser explorados. Foi ainda nesta época que, a sutura biodegradável DexonTM, de ácido poliglicólico (PGA), começou a ser usada clinicamente. Sua degradação ocorre por meio da hidrólise das pontes de éster, transformando as cadeias poliméricas em moléculas menores e atóxicas (RATNER, 2019). O termo “degradação” descreve um processo químico de clivagem de ligações covalentes em um dado material. A hidrólise é o processo químico de degradação da maioria dos polímeros, ainda que existam outras vias como a oxidativa, fotodegradativa e enzimática (TREISER et al., 2013).

A biodegradação *in vivo* pode acontecer por via enzimática ou não-enzimática e gera produtos inofensivos para o corpo e para o meio ambiente após excreção (PRAJAPATI et al., 2019). Os polímeros degradados por hidrólise possuem ligações químicas que podem ser clivadas apenas na presença da água, dando origem a duas espécies em que uma contém um átomo de hidrogênio e a outra um grupo hidroxila. Diversas ligações químicas podem ser quebradas por hidrólise, incluindo estéres, anidridos, acetais, amidas, uretanos, carbonatos e fosfatos. A taxa de degradação também depende de outros fatores como difusão da água, solubilidade e difusão dos monômeros, tamanho e geometria do dispositivo. Já a via enzimática de degradação ocorre em materiais poliméricos que ainda que sejam hidroliticamente sensíveis, necessitam catálise para que haja um processo significativo de degradação em um sistema biológico. Polímeros que contém pontes

de éter ou amida com taxa de hidrólise muito baixas costumam requerer um processo enzimático (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

Contudo, existe também o termo “erosão” que está relacionado às mudanças físicas como tamanho, formato ou massa de um dispositivo, que podem ser derivadas da degradação, dissolução, ablação ou desgaste mecânico. Dessa forma, o processo de erosão pode acontecer na ausência da degradação e vice-versa. Quando se tem um dispositivo polimérico sólido implantado e que, pouco a pouco, se torna solúvel em água, tem-se um processo de bioerosão. Este processo causa alterações macroscópicas no dispositivo, bem como altera propriedades mecânicas e físicas, como perda de massa e de capacidade de intumescimento. A solubilização de cadeias poliméricas não degradadas pode acontecer, por exemplo, devido à mudança de pH. Existem dois tipos de bioerosão: em massa ou por superfície, a depender da taxa de penetração de água na matriz polimérica que, ocorrendo em todo o volume do sólido e, excedendo a taxa de conversão de cadeias poliméricas em solúveis, dá origem à bioerosão em massa. Em contrapartida, na bioerosão por superfície, o processo se limita à superfície do material. Estes processos são influenciados por propriedades como hidrofiliabilidade do polímero e morfologia (TREISER et al., 2013).

Na literatura, existem vários termos, como biodegradação, bioerosão, bioabsorção e biorreabsorção, para indicar que um material irá desaparecer após determinado tempo dentro do organismo. Apesar de ainda não haver um consenso claro sobre as diferenças entre esses conceitos, a Sociedade Europeia de Biomateriais sugere que o termo “biodegradação” seja usado quando se quer enfatizar que um agente biológico (enzima, célula ou microrganismo) causará a cisão das ligações químicas de um dispositivo implantado. Já os termos “biorreabsorção” e “bioabsorção” são frequentemente usados como sinônimos ao indicar que um polímero ou seus produtos de degradação são removidos por meio de atividade celular, como a fagocitose (TREISER et al., 2013).

A utilização de polímeros biodegradáveis na área biomédica e farmacêutica foi uma forma de refinar sistemas de liberação de drogas, entre outros biomateriais. Isto porque os polímeros considerados não-biodegradáveis ofereciam riscos de toxicidade por acumulação no organismo (PRAJAPATI et al., 2019).

2.4 Mucoadesividade

A bioadesividade pode ser definida como uma ligação entre duas superfícies biológicas ou entre uma superfície sintética e outra biológica, como por exemplo um polímero de origem natural ou sintética e a camada celular ou mucosa de um tecido mole. Quando se trata da adesão de um material polimérico a uma mucosa, comumente se utiliza o termo *mucoadesividade* (CHICKERING III; MATHIOWITZ, 1999). A mucoadesividade tem sido estudada na área farmacêutica há mais de 50 anos e é entendida como uma estratégia para aumentar o tempo de residência do fármaco e para melhorar a especificidade da entrega do ativo no local desejado. Um sistema mucoadesivo permite a absorção direta do fármaco, uma diminuição da taxa de excreção e, conseqüentemente, uma maior biodisponibilidade do ativo associada à administração de doses menores, com menor frequência. Portanto, obtém-se uma estratégia de liberação controlada e prevista de forma a diminuir a quantidade de droga aplicada. Este método tem sido utilizado em diversas áreas, dentre elas, ortopédica, odontológica, oftalmológica e cirúrgica (YAN et al., 2017).

O processo de adesão entre polímero e mucosa (Figura 3) se dá, de forma geral, pelas seguintes etapas: primeiro, ocorre a umidificação e o intumescimento do polímero, seguida pela interpenetração e emaranhamento das cadeias do material polimérico com as cadeias de mucina e, por fim, a formação de ligações químicas fracas entre elas (DUCHÊNE; TOUCHARD; PEPPAS, 1988).

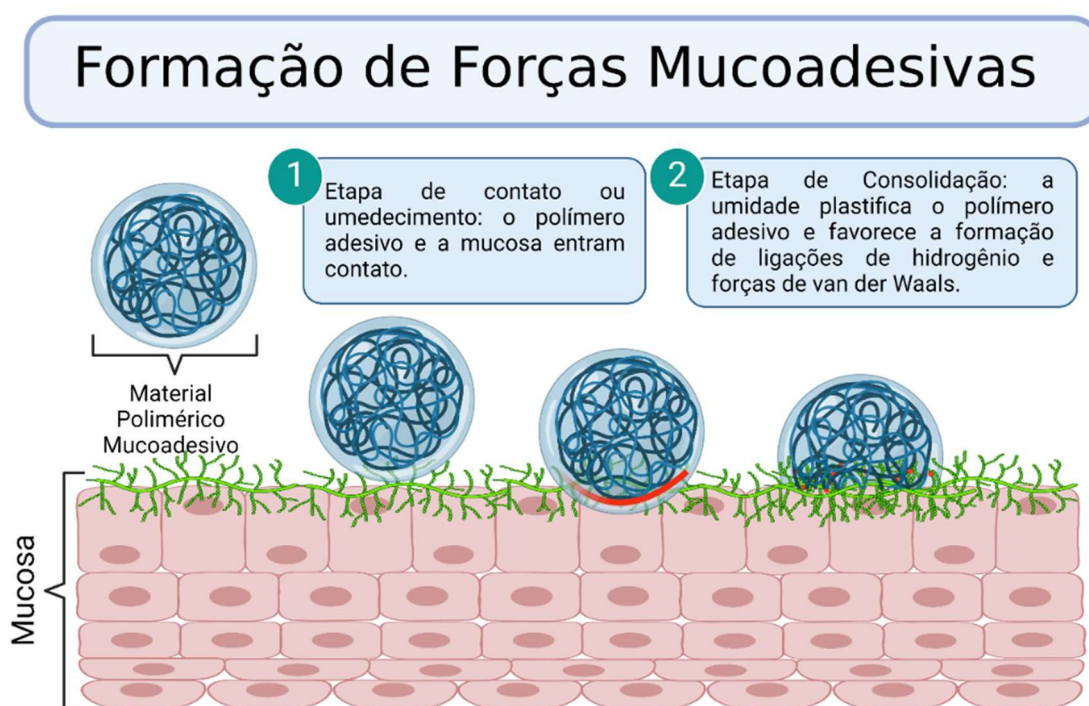
Sabe-se que para que um polímero tenha capacidade de mucoadesão, isto é, de formar ligações físicas com a mucosa, é necessário que ele apresente propriedades como: possuir quantidades suficientes de grupos formadores de ligações de hidrogênio (como $-OH$ e $-COOH$), possuir cargas iônicas, alta massa molar, cadeias flexíveis ou tensão superficial adequada que favoreça o espalhamento na mucosa (PEPPAS; SAHLIN, 1996; PEPPAS; HUANG, 2004). Além disso, pode-se afirmar que os polímeros bioadesivos podem ser divididos em três grandes grupos, sendo eles: aqueles de natureza eletrostática, que aderem por meio interações não-covalentes predominantemente iônicas; os que possuem grupos funcionais hidrofílicos capazes de se ligarem com grupos de mesma natureza presentes nos tecidos biológicos; e polímeros capazes de interagir com o muco ou com receptores presentes nas próprias células, como os polímeros

tiolados e as lectinas (DUCHÊNE; TOUCHARD; PEPPAS, 1988; LEUNG; ROBINSON, 1990; SHAIKH et al., 2011)

Diversos testes *in vitro* podem ser utilizados para a análise da capacidade de mucoadesão como avaliação das forças de tensão necessárias para descolar um determinado material polimérico de uma mucosa, medição de ângulo de contato e avaliação das propriedades físico-químicas do material utilizado (GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2005).

A quitosana é um polímero conhecido pela sua capacidade de mucoadesão em virtude às suas interações com a mucina, que englobam entre ligações de hidrogênio e eletrostáticas. Desta forma o material tem sido utilizado em diversas pesquisas que buscam carreadores poliméricos para liberação controlada de drogas (SZYMAŃSKA; CZAJKOWSKA-KOŚNIK; WINNICKA, 2018).

Figura 3- Formação de forças mucoadesivas entre cadeias poliméricas e mucosa.



Fonte: Criado com BioRender.com, Adaptado de (TEKADE et al., 2019).

Um exemplo consiste no trabalho de Karavana e colaboradores que desenvolveram um sistema mucoadesivo para entrega controlada de gencitabina para tratamento de câncer de bexiga a partir de microesferas de Carbopol 2020 NF e Eudragit E100 com capacidade de encapsulação de 82,65%. As microesferas foram então dispersas em géis de poloxamer ou quitosana. O gel de quitosana

apresentou menos citotoxicidade que o gel contendo poloxamer, entretanto, este último sistema mostrou-se mais adequado para aplicação em relação às suas propriedades mecânicas, bioadesivas e de liberação (KARAVANA et al., 2018).

2.5 Reologia

Originária do grego, a palavra *Rheo* significa fluxo e, portanto, “Reologia” é a ciência que estuda a deformação dos materiais sob a aplicação de uma força, isto é, o seu escoamento. Denomina-se como *tensão* a força exercida em uma determinada área enquanto a *taxa de tensão* é a velocidade em que essa deformação acontece. A tensão pode ser de cisalhamento, alongamento, torsão ou compressão. No primeiro caso o fluido está localizado entre duas placas paralelas, sendo que a inferior se mantém estática enquanto na superior uma força tangencial é aplicada. A partir do movimento da placa superior, o material é cisalhado. Esse tipo de tensão é encontrado em processos de extrusão. Já no caso da tensão por alongamento o material flui a partir da aplicação de uma força, como no caso de orientação de filmes (MORRIS, 2017).

Para o estudo do comportamento reológico de polímeros são utilizadas três definições de materiais ideais: materiais viscosos (dissipam todo o trabalho externo aplicado); elásticos (armazenam todo o trabalho aplicado) e materiais viscoelásticos (dissipam e armazenam o trabalho externo aplicado). A viscoelasticidade é uma propriedade característica de materiais de elevada massa molar, como os polímeros, que apresentam simultaneamente comportamento de materiais viscosos e elásticos.

Outro conceito importante para o estudo da reologia é o de viscosidade que, por definição, é a resistência do material ao fluxo. Portanto, quanto maior for a viscosidade de um material, maior será a sua resistência ao escoamento. Materiais com viscosidade constante são denominados fluidos Newtonianos. Nestes casos a resistência ao escoamento é sempre a mesma, independentemente da aplicação de taxas de cisalhamento. Esse comportamento é característico de líquidos de baixa massa molecular, como a água. Por outro lado, materiais que apresentam viscosidades que podem variar em função da taxa de cisalhamento são designados não-newtonianos. Quando há queda da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, diz-se que o material possui comportamento pseudoplástico; quando o contrário acontece aumento da viscosidade mediante aumento da taxa de

cisalhamento, o material possui comportamento de um fluido dilatante. Nestes dois casos, a variação da viscosidade independe do tempo. Quando há queda de viscosidade dependente do tempo sob uma dada taxa de cisalhamento constante, o material possui comportamento tixotrópico. Em contrapartida, quando ocorre o aumento da viscosidade com o tempo sob um dada taxa de cisalhamento, denomina-se o comportamento do fluido como reopéxico (BRETAS; D'ÁVILA, 2005)

O estudo da fluidez das formas farmacêuticas a serem desenvolvidas nesse projeto é de fundamental importância uma vez que a formulação será instilada via uretra para realização do tratamento. Desta forma, é necessário que a formulação seja menos viscosa sob aplicação de forças de cisalhamento (como acontece durante a instilação do material enquanto passa da seringa para a cânula em direção à bexiga) e mais viscosa quando em repouso, auxiliando na manutenção do ativo dentro da bexiga.

Materiais poliméricos tixotrópicos têm sido aplicados para fins biomédicos, desde suspensões nasais (ROSA, 2016), até para implantes ortopédicos (CHEJARA et al., 2017). Fu e equipe conjugaram ácido hialurônico tiolado com o cloridrato de doxorubicina para tratamento de câncer. O material apresentou boa capacidade de liberação do ativo, comportamento responsivo ao pH e tixotrópico, característica importante para administração por agulhas (FU et al., 2015).

2.6 Papaína

Atualmente, as proteínas têm sido alvo de estudos na área da nanotecnologia, uma vez que possuem propriedades de grande interesse para área biomédica como alta biocompatibilidade. Além disso, são metabolizáveis e facilmente manipuláveis, possibilitando serem modificadas para ligarem-se de forma covalente a drogas (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017; FAZOLIN et al., 2018).

A papaína é uma proteína tiol com atividade enzimática proteolítica encontrada no látex extraído do mamão papaia - *Carica papaya Linnaeus* (HOMAEI; SAMARI, 2017). As proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas e estão presentes em variados processos biológicos (FERNÁNDEZ-LUCAS; CASTAÑEDA; HORMIGO, 2017). Possuindo ampla utilidade na área farmacêutica, a papaína é aplicada no tratamento de feridas e queimaduras por meio de sua ação debridante. A vasta aplicação da papaína se deve a características como estabilidade em uma

ampla faixa de pH (3-9) e solubilidade em água. Sua cadeia polipeptídica é constituída de 212 resíduos de aminoácidos, totalizando uma massa molar de 23.350 Da. A papaína possui forma elipsoidal e uma estrutura dobrada, o que dá origem a dois domínios com conformações diferentes. O sítio ativo, por sua vez, é formado de resíduos dos dois domínios e se localiza na superfície da fenda entre eles. É composto pela tríade Cisteína (Cis 25) -Histidina (His 159) -Asparagina (Asn 175). No resíduo Cys 25 há um grupo sulfidrílico essencial, enquanto que os outros seis resíduos de cisteína existentes na estrutura da enzima, formam 3 ligações de dissulfeto que são responsável pela estabilização da conformação estrutural da proteína (KAMPHUIS et al., 1984). A papaína é solúvel em água e pode ser estabilizada ou ativada com dimercaptopropanol, cisteína e EDTA. Além disso, seu armazenamento deve ser feito em temperaturas de 2-8°C. Em pHs menores que 2.8, a enzima começa a desnaturar e a perder sua atividade. Quando em solução, há uma perda de cerca 1-2% de sua atividade por dia devido à presença de autólise ou oxidação (CHANNAMADE et al., 2021).

Um das principais aplicações da papaína nas áreas farmacêuticas e de cosmética é como promotora de permeação de agentes ativos na pele. As proteases são utilizadas para essa finalidade devido à sua capacidade de quebrar pontes de aminoácidos da subestrutura da mucosa que é constituída de mucina, polipeptídios glicosilados com cargas negativas, regiões hidrofóbicas e domínios de cisteína estabilizados por pontes de dissulfeto (ALJAYYOSSI et al., 2012). Estudos mostraram que dentre as proteases, a papaína se apresentou como a mais adequada para essa finalidade porque gera menos danos ao tecido (GRABOVAC et al., 2007). Varca e colaboradores, por exemplo, desenvolveram nanopartículas de papaína com reticulação e tamanho controlados (6-11 nm) por meio de irradiação por feixe de elétrons para aplicação biomédica (VARCA et al., 2016).

2.7 Terapias para o câncer de bexiga

A gencitabina (Figura 4) é uma desoxicidina de massa molar 263,201 g/mol, solúvel em água (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018). Atualmente, é comercializada como Gemzar® pela Eli Lilly and Company Ltda. na forma de pó estéril liofilizado em frascos de vidro transparentes contendo 200 mg ou 1 g de cloridrato de gencitabina em base livre. Este medicamento já é

aplicado para o tratamento de cânceres de bexiga (aplicação intravesical), de pâncreas, de pulmão e de mama, geralmente já em fase de metástase.

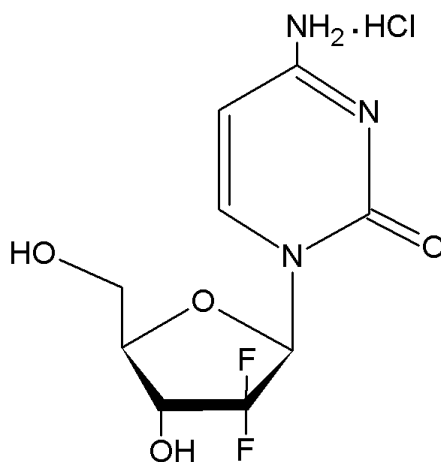
Quando utilizada no tratamento de tumores superficiais de bexiga, a gencitabina tem apresentado melhores resultados em relação à eficácia e toxicidade em comparação com a mitomicina C. Estudos mostraram que a recorrência de tumores foi menor em pacientes tratados com gencitabina em relação àqueles tratados com mitomicina C e que apenas 38,8% deles apresentaram efeitos colaterais, proporção significativamente menor do que a taxa de 72,2% apresentada no grupo em que foi administrada mitomicina (ADDEO et al., 2010; FARR; CHESS-WILLIAMS; MCDERMOTT, 2017).

A gencitabina é um quimioterápico que age na síntese de DNA (fase S do ciclo celular), e, portanto, depende do transporte intracelular e ativação para ter atividade citotóxica. Entretanto, a baixa permeabilidade e a curta meia vida no plasma sanguíneos são duas importantes desvantagens desta droga (ABD AL-JABBAR et al., 2022). Desta forma, pesquisadores tem desenvolvido sistemas de carreamento para este fármaco, com foco em aplicações em diferentes tipos de câncer.

Em um trabalho recente, o cloridrato de gencitabina foi encapsulado juntamente com a amigdalina em um nanocompósito preparado a partir de um núcleo de albumina bovina recoberto pelo imidazolato zeolítico de estrutura-8, um composto sensível a mudanças de pH. As partículas de tamanho entre 400 e 500 nm apresentaram um perfil de liberação mais favorável em pH ácidos, que são mais favoráveis à solubilização do fármaco e característicos do tecido tumoral. Assim o sistema foi capaz de diminuir a citotoxicidade do quimioterápico em células saudáveis (ABD AL-JABBAR et al., 2022).

Lammers e colaboradores desenvolveram um sistema de liberação simultânea de gencitabina e doxorrubicina incorporados em uma matriz copolimérica de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) para terapia de câncer. Os estudos comparativos de liberação mostraram que a gencitabina tende a ser liberada mais rapidamente que a doxorrubicina devido ao tamanho pequeno das moléculas, havendo uma rápida liberação nas primeiras dez horas de ensaio (LAMMERS et al., 2009).

Figura 4. Estrutura química do cloridrato de gencitabina



Fonte: criado com ChemSketch, autor da tese.

Arias e equipe desenvolveram nanocompósitos de quitosana e Fe_3O_4 para liberação controlada de gencitabina. Em seus estudos, explorou-se a capacidade de carregamento e a interação das nanopartículas com o fármaco. Observou-se que a eficiência de encapsulação aumentava de acordo com o aumento da concentração da gencitabina. A maior interação entre o polímero e o ativo ocorria quando o último era introduzido no meio antes do processo de coacervação, o que provocava um aprisionamento mecânico da droga (ARIAS; REDDY; COUVREUR, 2012).

Conforme mencionado anteriormente, de maneira geral, a imunoterapia intravesical com a BCG é a mais utilizada em pacientes com câncer de bexiga superficial devido à sua capacidade de reduzir a recorrência e a progressão do carcinoma (BUSS et al., 2018). O BCG é a bactéria ligada à causa da tuberculose e tem como função ativar o sistema imune do corpo que, conseqüentemente, agirá nas células cancerosas. Entretanto, este tratamento apresenta diversos efeitos colaterais como febre e sensação de queimação na bexiga (ONCOGUIA, 2017). Além disso, a falta da imunoterapia no mercado tem incentivado o tratamento com quimioterápicos que apresentam baixa eficiência, principalmente devido às condições da bexiga. Desta forma, neste trabalho buscou-se propor um novo veículo mucoadesivo e com capacidade aumentada de permeação para a gencitabina, quimioterápico já utilizado nos protocolos clínicos de tratamento de câncer superficial de bexiga.

3 OBJETIVO

O Principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma alternativa original para o aumento da eficiência da quimioterapia aplicada por instilação intravesical. Para tanto, foi proposto o preparo de um sistema mucoadesivo a base de hidrogéis, com capacidade de gelificação *in situ*, contendo papaína como agente de aumento de permeação. A reologia adequada somada à capacidade de gelificação por contato com os sais presentes na urina permitiria ao sistema a possibilidade de aplicação via uretra, acoplada à proteção do ativo ao entrar em contato com a urina.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento das formulações de hidrogéis com papaína. Neste estudo foram abordados sistemas compostos por matrizes de quitosana, goma gelana (Kelcogel®), carboximetilcelulose com microcelulose (Avicel®) e carboximetilcelulose com Polivinil álcool (PVA), combinados com papaína e gencitabina;
- Caracterização físico-química das formulações obtidas;
- Estudo da influência da papaína no comportamento reológico das formulações;
- Estudo da mucoadesividade de matrizes poliméricas;
- Estudo da liberação da gencitabina das matrizes obtidas e permeação no urotélio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi proposto o desenvolvimento de hidrogéis com diferentes propriedades para realização de um estudo comparativo da influência dessas particularidades na capacidade de adesão, permeação e liberação controlada da droga. Na Figura 5 está ilustrado de forma simplificado o fluxograma de trabalho realizado no desenvolvimento desta tese.

Figura 5 - Fluxograma do trabalho desenvolvido nesta pesquisa.



Fonte: autor da tese

4.1 Materiais

Os principais reagentes utilizados no preparo das formulações foram:

- Carboximetilcelulose (viscosidade em solução 1%: 2000-3000 cps, grau de substituição 0.6-0.9, massa molar entre 7.500-8.900 KDa, LabSynth, Diadema, Brasil);
- Polivinil álcool (98% hidrolisado, massa molar entre 85-124 KDa, Selvol® 325);
- Quitosana (massa molar entre 50-190 KDa; grau de desacetilação: 75-85%; Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Avicel® RC 591 (gentilmente cedida pela DuPont, Wilmington, EUA);
- Goma Gelana alto grau de acilação (Massa molar 1000-2000 KDa, gentilmente cedida pela Kelcogel®, Atlanta, EUA);
- Papaína (30000 USP-U/mg, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA);
- Cloridrato de gencitabina (Sigma Aldrich, St Louis, EUA);

- Heptanosulfonato sódico ($C_7H_{15}O_3SNa$, Scharlau, Barcelona, Spain)
- Cloreto de Sódio ($NaCl$, Scharlau, Barcelona, Spain);
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4 , Scharlau, Barcelona, Spain);
- Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4 , Scharlau, Barcelona, Spain);
- Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4 , Scharlau, Barcelona, Spain);
- L-cisteína (Scharlau, Barcelona, Spain);
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, LabSynth, Diadema, Brasil);
- Ureia (Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Ácido úrico (Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Creatinina (Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Citrato de sódio diidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; LabSynth, Diadema, Brasil)
- Cloreto de potássio (KCl , LabSynth, Diadema, Brasil);
- Cloreto de amônio (NH_4Cl , LabSynth, Diadema, Brasil);
- Cloreto de cálcio diidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, LabSynth, Diadema, Brasil);
- Sulfato de Magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, LabSynth, Diadema, Brasil);
- Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$, LabSynth, Diadema, Brasil);
- Oxalato de Sódio (NaC_2O_4 , LabSynth, Diadema, Brasil);
- Sulfato de Sódio (Na_2SO_4 , LabSynth, Diadema, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, LabSynth, Diadema, Brasil);
- MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Bapna (Cloridrato de $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginina p-nitroanilida, Sigma Aldrich, St Louis, EUA)
- Ácido clorídrico (HCl , Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Ácido fosfórico (H_3PO_4 , Sigma Aldrich, St Louis, EUA);
- Acetonitrila (grau HPLC, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA);
- Dimetilsufóxido (grau HPLC, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA);
- Água deionizada;

Para os ensaios com células foram utilizadas as linhagens HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana, ATCC CRL-1730) e V79-4 (fibroblastos pulmonares de hamster chinês, ATCC CCL-93). Os meios de cultura foram RPMI

(*Roswell Park Memorial Institute medium*, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para HUVEC e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) suplementados com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, St Louis, EUA).

4.2 Preparo dos hidrogéis

Foram produzidos hidrogéis a partir de polímeros naturais amplamente aplicados na área biomédica e farmacêutica: quitosana, goma gelana com alto grau de acilação (Kelcogel®), carboximetilcelulose com celulose microcristalina (Avicel®) e carboximetilcelulose com polivinil álcool (PVA). A Tabela 1 mostra as formulações propostas.

Tabela 1. Formulações propostas para os hidrogéis.

Formulação	Polímero (m/v)	Solvente
A	Avicel® (3%)	H ₂ O
G	Goma gelana (0,1%)	Salina 0,9% (m/v)
Q	Quitosana (2%)	Ácido acético 0,1M (pH 4)
QT	Quitosana (2%) Termossensível	Ácido acético 0,1M (pH 4)
C	CMC (2%) + PVA (0,1%)	H ₂ O + 20% (v/v) glicerina

Fonte: autor da tese

Para o preparo do hidrogel de gelana, 10 mL de solução salina foram aquecidos até 100 °C em banho maria e então, 10 mg de gelana foram adicionados sob agitação magnética. Após completa solubilização do polímero a solução foi resfriada e o volume acertado com H₂O Milli-q. O gel foi mantido em geladeira (4 °C) para posterior uso.

O hidrogel de Avicel® (MCC) foi produzido por meio da adição de 3 g de microcelulose em 97 g de água deionizada. A dispersão do polímero ocorreu por agitação mecânica a 500 RPM até completa homogeneização, por aproximadamente 15 minutos. Para a estabilização da solução coloidal, aplicou-se uma taxa de cisalhamento, aumentando a rotação do agitador para 2000 rpm por mais 15 minutos. O gel também foi mantido sob condições de refrigeração (4 °C).

O gel de quitosana foi produzido dissolvendo-se 0,2 g de quitosana em 10 mL de ácido acético 0,1 mol/L (pH 4) até a completa homogeneização. Para a

forma termossensível, separadamente, preparou-se uma solução de β -glicerofosfato a 46% (m/v) e, em banho de gelo, essa solução foi adicionada gota a gota ao gel de quitosana em uma proporção de 2:6 (β -glicerofosfato: quitosana) e homogeneizado (KOLAWOLE; LAU; KHUTORYANSKIY, 2019).

Por fim, o gel de CMC e PVA se obteve pelo preparo prévio de uma solução estoque de PVA 1% (m/m) em autoclave e pela solubilização de 2 g de CMC em 60 mL de H₂O sob agitação mecânica. Após a completa solubilização do CMC, adicionou-se 20 ml de glicerina e 20 ml de PVA 1%. A mistura foi homogeneizada manualmente com uma espátula para a obtenção de um gel translúcido e viscoso. A formulação foi mantida em geladeira (4 °C).

4.3 Adição da papaína aos géis

O sistema gel/enzima foi obtido por meio da introdução da solução de papaína aos géis previamente preparados para obtenção de uma concentração final de 0,2% (m/v) de papaína. A concentração de 0,2% (m/v) é a ideal para promoção de permeação (FERRAZ et al., 2014). A homogeneização foi realizada cuidadosamente, com um bastão de vidro e, então, armazenado a 4 °C. A papaína solubilizada em tampão fosfato 50 mM (pH 7) também foi adicionada aos géis na mesma concentração. Para a adição do fármaco, este foi primeiramente solubilizado na solução de papaína ou em tampão fosfato (50 mM) antes de ser adicionado aos géis. A concentração de fármaco utilizada foi baseada no relatado na literatura em estudos similares (GUO et al., 2018; SHI et al., 2019). Por meio da Tabela 2 e a Tabela 3 é possível ver a composição das principais formulações. Nestas tabelas também estão as siglas que serão utilizadas para identificação de cada formulação na sequência do desenvolvimento do trabalho.

Tabela 2. Formulações preparadas a partir de goma gelana

Formulações	Goma Gelana (m/v)	NaCl 0,9%	Papaína (m/v)	Gencitabina (m/v)
G	0,1%	99,9%		
G1	0,1%	98,9%		1%
G2	0,1%	99,7%	0,2%	
G3	0,1%	98,7%	0,2%	1%

Tabela 3. Formulações preparadas a partir da blenda de CMC com PVA

Formulações	CMC (m/v)	PVA (m/m)	Glicerina (v/v)	H ₂ O (v/v)	Papaína (m/v)	Gencitabina (m/v)
C	2,0%	0,2%	20,0%	77,8%		
C1	2,0%	0,2%	20,0%	76,8%		1%
C2	2,0%	0,2%	20,0%	77,6%	0,2%	
C3	2,0%	0,2%	20,0%	76,6%	0,2%	1%

4.4 Quantificação da Atividade Enzimática da Papaína

A atividade enzimática da papaína livre e inserida nos géis foi quantificada utilizando como substrato o Cloridrato de N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (Bapna). Este método é baseado na lise do substrato bapna por meio da atividade proteolítica da papaína. A cisão das cadeias do substrato gera um produto de cor amarelada e pode ser medido colorimetricamente. Para este ensaio, os géis foram diluídos a 5% (m/v) com tampão fosfato 50 mM, a fim de diminuir sua viscosidade e possibilitar a reação. Em uma placa de 96 poços, mantida em banho de gelo, foram adicionados 100 μ l de cada formulação com 120 μ l de uma solução 0,8 mg/ml de bapna em tampão cisteína-versene. A placa foi protegida da luz e transferida para uma estufa a 40 °C para iniciar as reações. Após 0, 15, 30 e 45 minutos, as reações foram paradas por meio da adição de 50 μ l de ácido acético (10% v/v). A absorbância foi então medida a 415 nm em um leitor de placas (BIORAD, modelo 680 Microplate Reader, EUA). A atividade enzimática foi estimada a partir da inclinação da reta obtida do gráfico de absorbância por tempo. A atividade da papaína em cada formulação foi comparada com a papaína em solução de tampão fosfato 50 mM em mesma concentração (FERRAZ et al., 2014).

4.5 Avaliação da estrutura superficial das formulações: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, os hidrogéis foram previamente congelados em gelo seco e colocados em liofilizador para secagem a vácuo, em um equipamento da Solab (Brasil) por 24h. As amostras foram, então, cortadas em corpos de prova de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm e acomodadas em *stubs* com fita de carbono. As imagens foram obtidas sem recobrimento em um equipamento do tipo *table top* da HITACHI TM3000 (USA) com 30 nm de resolução.

4.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polímeros e das formulações

Os ensaios de FTIR foram feitos com as amostras previamente congeladas e secas a vácuo em um liofilizador (Solab, Brasil). Utilizou-se um equipamento Vertex 70v da Bruker (Massachusetts, EUA), a 18 °C com 2 cm⁻¹ de resolução dentro de uma faixa de 600 a 6000 cm⁻¹. Foram analisadas amostras dos polímeros e do cloridrato de gencitabina puros. Os géis foram avaliados puros, com papaína e fármaco. No caso do gel de Avicel® observou-se incompatibilidade do gel com o quimioterápico, impossibilitando a análise.

4.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos polímeros e das formulações

O DSC foi realizado com os géis (aproximadamente 8 mg) secos à vácuo em liofilizador (Solab, Brasil), alocados em cadinhos de alumínio vedados, em um equipamento Mettler Toledo/822 (EUA), dentro de uma faixa de temperatura de -30 a 220 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹).

4.8 Gelificação da Gelana

O gel de gelana foi testado em relação à sua propriedade de gelificação na presença urina artificial. O gel foi adicionado a um tubo de centrífuga de 50 mL contendo urina e incubado a 37 °C. Observou-se visualmente se houve dissolução do gel ou gelificação.

4.9 Comportamento reológico das formulações

A caracterização reológica dos géis foi realizada em um reômetro rotacional Physica MRC 301 (Anton Paar, Áustria). Os géis foram submetidos primeiramente a um pré-teste com variação de tensão e frequência fixa (*Amplitude Sweep*) para determinação da faixa de tensão em que os materiais se comportam de maneira linear (tensão=0.1-100%). Após essa determinação, as amostras foram submetidas a ensaios com variação de frequência (ω) para avaliação do comportamento dos módulos de perda (G'') e armazenamento (G'). Para as formulações de goma gelana, utilizou-se um intervalo de frequência entre 25-150 rad/s e, para as de CMC com PVA, uma faixa entre 0.1 e 100 rad/s.

Por fim, as formulações foram submetidas a um terceiro ensaio para avaliação da viscosidade mediante variações de taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), dentro de um rango de 0,1 a 100 s⁻¹. Todos os ensaios foram executados a temperatura constante de 37 °C.

Os testes de reologia foram realizados nas hidrogéis antes e depois da adição da papaína para verificação da possível influência no comportamento reológico das matrizes poliméricas. Este estudo foi fundamental para compreensão da viabilidade dos géis para administração por meio de instilação bem como do comportamento do sistema no interior da bexiga, quando os géis terão papel de proteger o ativo da alta irrigação da bexiga.

4.10 Estudo da mucoadesividade: ensaio de retenção dos géis

Para a realização desse ensaio, urina artificial foi preparada em laboratório. Os sólidos (Tabela 4) foram diluídos em 2 L de água Milli-q (18,2 MΩcm) e a solução filtrada. O pH final foi de 6,2 ± 0,2 (CHUTIPONGTANATE; THONGBOONKERD, 2010).

O estudo de retenção dos géis foi realizado de acordo com o descrito por Kolawole et al. (2019), com algumas adaptações. Bexigas suínas frescas foram obtidas do Frigorífico Suzano (São Paulo, Brasil) logo após o abate dos animais e transportadas em caixa de isopor com gelo para o laboratório. Os ensaios foram realizados dentro de 24 horas a fim de utilizar tecidos com células ainda viáveis. Em laboratório, as bexigas foram abertas e manuseadas de forma a evitar ao máximo o contato com o urotélio, visando preservar sua estrutura. Corpos de prova de aproximadamente 2 cm x 2 cm foram cortados com a ajuda de uma tesoura cirúrgica e acomodados em placas de Petri de vidro com 6,7 cm de diâmetro e 1,4 cm de profundidade. As placas de Petri, por sua vez foram acomodadas em uma plataforma com 37° de inclinação a 37 °C de temperatura.

Tabela 4 - Reagentes para preparo de urina artificial

Componente	Massa
Ureia	24,27 g
Ácido úrico	0,34 g
Creatinina	0,90 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	2,97 g
NaCl	6,34 g
KCl	4,50 g
NH ₄ Cl	1,61 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,89 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g
NaHCO ₃	0,34 g
NaC ₂ O ₄	0,03 g
Na ₂ SO ₄	2,58 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,00 g
Na ₂ HPO ₄	0,11 g

Quantidades para o preparo de 2 L de urina artificial com pH = 6.2

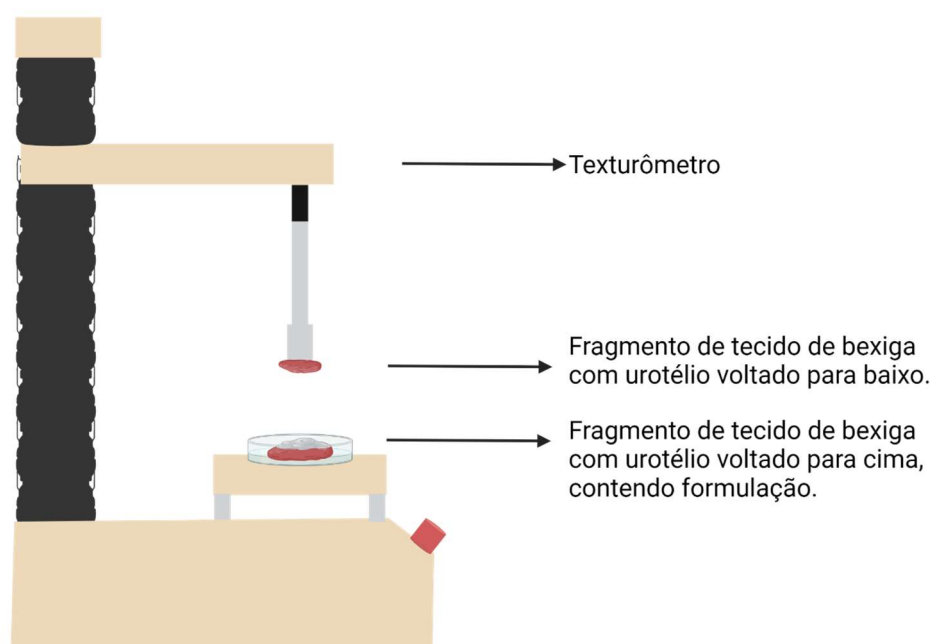
Os tecidos foram previamente lavados com 3 mL de urina artificial e, então, 50 µL de cada formulação (previamente corada com Fluoresceína sódica 0,1%) foram aplicados em seus respectivos corpos de prova. A urina que ficou retida nas placas foi descartada e aguardou-se 10 minutos para que houvesse a formação das pontes de adesão entre os géis e o urotélio. Após o tempo estipulado, foi iniciada a etapa de lavagens com 5 mL de urina, totalizando 5 ciclos em cada corpo de prova. Entre cada lavagem, foram realizadas imagens em um microscópio de fluorescência com excitação na cor verde para avaliação do gel retido nos tecidos. A fluoresceína sódica em água foi utilizada como controle. As imagens obtidas foram, posteriormente, analisadas no software ImageJ para quantificação da intensidade de fluorescência. Os dados obtidos foram avaliados por meio ANOVA two way ($p < 0.05$).

4.11 Ensaio de Força de Bioadesão

Para medir a força de adesão dos hidrogéis ao urotélio, dois fragmentos de bexigas suínas de aproximadamente 2 cm x 2 cm foram alocadas em um

texturômetro TA.XT Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems/Extralab), de forma que os dois fragmentos fiquem dispostos com seus respectivos urotélios “face a face”. Ao corpo de prova acomodado na plataforma inferior, foram aplicados 800 μ L de cada hidrogel e o equipamento programado para que o tecido superior (sem amostra) fosse de encontro com o inferior e permanecesse em contato por 1 minuto. Na Figura 6 está representado um esquema de como os corpos de prova foram acomodados no equipamento. Após esse período o equipamento registrou a força total de separação dos tecidos e o trabalho de adesão. Para que o teste ocorresse dessa maneira, o equipamento foi programado com os seguintes parâmetros: *velocidade de pré-teste: 1,0 mm/s; velocidade do teste: 1 mm/s; velocidade pós-teste: 1 mm/s; força aplicada: 0,5 N; tempo de contato: 60 s; tipo de gatilho: auto; força de gatilho: 0,001 N; distância de retorno: 15,0 mm*. Um gráfico da força pela distância foi gerado. A força máxima para separar o urotélio do hidrogel indicou a força adesiva da formulação e o trabalho total de adesão foi avaliado por meio da área sob a curva do gráfico força x distância (BOATENG; PAWAR; TETTEH, 2013; CALÓ et al., 2016; KOLAWOLE; LAU; KHUTORYANSKIY, 2019). Para este ensaio, foram utilizadas bexigas doadas pelo matadouro Compostelana de Carnes (Santiago de Compostela, Espanha).

Figura 6 - Esquema representativo do ensaio de força de bioadesão.



Fonte: autor da tese.

4.12 Interação polímero e mucina: avaliação reológica

Uma solução estoque a 10% (m/v) de mucina foi preparada no dia do experimento para garantir sua estabilidade. Misturas contendo uma parte de mucina (10%) e uma parte de formulação foram agitadas por 2 horas previamente às análises, que foram realizadas em triplicatas. À temperatura de 37°C, as amostras foram avaliadas quanto à sua viscosidade mediante variação de taxa de cisalhamento (de 1 a 200 s⁻¹) em um reômetro AR 1000-n (TA Instruments, EUA)(ESHEL-GREEN; BIANCO-PELED, 2016). Os controles foram preparados misturando os géis com água deionizada.

4.13 Estudo da estabilidade das formulações

4.13.1 Estabilidade Preliminar

Previamente ao início dos estudos de estabilidade, as formulações propostas foram submetidas ao teste de centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. Apenas as amostras aprovadas nesse estágio foram então submetidas ao teste de estabilidade preliminar. Essa etapa simula a atuação da força da gravidade nas amostras de forma aumentada, intensificando a mobilidade das partículas e antecipando eventuais instabilidades como precipitação, separação de fases, entre outras. Todos os ensaios de estabilidade foram realizados em acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004).

A etapa de estabilidade preliminar teve como objetivo realizar uma triagem entre as formulações na fase inicial de desenvolvimento. Neste ensaio, de duração reduzida, as amostras foram submetidas a condições extremas de temperatura a fim de se acelerar potenciais reações entre os seus componentes e o aparecimento de sinais que indiquem instabilidade. Neste ensaio, não se pretendeu determinar a vida útil do produto.

Foram acondicionados 4 mL de cada formulação em frascos de vidro com volume total de 5 mL, com tampa, e submetidos a ciclos alternados de aquecimento e congelamento. A duração do ensaio foi de doze dias e os ciclos adotados foram: 24 horas a 45 ± 2 °C e 24 horas a -5 ± 2 °C. As amostras foram avaliadas diariamente em relação às suas propriedades organolépticas e pH. Para a avaliação do pH, preparou-se soluções a 5% (m/v) dos géis em água neutra. O aspecto visual das formulações foi avaliado e classificado da seguinte forma:

normal sem alterações; levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; separado, precipitado ou turvo. Cor e odor também foram avaliados e classificados em: normal, sem alterações; levemente modificada; modificada; ou intensamente modificada. O ensaio foi realizado em triplicata para todas as formulações.

4.13.2 Estabilidade

O estudo da estabilidade foi realizado em acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), com modificações (os frascos utilizados continham volume exato das amostras, conforme explicado mais adiante). Para este ensaio, as amostras foram previamente desinfectadas em autoclave por 20 min (120°C). No caso dos géis de CMC com PVA, a blenda de polímeros foi autoclavada e, em seguida, para evitar contaminação, a glicerina foi adicionada dentro de um fluxo laminar. Esta etapa foi realizada após a autoclavagem devido à observação de amarelamento da glicerina após aquecimento. A papaína e a gencitabina (filtradas em filtro 0.2 µm) também foram adicionadas a todas as formulações após autoclavagem (em fluxo laminar), a fim de preservar a enzima que sofreria desnaturação mediante o processo de aquecimento à 120 °C.

As amostras foram, então, aliqüotadas em frascos de vidros de 2 mL, sem espaço livre a fim de minimizar a presença de oxigênio e, conseqüentemente, a oxidação da papaína. Os frascos foram selados e mantidos em geladeiras (T= 4 °C), protegidos da luz, avaliados em relação a aspectos visuais, pH e atividade proteolítica da papaína (para as formulações contendo enzima) nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias.

A atividade proteolítica relativa foi avaliada de acordo com o método previamente descrito no tópico 5.7. No tempo zero, a atividade das formulações foi comparada com a atividade da enzima isolada. Para os outros tempos (30, 60 e 90) considerou-se para cada formulação, a atividade inicial como 100%. O experimento foi realizado em triplicata.

4.14 Ensaio de liberação *in vitro* do princípio ativo

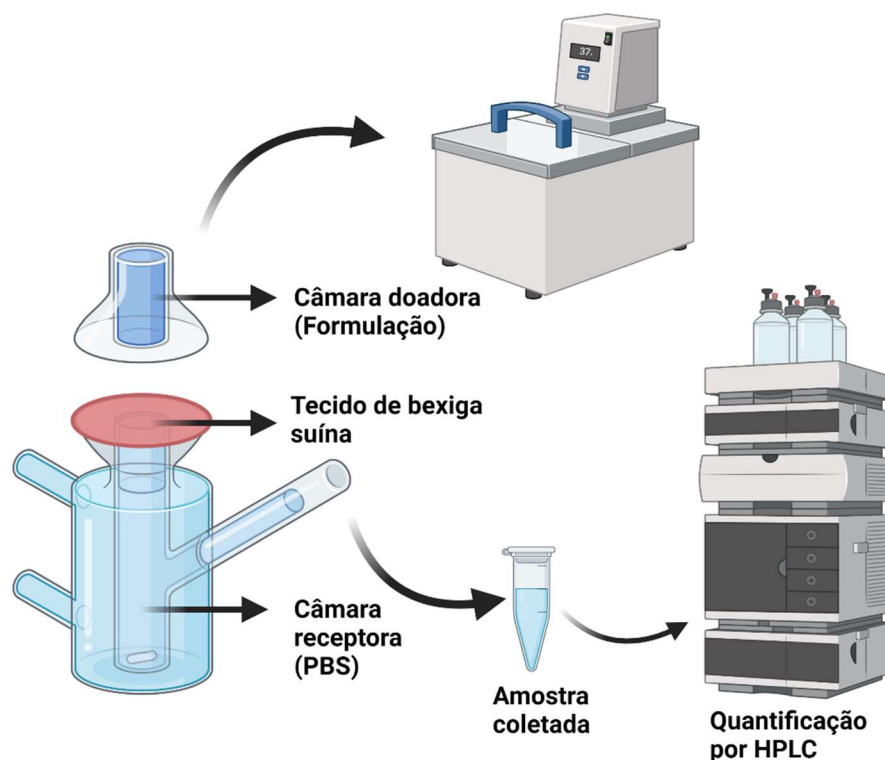
Os estudos de liberação *in vitro* da substância ativa foram realizados em triplicatas com 1 mL de cada formulação em sacos de diálise (Molecular Weight Cut Off= 1000 Da). Os sacos, por sua vez, foram imersos em 30 mL de PBS, dentro de

frascos de plásticos tampados e incubados em um equipamento agitador (Heidolph, Unimax 1010/ incubator 1000) a 37°C, sob agitação contínua (100 rpm). Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos intervalos de 0, 30, min, 1, 2, 4, 6, 8 horas e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias. O sobrenadante recolhido para avaliação foi repostado com PBS fresco. A quantificação da gencitabina liberada foi avaliada por HPLC (Cromatografia Líquida de alta performance, JASCO), usando uma coluna Spherisorb ODS2 (5 µm, 4.6mm x 250 mm), a 40 °C, usando como fase móvel, tampão fosfato (50mM, pH=3) contendo 0,660 g/L de heptanossulfonato como reagente de pareamento iônico, com fluxo de 1 mL/min e detector UV em $\lambda=268$ nm. O tempo de corrida foi de 10 minutos e o de retenção da gencitabina, aproximadamente, 5 minutos. A curva de calibração foi realizada entre 0,5 ppm e 50 ppm, com acurácia de 98,7%, precisão com coeficiente de variação < 3%, e linearidade com fatores de variação dos fatores de resposta <5%. A acurácia foi obtida por meio do cálculo do parâmetro de porcentagem de recuperação (PRc); a precisão pelos valores dos coeficientes de variação (CV%) das medidas repetidas para as concentrações estudadas; e a linearidade avaliada por meio dos parâmetros de coeficiente de correlação (r) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (CVFR).

4.15 Capacidade de Permeação *ex-vivo* das formulações

O ensaio de permeabilidade foi realizado para avaliação do efeito da papaína na permeação do ativo através do urotélio. Amostras de bexigas suínas de aproximadamente 2 x 2 cm foram colocadas em células de Franz com área de permeação de 0,785 cm². A fim de minimizar o erro, utilizou-se a mesma bexiga para as formulações compostas a partir dos mesmos polímeros. A câmara receptora foi preenchida com 6 mL de PBS (pH 7.4) e, na câmara doadora, foram pipetados 2 mL também de tampão PBS e as células foram incubadas em banho a 37 ± 2 °C sob agitação a 100 rpm. Após 30 minutos de equilíbrio, o PBS das câmaras doadoras foi removido e substituído por 2 mL das formulações contendo gencitabina. Em tempos pré-determinados (30 min, 1, 2, 4, 6 e 7 horas) alíquotas de 1 mL foram recolhidas das câmaras receptoras e preenchidas com PBS fresco (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo do teste de permeabilidade com células de Franz



Fonte: autor da tese

As amostras foram congeladas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise por HPLC. Após 7 horas, as amostras de tecido foram removidas das células de Franz e transferidas a tubos de centrífuga de 15 mL contendo 3 mL de DMSO (50% v/v) para extração do fármaco. Os tubos foram mantidos sob agitação de 150 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas. As amostras foram, então, sonicadas (modelo 3510, 40 Hz, Branson - Danbury, EUA) por 99 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, os tecidos removidos e, as soluções centrifugadas por 1000 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, filtradas ($0,2\text{ }\mu\text{m}$) e centrifugadas novamente a 14000 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos para eliminar proteínas insolúveis. O sobrenadante foi então avaliado por HPLC para quantificar a gencitabina que permaneceu retida nos tecidos. O fluxo estacionário (*steady state flow J*) de cada amostra foi obtido a partir da inclinação da regressão linear obtida das concentrações do fármaco obtidas na câmara receptora pelo tempo; e o tempo de latência (*lag time T₀*) pela intersecção do eixo x (TOFFOLETTO et al., 2021). O ensaio foi realizado com as formulações mais promissoras, em triplicata, e os

resultados apresentados na forma de média \pm desvio padrão. A significância estatística foi calculada utilizando teste ANOVA two-way ($p < 0.05$).

4.16 Ensaios de Biocompatibilidade

4.16.1 Citotoxicidade

Este ensaio de biocompatibilidade foi realizado com as formulações na ausência do quimioterápico, em células saudáveis para verificação da possível toxicidade dos materiais propostos como veículo de um medicamento já utilizado clinicamente. Como etapas futuras para este estudo, é necessário a realização de testes em linhagens celulares tumorais para a verificação da eficácia (ação citotóxica) do fármaco quando carregado nos géis propostos.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com o propósito de verificar a biocompatibilidade das formulações propostas em duas linhagens celulares: HUVEC (endotelial de cordão umbilical humano) e V79-4 (fibroblastos). Foram semeadas 5×10^3 células em cada poço de uma placa de 96 poços, sendo que cada poço continha 100 μ L de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, com umidade relativa entre 70-80%, em atmosfera com 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado e substituído por uma mistura de 50% de meio de cultura e 50 % de cada formulação. Para este ensaio também foi utilizada a papaína solubilizada em tampão, na mesma concentração que foi utilizada nos géis.

As células foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, a cada poço, foram adicionados 25 μ L de solução de MTT e as placas foram novamente incubadas, desta vez por 3 horas. Após este período, foram adicionados 100 μ L de DMSO para solubilizar o MTT metabolizado pelas células viáveis e as placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax i3), utilizando comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados das amostras foram comparados com controles negativos (células incubadas com meio de cultura contendo PBS). Cada amostra, incluindo o controle, foi testada em 4 poços da placa. As médias dos dados de cada grupo de 8 poços foram comparadas entre si utilizando teste ANOVA, considerando $p < 0,05$.

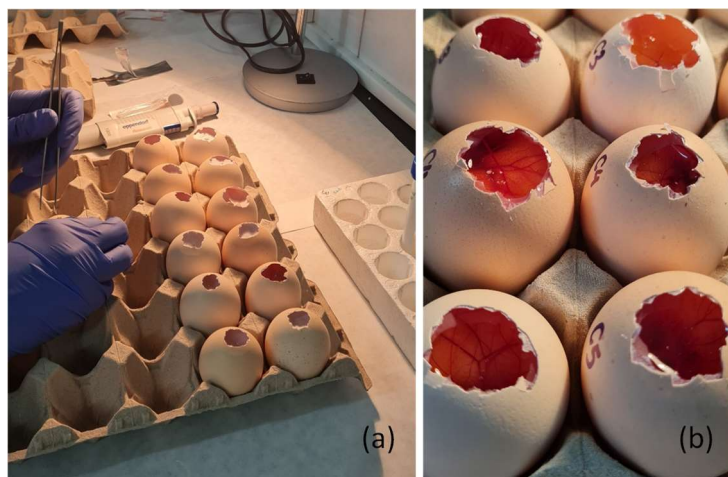
4.16.2 Avaliação do potencial irritante das formulações pelo método HET CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane)

Ovos de galinha fecundados (Coren, Espanha) pesando 50-60 g foram incubados a 37 °C, com 60% de umidade relativa em uma câmara climatizadora (Ineltec, CC SR 0150, Barcelona) por 8 dias. A cada 8 horas, os ovos eram rotacionados para evitar adesão do embrião à casca. Em seguida, conforme é possível observar na Figura 8-a, a parte de cima da casca dos ovos foi removida com agulha e pinça, a membrana interior umedecida com solução 0.9% NaCl e os ovos devolvidos à incubadora por mais 30 minutos. Após esse período, a membrana interior foi removida para que a membrana corioalantóica ficasse exposta (Figura 8-b). Foram pipetados 300 µL de cada formulação na membrana e o tempo de hemorragia (Htime), lise (Ltime), e/ou coagulação (Ctime) foram monitorados por 5 minutos. Controles negativo (NaCl 0.9%) e positivo (NaOH 0.1 M) foram testados da mesma maneira. A pontuação de irritação (IS) foi calculada de acordo com a equação 1.

$$S = \left(\left(301 - \frac{Htime}{300} \right) * 5 \right) + \left(\left(\frac{301-Ltime}{300} \right) * 7 \right) + \left(\left(301 - \frac{Ctime}{300} \right) * 9 \right) \quad (1)$$

De acordo com os valores de IS calculados, os materiais foram classificados como não-irritantes (0-0,9), levemente (1-4,9), moderadamente (5-8,9) ou severamente (9-21) irritante. O ensaio foi realizado em duplicata.

Figura 8 - Preparo dos ovos para o ensaio de HET-CAM. Em (a) os ovos estão sendo abertos com o auxílio de agulha e pinça e em (b) observa-se a membrana corioalantóica exposta.

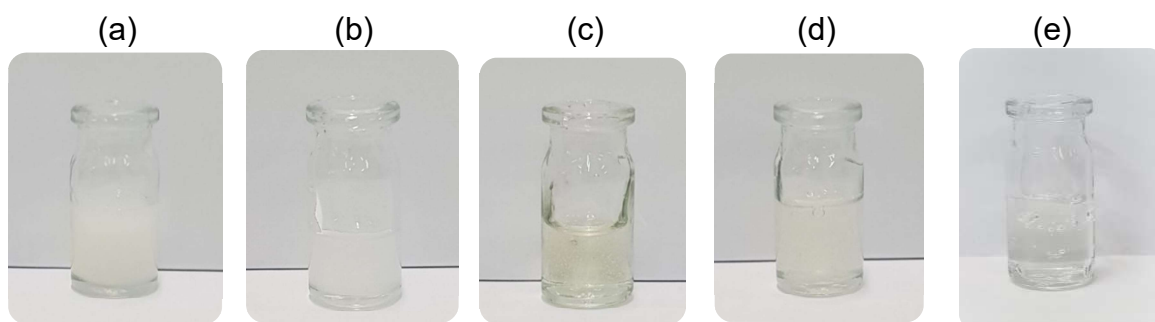


5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Hidrogéis Propostos

Os hidrogéis preparados apresentaram aspecto homogêneo e viscoso, com potencial para aplicação por seringa e cateter. Na Figura 9 estão pode-se observar o aspecto visual das formulações obtidas a partir de cada polímero ou blenda.

Figura 9 - Hidrogéis obtidos (a) Avicel® 3%; (b) goma gelana 0,1%; (c) quitosana; (d) quitosana termosensível e (e) CMC com PVA.



5.1.1 Adição da papaína nos hidrogéis

A papaína foi adicionada aos hidrogéis em quantidade suficiente para de se obter uma concentração de 0,2% (m/v). As misturas foram homogeneizadas cuidadosamente, com bastão de vidro e observou-se aparentes alterações de viscosidade. Visualmente, os hidrogéis de quitosana perderam sua viscosidade imediatamente ao entrarem em contato com a solução de papaína, indicando que houve processo de quebra das cadeias poliméricas (despolimerização). Por outro lado, os géis de gelana, Avicel® e CMC com PVA não apresentaram alterações visuais em relação às suas viscosidades por um período de até duas semanas, mantendo, inclusive, o comportamento tixotrópico (Avicel®). Ao adicionar o fármaco, a formulação de Avicel® apresentou incompatibilidade, desestabilizando na presença da gencitabina.

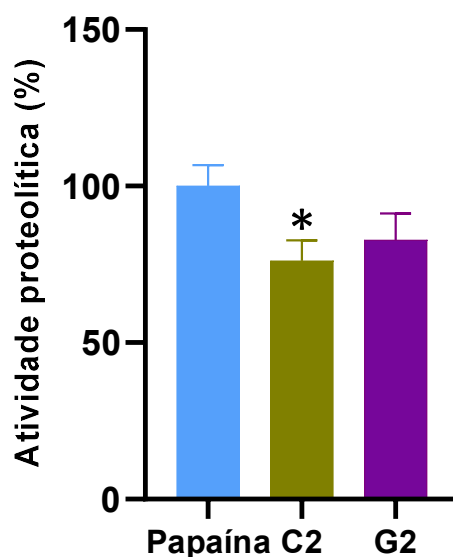
Ao entrar em contato com a gencitabina, a formulação de Avicel provavelmente sofreu um floculação. Este processo pode ter ocorrido por conta de neutralização das cargas (que em materiais celulósicos são negativas), formação de ligações, ou uma combinação dos dois mecanismos (SANDELL; LUNER, 1974). Portanto, os géis de quitosana, quitosana termosensível e Avicel® foram descartados a partir desta etapa.

5.2 Quantificação da Atividade Enzimática da Papaína nos géis

A atividade proteolítica da papaína foi avaliada após ser adicionada aos géis para averiguação da perda de atividade enzimática após manipulação no processo de preparo. A atividade relativa das formulações está apresentada na Figura 10.

Ao ser inserida no gel de CMC com PVA apresentou atividade de $76,2 \pm 6,5$ % ($p < 0,05$), já no gel de gelana, a atividade foi de $82,8 \pm 8,5$ % ($p > 0,05$). A perda de cerca de 20% da atividade no gel de CMC com PVA está relacionada às etapas do processo de preparo da formulação, que envolvem, por exemplo, diluição da papaína, alterações de temperatura e agitação, que podem acarretar na oxidação de parte da enzima.

Figura 10 - Atividade enzimática relativa da papaína após adição às formulações de CMC com PVA e de goma gelana.



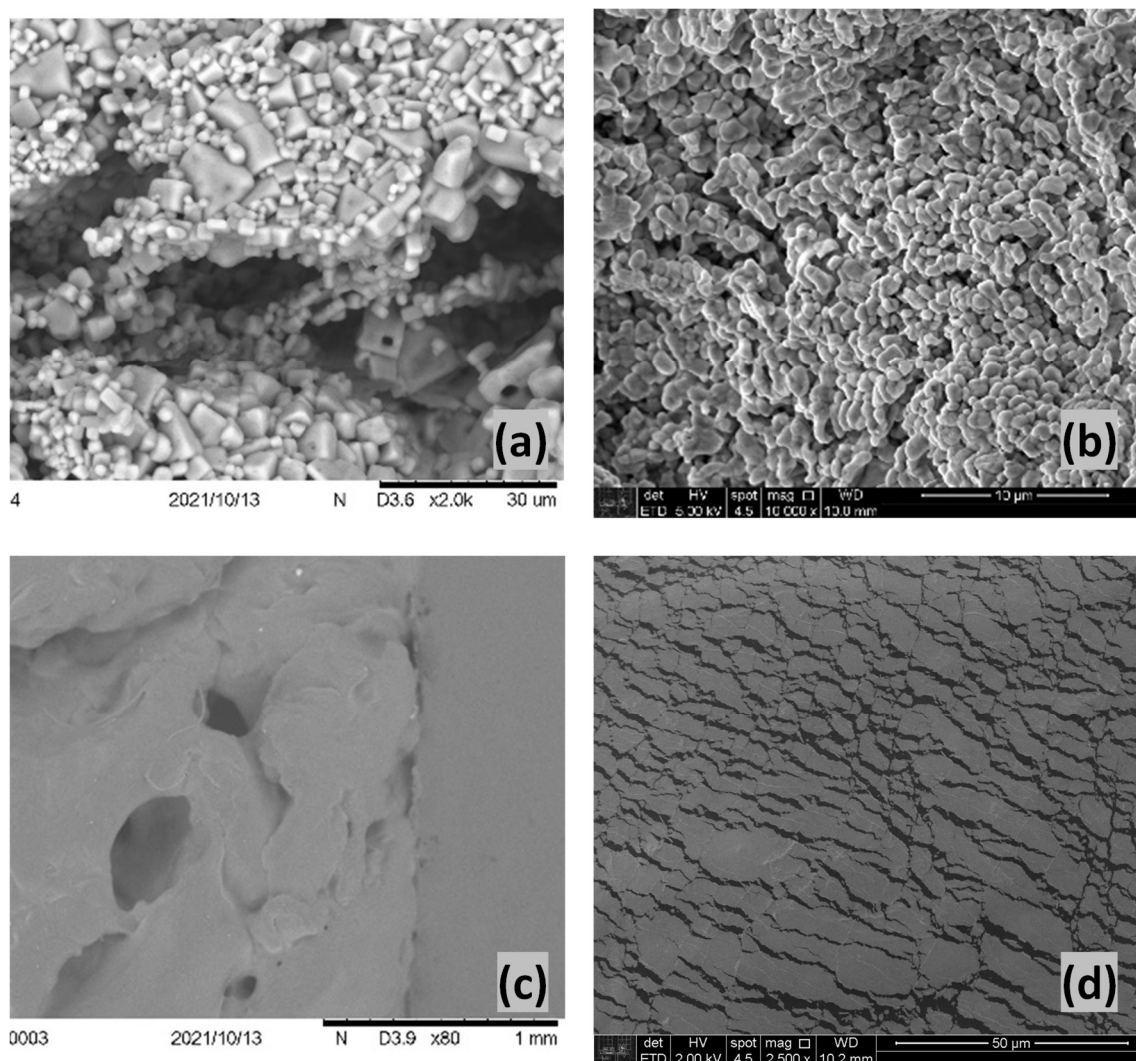
Fonte: autor da tese

5.4 Avaliação da estrutura superficial das formulações: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com os hidrogéis de gelana e CMC com PVA (Figura 11). Por meio das imagens obtidas foi possível observar a morfologia dos materiais, e identificar a presença de cristais nas formulações G e G2 (Figura 11 a e b, respectivamente), em consequência à característica semicristalina da goma gelana. Observou-se também a presença de alguns poucos poros de tamanhos aproximados de $69,1 \pm 6,3$ μm para o gel de

gelana e de $0,43 \pm 0,2$ mm para o de CMC e PVA. Esses poros, por serem irregulares, principalmente no caso da amostra de CMC com PVA, estão relacionados ao processo de cristalização de água por congelamento e extração do solvente por secagem a vácuo em liofilizador (RAVNIK et al., 2018). A taxa de congelamento das amostras influi no processo de cristalização da água e, portanto, no tamanho destes poros. Congelamentos mais rápidos (com nitrogênio, por exemplo), tendem a formar cristais, e, portanto, poros menores. Por outro lado, taxas mais lentas de congelamento favorecem a formação de cristais maiores. As formulações C e C2 (Figura 11 c e d, respectivamente) apresentaram superfície mais homogênea em virtude da presença do glicerol (plastificante) e à natureza amorfa da CMC. A Presença da papaína não alterou a estrutura dos géis.

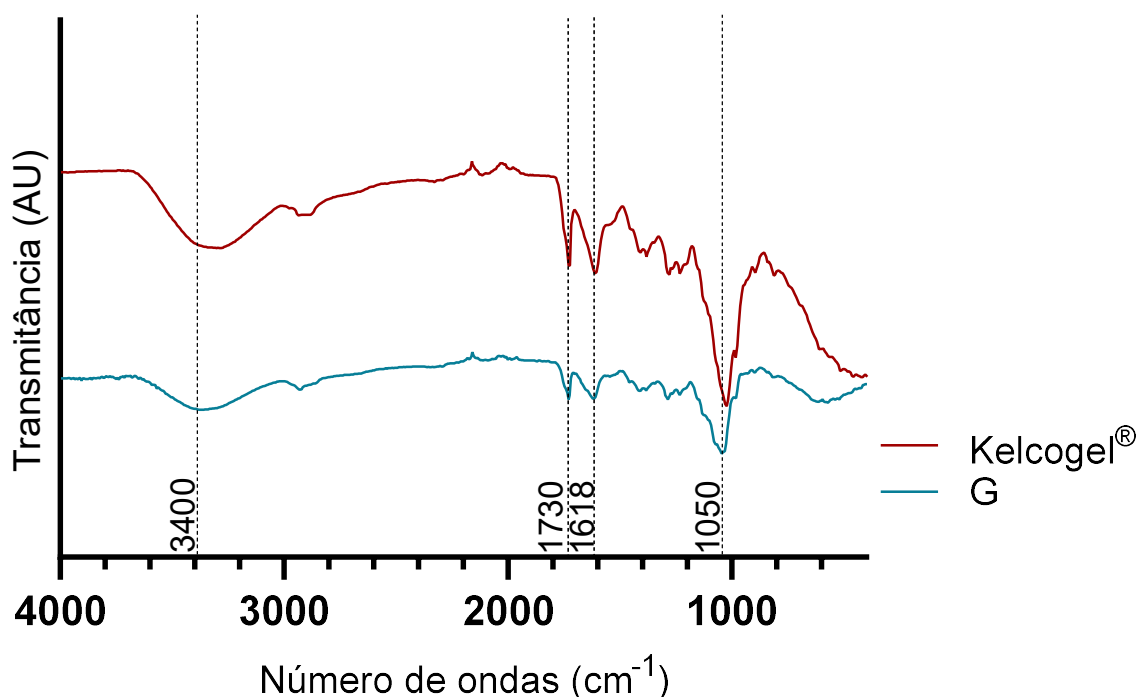
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura dos géis (a) G- goma gelana; (b) G2-goma gelana com papaína; (c) C-CMC e PVA; (d) C2-CMC e PVA com papaína



5.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polímeros e das formulações

A espectroscopia no infravermelho foi realizada com as formulações de gelana e de CMC com PVA. As amostras de cada formulação foram secas à vacuo por liofilização previamente às análises. Na Figura 12, no espectro obtido a partir do Kelcogel, polímero utilizado para preparo do gel de gelana, é possível identificar as principais bandas referentes às vibrações das ligações químicas presentes em sua estrutura molecular. O estiramento em 3400 cm^{-1} se refere às vibrações das ligações dos grupos -OH presentes nos anéis de glicopiranosose e a banda em 1618 cm^{-1} é atribuída às ligações glicosídicas presentes na gelana (SUDHAMANI; PRASAD; UDAYA SANKAR, 2003; AADIL et al., 2019). Ainda observou-se a presença de uma banda intensa em 1050 cm^{-1} referente a vibrações de estiramento de ligações C-O (LIMA et al., 2021). O sinal em 1730 cm^{-1} está relacionado à presença do grupo acetil (XU et al., 2018).

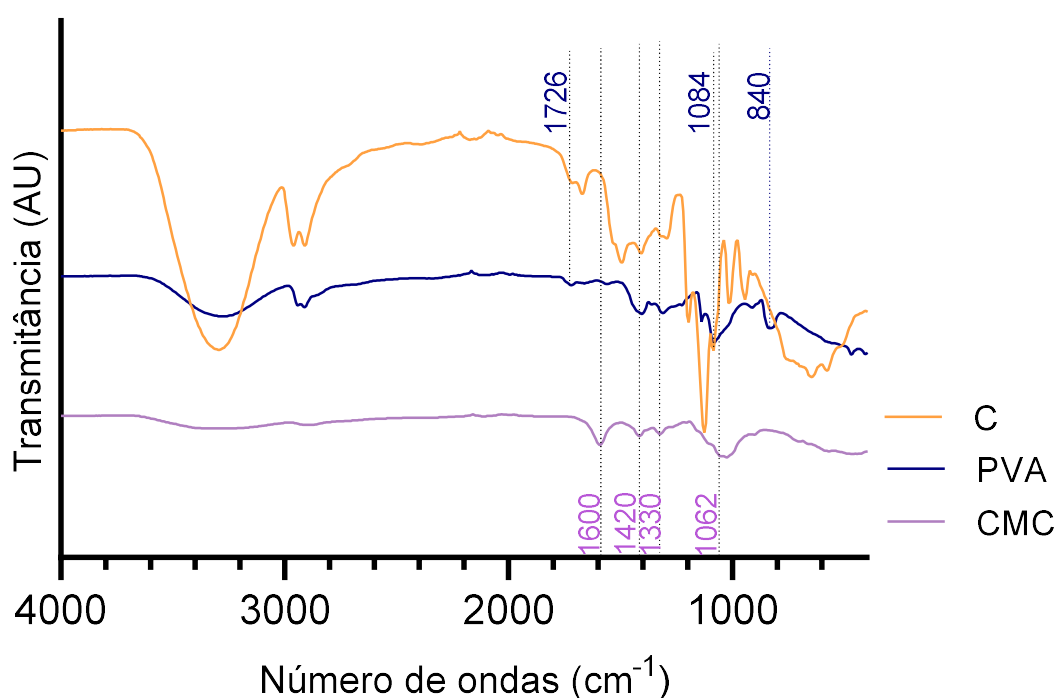
Figura 12 - Espectros de FTIR obtidos dos polímero kelcogel® e formulação G



O espectro do CMC puro (Figura 13) apresentou uma banda larga, mas de pouca intensidade em aproximadamente 3300 cm^{-1} relacionada às ligações de estiramento dos grupos hidroxilas; em 2920 cm^{-1} uma pequena banda referente ao

estiramento assimétrico das ligações $-CH_2$; e em 1600 cm^{-1} uma banda de intensidade mediana relacionada ao estiramento dos grupos carboxilatos ($-COO^-$). Em 1420 cm^{-1} uma banda fraca relacionada ao dobramento angular (tesoura) de ligações $-CH_2$; em 1330 cm^{-1} uma banda também fraca de deformação angular de hidroxilas; e, por fim, em 1062 cm^{-1} uma banda de intensidade média relacionada ao estiramento das ligações $-CH-O-CH_2$. No espectro do PVA puro, as principais bandas descritas na literatura também foram observadas: em 3300 cm^{-1} uma banda larga de estiramento de ligações $-OH$; em 2948 cm^{-1} uma banda de intensidade fraca referente ao estiramento assimétrico de $-CH_2$; em 1726 cm^{-1} relacionada ao estiramento de $-C=O$ remanescentes no PVA devido aos resíduos de grupos acetatos do processo de hidrólise do polivinil acetato; em 1084 cm^{-1} estiramento de $-C-O$ e, em 840 cm^{-1} vibrações de rotação de $-CH_2$ (MORSI et al., 2019).

Figura 13 - Espectros de FTIR obtidos dos polímeros CMC, PVA e da blenda C (CMC com PVA).



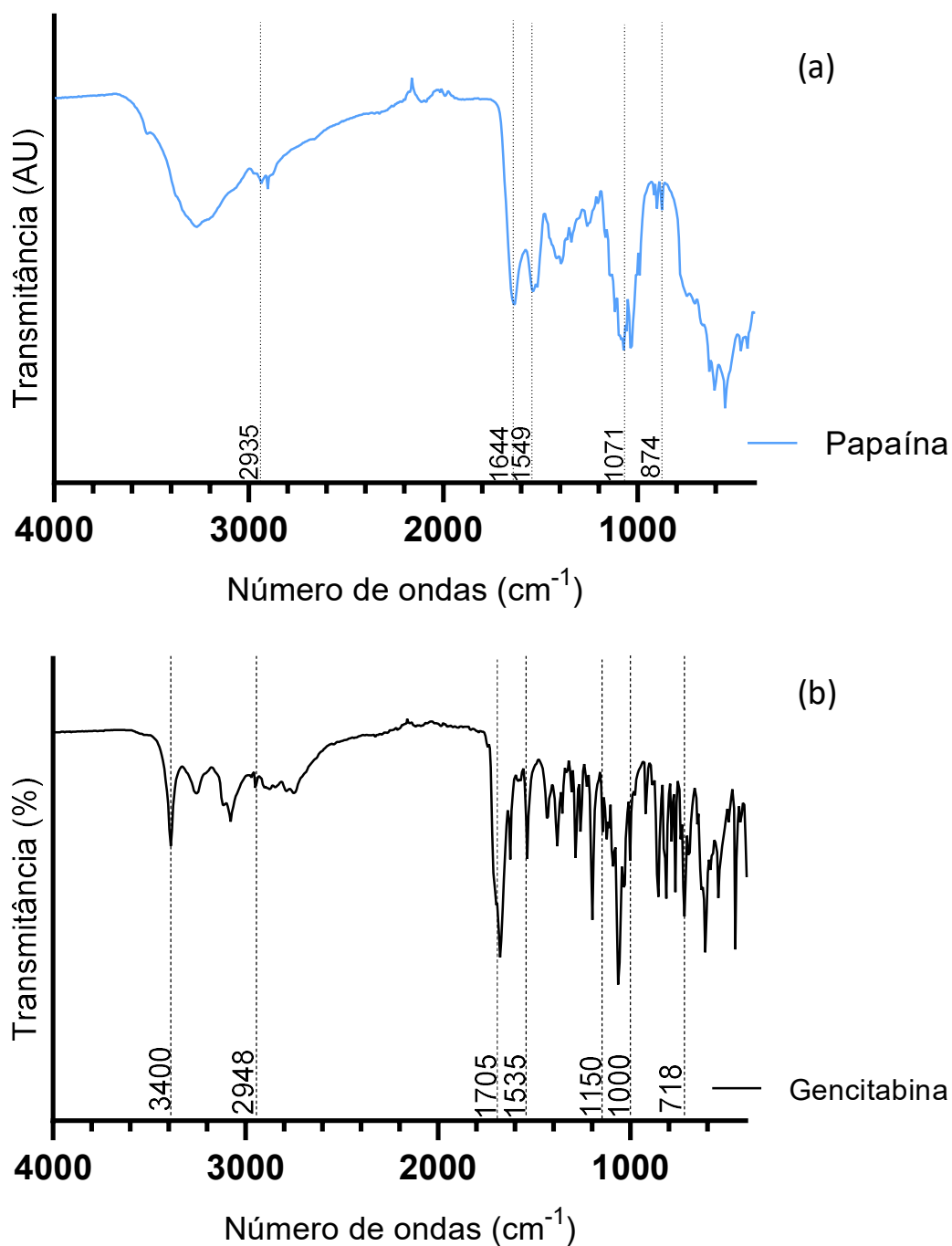
Comparando o espectro da blenda de CMC e PVA com os espectros dos polímeros puros, observou-se um aumento na primeira banda, em aproximadamente 3304 cm^{-1} referente às ligações de estiramento de grupos hidroxilas. A banda referente ao grupo $-C=O$ do PVA (1726 cm^{-1}) aparece no

espectro da blenda como um pequeno ombro em 1722 cm^{-1} e o grupo -COO^- do CMC (1600 cm^{-1}) aparece com menor intensidade, indicando a afinidade dos dois componentes. A banda referente à estrutura cristalina do PVA em 1084 cm^{-1} foi afetada, ficando mais larga por interferência do modo vibracional da banda CH-O-CH₂ do CMC, em 1062 cm^{-1} . Essas alterações sugerem a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre o PVA e o CMC, uma vez que o PVA apresenta uma tendência a interagir com polímeros aniônicos, como o CMC (MORSI et al., 2019).

O espectro referente à papaína (Figura 14 a) apresentou bandas similares ao descrito na literatura. A primeira banda larga observada em 3306 cm^{-1} está relacionada às vibrações de estiramento dos grupos -O-H , seguida de uma pequena banda em 2935 cm^{-1} atribuída a ligações -C-H (sp^3). Em 1644 cm^{-1} e 1549 cm^{-1} foram observadas bandas referentes às vibrações de estiramento dos grupos carbonilas (-C=O) das amidas I e II, respectivamente, da estrutura secundária da proteína. Por fim, foram identificadas também deformações em 1043 , 1070 e 874 cm^{-1} referentes a vibrações de estiramento das ligações -C-S de sulfeto e dissulfeto das cisteínas da papaína (LIU et al., 2017; SOARES et al., 2020).

A análise do cloridrato de gencitabina puro (Figura 14 b) apresentou um espectro com bandas características ao fármaco das quais destacam-se: uma em 3400 cm^{-1} atribuída a vibrações de estiramento das ligações -N-H das aminas; outra em 2948 cm^{-1} referente a alcenos ou -C-H alifáticos; em 1535 cm^{-1} atribuída às ligações -C=O em anéis aromáticos e, em 718 cm^{-1} uma banda referente a ligações -C-H também em anéis aromáticos (NAIR et al., 2019; DUTTA et al., 2020). Observou-se ainda bandas em 1705 cm^{-1} relacionada à deformação axial de C=O ; em 1150 cm^{-1} de vibrações de deformação angular de O-H e em 1000 cm^{-1} referente às vibrações de C-N (CHANDIRA et al., 2010).

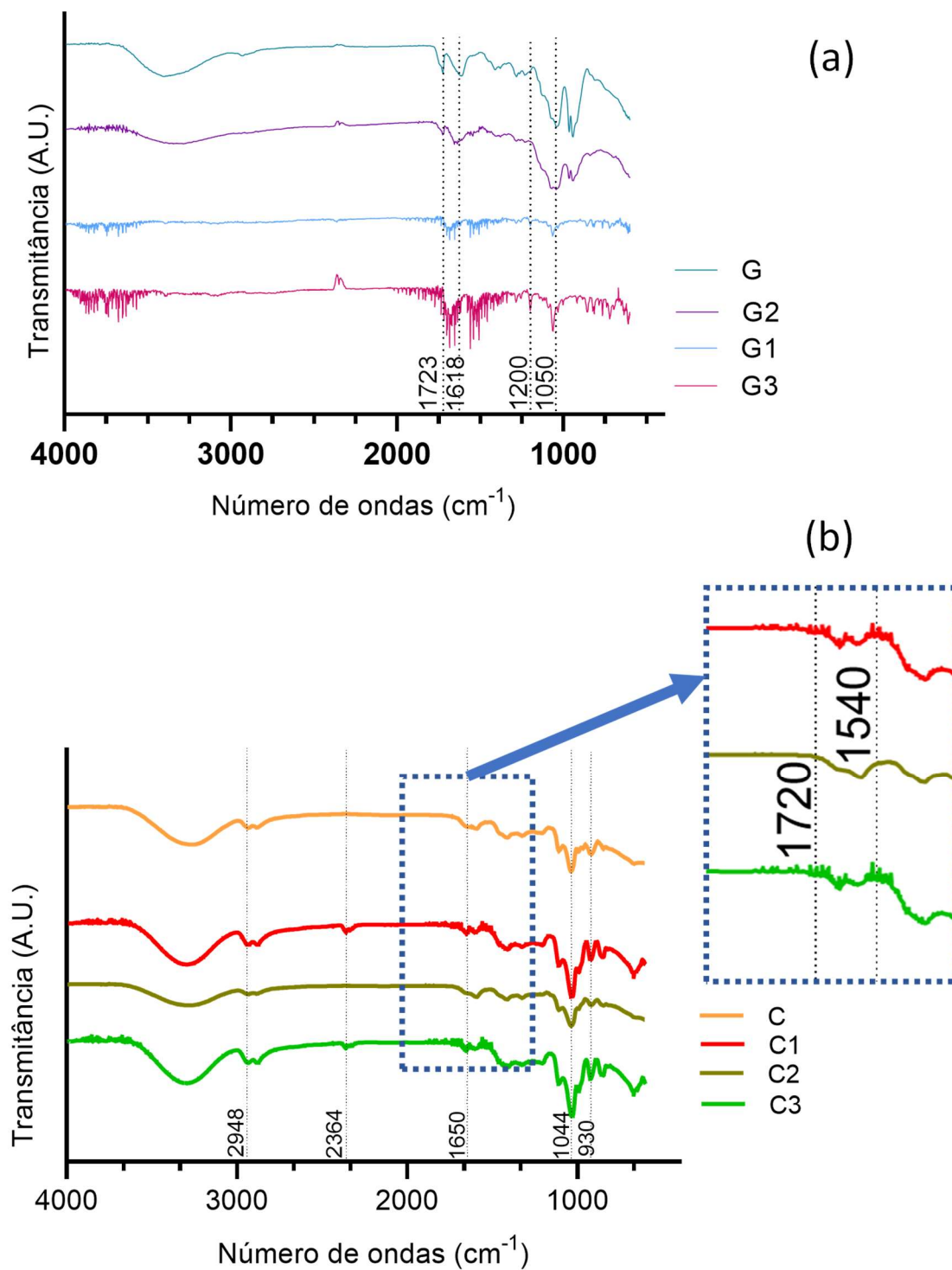
Figura 14 - Espectro de FTIR obtido a partir da papaína e da gencitabina



Na Figura 15 estão apresentados os espectros de FTIR dos géis contendo 0,2% (m/v) de papaína. Para a formulação G2 (Figura 15 a) observou-se que houve supressão da banda em 1050 cm^{-1} (estiramento de ligações C-O) e intensificação das bandas em 1200 e 755 cm^{-1} . Para a formulação C2 (Figura 15 b) não foram

observadas alterações nos espectros quando comparados aos do gel puro, sugerindo que não houve interação química entre o polímero e a proteína.

Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos das formulações contendo papaína e gemcitabina (a) G1, G2, G3 e (b) C1, C2 e C3



A interação entre as matrizes utilizadas e o cloridrato de gemcitabina poderia ocorrer por meio dos radicais carboxílicos presentes nos polímeros e o grupo amino do quimioterápico, dando origem à uretanas. As bandas relacionadas a este tipo de interação costumam aparecer entre 1700 e 1730 cm^{-1} referente às ligações de estiramento de C=O da uretana. As vibrações referentes ao estiramento de NH de uretanas secundárias costumam aparecer em cerca de 1540 cm^{-1} (BAHADUR et al., 2016; SMITH, 2020). Nos espectros dos géis de gelana na presença do fármaco (Figura 15 a), houve o aparecimento de uma banda em 1200 cm^{-1} que pode estar relacionada ao estiramento de C-O de uma uretana. Entretanto não foram observados as outras bandas relacionadas à esta função, sugerindo que à banda mencionada esteja apenas relacionada à presença da gemcitabina. Nos espectros das formulações de CMC com PVA, contendo fármaco (Figura 15 b) observou-se a presença de ruídos nessa região, mas não a formação de novas bandas. O não aparecimento da uretana nos resultados obtidos, indica, portanto, uma baixa taxa ou ausência de interações matriz e ativo, que podem estar relacionados à solubilização incompleta do fármaco.

5.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos polímeros e das formulações

As análises térmicas das formulações também permitem avaliar possíveis interações entre as matrizes poliméricas, a enzima e o fármaco por meio da observação de alterações nas transições de primeira e segunda ordem. Os resultados obtidos para a amostra de papaína nativa (Figura 16 a) apresentaram um pico endotérmico em 152,1 °C. Este evento está relacionado ao processo de desnaturação da enzima, em que há quebras de ligações N-H e de oxigênios de grupos carboxílicos adjacentes, provocando alterações na estrutura terciária da molécula e o comprometimento da α -hélice (VASCONCELOS et al., 2020).

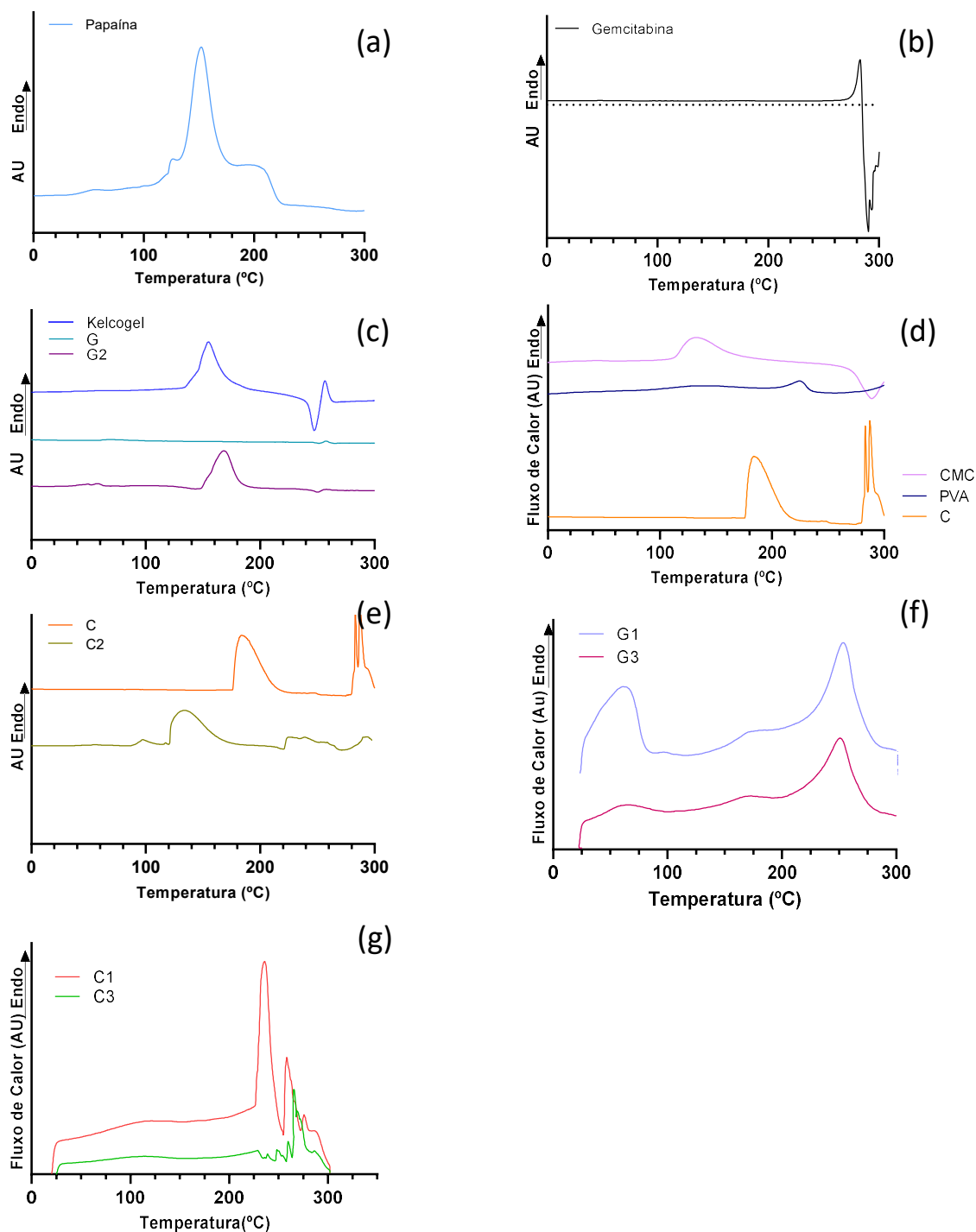
A análise calorimétrica do cloridrato de gencitabina (Figura 16 b) apresentou um pico endotérmico aos 282,8 °C relacionado à fusão do fármaco de caráter cristalino (NAIR et al., 2019). Em seguida um pico exotérmico se formou, provavelmente relacionado já a degradação do material.

Na amostra de Kelcogel® (Figura 16 c), polímero utilizado para o preparo dos géis de goma gelana, observou-se um pico endotérmico aos 154 °C e outro exotérmico aos 247,4 °C. O primeiro evento é relacionado ao processo de fusão da porção cristalina do polímero e o segundo, relacionado ao início do processo de degradação (HALIM et al., 2012). A amostra de gel de gelana liofilizado (G) apresentou picos semelhantes (endotérmico a 172 °C e exotérmico a 242 °C), entretanto com menor entalpia devido à baixa concentração. A amostra contendo papaína nativa (G2) apresentou um pico endotérmico em temperatura próxima da fusão da proteína.

A blenda de CMC com PVA (formulação C, representada na Figura 16 d) apresentou um pico endotérmico em 183,9 °C referente à fusão da porção cristalina do PVA (ZHU et al., 2020) e um pouco inferior à temperatura de fusão do PVA isolado (224,5 °C). A presença da papaína (formulação C2, Figura 12 e) na blenda mudou a temperatura do processo de fusão para 133,9 °C. Provavelmente devido à recristalização PVA no processo de preparo da blenda, que não foi total, diminuindo a temperatura de fusão.

Por fim, foram analisados os comportamentos térmicos das formulações na presença do fármaco gencitabina (Figura 16 f-g). Para as formulações de gelana foram identificados picos endotérmicos a 61,11 °C, 132,4°C e a 253,39 °C para a formulação G1; e a 64 °C, 172,9 e 250,9 °C para a formulação G3. Os eventos próximos dos 60 °C estão relacionados a evaporação de solvente remanescente, seguidos por pela fusão polimérica e início da desnaturação da papaína (para a formulação G3). Já os picos endotérmicos por volta dos 250 °C indicam a fusão do cloridrato de gencitabina.

Figura 16. DSC obtido das amostras de (a) papaína isolada; (b) gencitabina isolada; (c) kelcogel® isolado, formulação G e formulação G2; (d) CMC isolado, PVA isolado e formulação C; (e) formulações C e C2; (f) formulações G1 e G3; (g) formulações C1 e C3



Nas análises das formulações de CMC com PVA com gencitabina, a evaporação de água foi observada em picos a 121,05 °C (formulação C1) e 113,59 °C (formulação C3). Picos intensos a 235,89 °C (formulação C1) e a

265,46 °C (formulação C2) relacionados à fusão da gemcitabina foram identificados. O não aparecimento das bandas relacionadas ao processo de fusão dos polímeros, por volta dos 180 °C (conforme na formulação C) pode ser interpretado como um indicativo de que houve algum grau de interação entre a matriz polimérica e o fármaco.

Tabela 5 - Picos endotérmicos do DSC das amostras liofilizadas e controles

Amostra	Pico (°C)	Onset (°C)	Endset (°C)	Entalpia (ΔH) J.g ⁻¹
Papaína Nativa	152,1	135,2	167,1	477,2
Gemcitabina	282,8	269,8	284,7	42,77
Kelcogel	154,7	142,5	168,9	837
G	172,0	162,4	172,7	12,03
G1	61,11	23,7	88,95	104,84
	132,4	132,5	194,4	4,96
	253,39	194,49	296,39	106,43
G2	168,3	149,5	182,1	620,8
G3	64,53	34,58	90,42	12,75
	172,95	146,34	193,49	4,63
	250,93	199,40	269,48	76,59
CMC	132,4	112,5	163,5	839,2
PVA	224,5	214,4	234	166,1
C	183,9	176,1	215,4	1322
C1	121,05	102,61	133,79	1,7
	235,89	223,98171,67	2253,16	143
	258,23	254,99235	271,68	46,94
C2	133,9	121,1	164,6	1107
C3	113,59	74,19	140,79	21,24
	265,46	257,21	281,43	107

5.7 Determinação da Gelificação da Goma Gelana

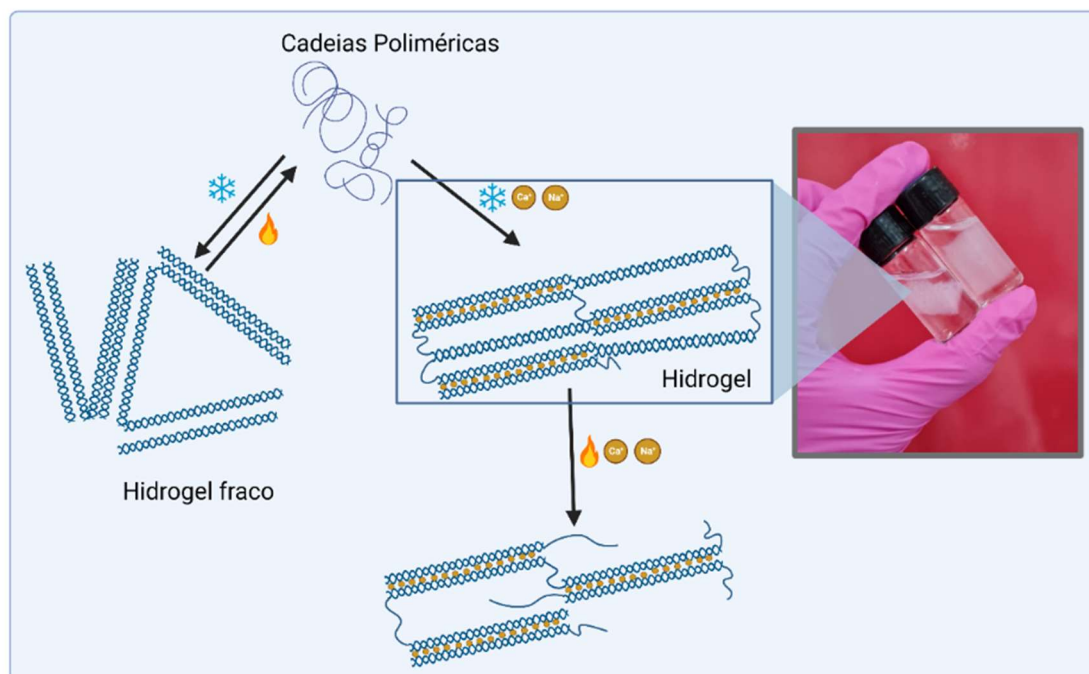
O hidrogel de goma gelana, quando na presença de urina, reticula, conforme é possível observar na Figura 17 a (YAMAMOTO; CUNHA, 2007; PICONE; DA CUNHA, 2010; ZIA et al., 2018). A gelificação da gelana pode ser induzida pela presença de íons, temperatura e pH. Quando em solução aquosa e em

temperaturas altas (acima de 50 °C), as cadeias poliméricas se encontram desordenadas em hélices únicas, enquanto o processo de resfriamento da solução induz a formação três duplas hélices para a esquerda, estabilizadas por pontes de hidrogênio. A depender da força iônica presente na solução, as duplas hélices podem se associar e formar uma rede 3-D interconectada. Esse processo é provocado pela presença de cátions monovalentes e bivalentes e também sofre influência de fatores como concentração do polímero e pH da solução (Figura 17b) (YAMAMOTO; CUNHA, 2007; PICONE; DA CUNHA, 2010; ZIA et al., 2018).

Figura 17. Reticulação da goma gelana (a) imagem do gel gelificado e (b) representação dos fenômenos envolvidos neste processo.



(a)



(b)

Fonte: criada com biorender.com adaptado de (FERRIS et al., 2013)

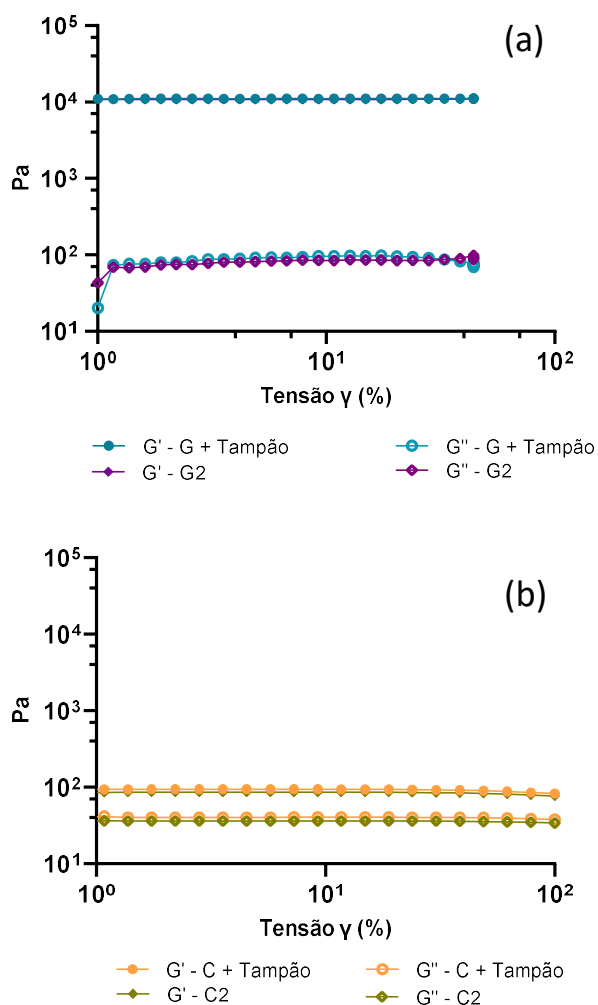
O pKa da gelana está em torno de 3,5 devido ao monômero de ácido glucurônico que forma sua estrutura molecular. Desta forma, em soluções com pH mais altos que seu pKa, a gelana fica negativamente carregada, formando um poliânion e gerando repulsão eletrostática entre suas moléculas (densidade de 0,25 cargas negativas/mol de monossacarídeos em forma de ácido carboxílicos). Em temperaturas menores quando há presença das hélices duplas e pontes de hidrogênios, meios mais ácidos também induzem a formação de redes macroscópicas de géis (YAMAMOTO; CUNHA, 2007; PICONE; DA CUNHA, 2010; ZIA et al., 2018).

5.8 Comportamento reológico das formulações

O estudo da reologia das formulações foi de grande importância para a compreensão do comportamento dos géis e suas propriedades viscoelásticas. Para tanto, os ensaios realizados se basearam na avaliação da resposta viscoelástica dos fluidos mediante uma excitação externa conhecida. Os parâmetros viscoelásticos analisados são o módulo de armazenamento/elástico (G') e o módulo de deformação/viscoso (G''). O primeiro está associado ao caráter elástico do material, isto é, com a energia armazenada durante a deformação, que seria a “resistência” à deformação. Por outro lado, o G'' está relacionado ao comportamento viscoso do fluido e, portanto, à dissipação de energia durante o escoamento (DAL et al., 2017).

Primeiramente, foram realizados os ensaios de *Amplitude Sweep* (Figura 18) para identificação da faixa de tensão em que o comportamento viscoelástico das amostras se mostrava linear e que, portanto, a estrutura dos géis estava estável e que G' permanecia constante. Observou-se que para as formulações de CMC com PVA, os módulos elástico e viscoso apresentaram valores menores na presença da papaína ($p < 0,05$). Essa etapa de entender a resposta viscoelástica-linear dos fluidos é importante para melhor compreensão dos efeitos da estrutura molecular do material analisado, bem como do seu comportamento durante o escoamento (BIRD, R. B.; ARMSTRONG, R. C.; HASSAGER, 1987). Após a região linear, normalmente, observa-se uma região não-linear devido ao colapso parcial da rede tridimensional do gel, seguido pela intersecção de G' e G'' e então a predominância de um comportamento característico de líquidos (OSMAŁEK et al., 2018).

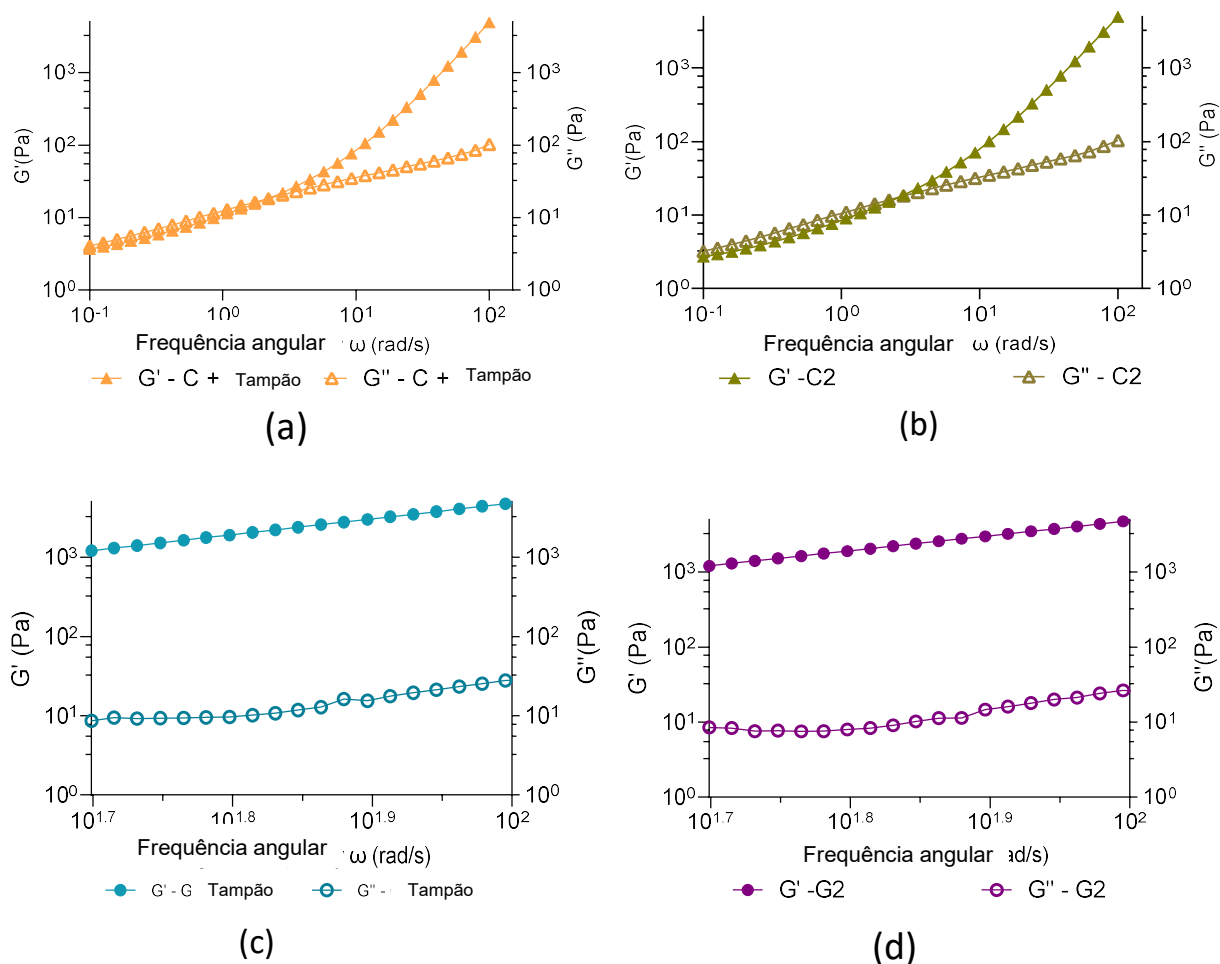
Figura 18- Amplitude Sweep, realizado a 37 °C, das formulações preparadas a partir da (a) goma gelana e (b) CMC com PVA.



No ensaio de *frequency sweep* (Figura 19), as formulações preparadas a partir da blenda de CMC com PVA apresentaram módulo viscoso (G'') maior que o elástico (G'), seguido pela inversão dos mesmos e subida acentuada de G' , sugerindo rearranjo molecular e o comportamento de gel a partir deste momento. Por outro lado, as formulações de base de gelana não apresentaram *crossover* e os módulos elásticos (G') permaneceram superiores aos viscosos (G'') durante toda a faixa de frequência do ensaio, mesmo na presença da papaína. Isto é, a adição da enzima não pareceu afetar as propriedades reológicas do material. Esse comportamento mostra estabilidade das formulações em relação ao comportamento de gel e se deu, provavelmente, devido à temperatura em que foi executado o ensaio (37 °C), visto que a gelana tende a se comportar como um gel

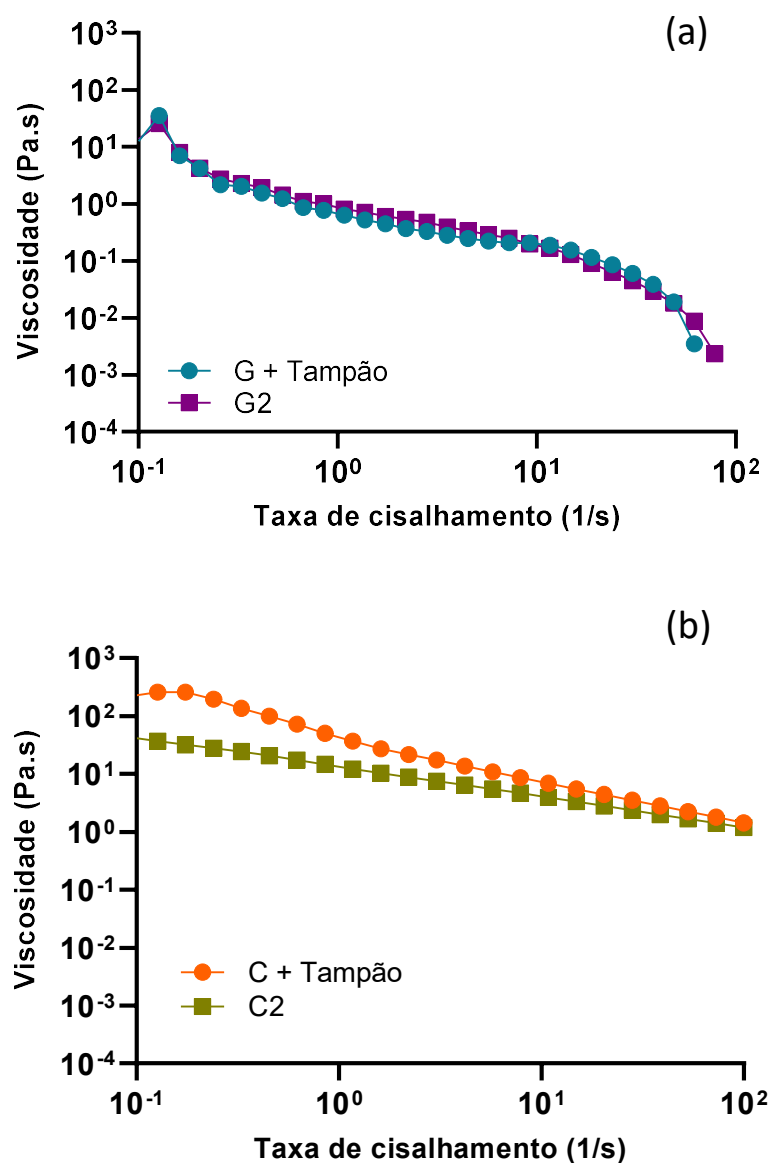
fraco nessa condição. Tal tipo de comportamento faz com que essas formulações sejam mais estáveis em taxas de cisalhamento reduzidas (MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015).

Figura 19 - Frequency Sweep das formulações realizado 37°C



Os fluidos viscoelásticos são uma classe de fluidos não-newtonianos formados por partículas flexíveis e capazes de formar ligações temporárias entre si ou estruturas internas reticuladas de maior complexidade, na forma de emulsão ou gel. Seu comportamento reológico se encontra entre os sólidos Hookeanos e os fluidos viscosos justamente porque quando uma energia é aplicada, parte dela é armazenada (como nos sólidos elásticos) e outra é dissipada (como nos fluidos viscosos). Praticamente todas as soluções poliméricas, ainda que em baixas concentrações, apresentam esse comportamento viscoelástico (BEZERRA, 2000; MATRICARDI et al., 2009; MOSER, 2012).

Figura 20. Viscosidade complexa em função da taxa de cisalhamento para as formulações de (a) G e G2; e (b) C e C2.



Análises avaliando a viscosidade em relação à taxa de cisalhamento também foram realizadas. A viscosidade complexa está relacionada às diferenças de viscosidade apresentadas no estado estacionário e quando sob oscilações. Essa ideia pode ser aplicada a materiais poliméricos que quando submetidos a altas taxas de cisalhamento acabam por fraturar ou fluir (OSMAŁEK et al., 2018). Nos ensaios realizados neste estudo, formulações apresentaram comportamentos semelhantes, com diminuição da viscosidade complexa mediante ao aumento da taxa de cisalhamento (Figura 20). Tal comportamento é característico de materiais não-newtonianos pseudoplásticos (*shear thinning*) e tem sido relatado na literatura

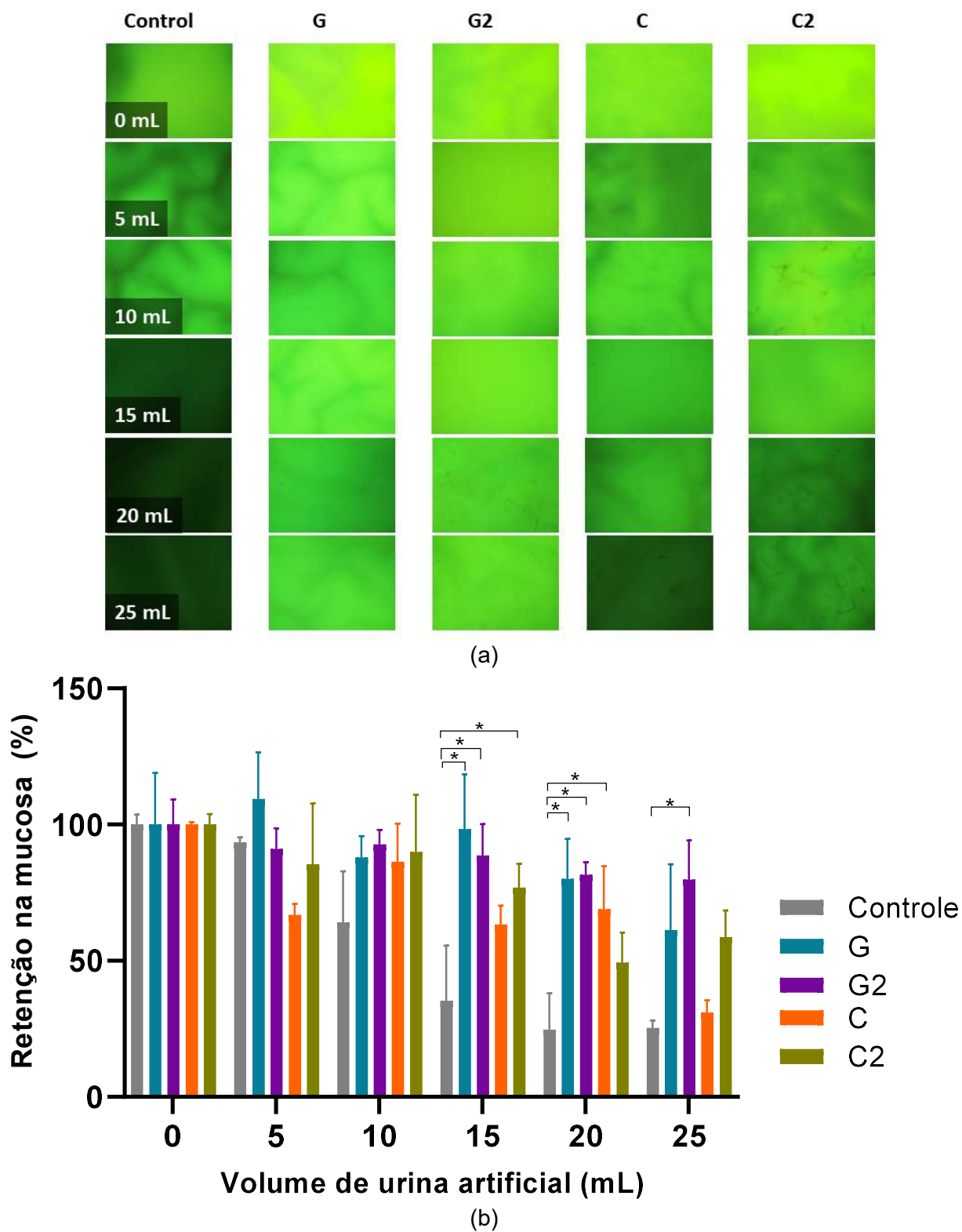
como característico de géis de polissacarídeos como a gelana e a CMC (KOLAWOLE; LAU; KHUTORYANSKIY, 2019; KUNDU; BANERJEE, 2019; KATOCH; CHOUDHURY, 2020; DONG et al., 2021). Esse comportamento evidencia a adequação das formulações para aplicação via instilação por seringa. Outro ponto observado em relação às amostras de CMC e PVA foi que a viscosidade inicial das amostras contendo papaína foi menor do que a da amostra controle com tampão, indicando que parte das cadeias poliméricas foi comprometida pela ação amilolítica da papaína (SHOUKET et al., 2020).

5.9 Estudo da mucoadesividade: ensaio de retenção dos géis

Neste ensaio foi possível avaliar a capacidade de retenção das formulações no urotélio, mediante sucessivas lavagens com urina artificial. Os fragmentos de bexiga suína foram visualizados em microscópio de fluorescência sob excitação de luz verde e os resultados estão apresentados na Figura 21. Foi possível observar que todos os géis tiveram maior capacidade de bioadesão que o controle, especialmente após a terceira lavagem. Os géis de gelana apresentaram melhor mucoadesão em comparação aos de CMC e PVA, com maior emissão de fluorescência e aparente uniformidade mesmo após a quinta lavagem. A elasticidade e viscosidade da gelana acilada permite interações físicas entre as cadeias do gel e de mucina. Um estudo realizado sobre o preparo de géis fluidos para aplicação nasal na entrega de medicamentos, mostrou que a gelana acilada foi capaz de prolongar por maior tempo a liberação do fármaco em comparação com a gelana desacilada, indicando, de forma indireta, maior mucoadesão da primeira (MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015). A utilização da urina artificial, com pH 6,2 e, portanto, maior que o pKa da goma gelana (3,5) e da mucina (2,6), provavelmente causou ionização de ambos. Desta forma, as cargas negativas podem haver causado repulsão eletrostática entre elas seguida pela expansão da rede polimérica. Essa expansão facilitaria a interpenetração nas cadeias de glicoproteínas e, conseqüentemente, interações supramoleculares (CARDOSO; GREMIÃO; CURY, 2020; CARDOSO et al., 2021).

A presença da papaína também apresentou certa influência na adesão das formulações. A partir da terceira lavagem, observou-se significância estatística das formulações G2 em relação ao controle. A papaína pode ter auxiliado na permeação das formulações, dificultando a dissolução delas na urina.

Figura 21. (a) Imagens obtidas em microscópio de fluorescência dos fragmentos iluminados com comprimento de onda verde e (b) retenção na mucosa por intensidade de fluorescência. * indica significância estatística ($p < 0.05$).



5.10 Interação polímero e mucina: avaliação reológica

As soluções de mucina apresentaram comportamento pseudoplástico devido à sua natureza polimérica. Suas macromoléculas podem interagir por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e de sulfeto entre os resíduos de cisteína. Com o aumento da taxa de cisalhamento, as pontes de hidrogênio presentes nas glicoproteínas que compõem a mucina são quebradas, comprometendo sua integridade. Ao mesmo tempo, o rompimento do emaranhado entre as cadeias se torna maior que a formação de novas interações, resultando na redução da viscosidade (ESHEL-GREEN; BIANCO-PELED, 2016).

As interações entre as cadeias poliméricas das matrizes e a mucina podem ser detectadas pelo aumento da viscosidade do sistema devido ao sinergismo entre elas. Portanto, é possível calcular a força de mucoadesão transformando a energia de interação, resultante do rearranjo de macromoléculas (BASSI DA SILVA et al., 2017). Após agitação rigorosa por 2 horas, todas as formulações combinadas com mucina apresentaram uma viscosidade maior que os hidrogéis na mesma concentração, sem mucina (Figura 22). Esse aumento de viscosidade foi observado especialmente para as matrizes compostas de CMC com PVA.

O método de Hassan e Gallo é baseado na teoria de que a viscosidade da mucina pode aumentar na presença de substâncias como ureia, albumina ou polilisina devido à energia de pontes físicas e químicas criadas nas interações entre polímero e mucina, que podem ser transformadas em energia mecânica ou trabalho. Esse trabalho interfere na forma ou rearranjo das macromoléculas causando alterações de viscosidade. Portanto, é possível analisar o coeficiente de viscosidade de uma dispersão contendo macromoléculas bioadesivas e mucina usando a equação 2 e a força de bioadesão pela equação 3 (HASSAN; GALLO, 1990; TAYEL et al., 2013).

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \eta_b \quad (2)$$

Em que: η_t = coeficiente de viscosidade do sistema

η_m = coeficiente de viscosidade individual da mucina

η_p = coeficiente de viscosidade individual do polímero mucoadesivo

η_b = componente de viscosidade devido à bioadesão

$$F_b = \eta_b \times \dot{\gamma} \quad (3)$$

Em que: F_b = Força de bioadesão

η_b = componente de viscosidade devido à bioadesão

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento em que o valor da viscosidade foi calculado

O componente de viscosidade devido à bioadesão (η_b) encontrado para cada formulação está descrito na Tabela 6. O η_b calculado para a mistura de gelana (G) com mucina foi baixo, mas positivo, confirmando o efeito sinérgico entre os dois componentes da mescla. A literatura demonstra que a gelana com alto teor de grupos acilas é capaz de promover interações físicas com a mucina, resultado em propriedades interessantes de mucoadesão (MAHDI; CONWAY; SMITH, 2015). Tayel e coautores desenvolveram nanoemulsões em gel a partir de goma gelana para aplicações oftalmológicas e realizaram ensaios reológicos para avaliar as propriedades mucoadesivas do material. A partir dos resultados obtidos, observou-se um efeito sinérgico entre o polímero e a mucina, sugerindo a formação de emaranhamentos moleculares e ligações secundárias entre a gelana e as glicoproteínas (TAYEL et al., 2013). Entretanto, para as formulações de gelana com papaína (G2), uma sinergia negativa foi observada com a queda da viscosidade. Isso se deveu à atividade mucolítica da enzima que possivelmente consumiu parte das cadeias de glicoproteínas presentes na mucina.

Tabela 6. Componente de viscosidade devido à bioadesão para cada formulação

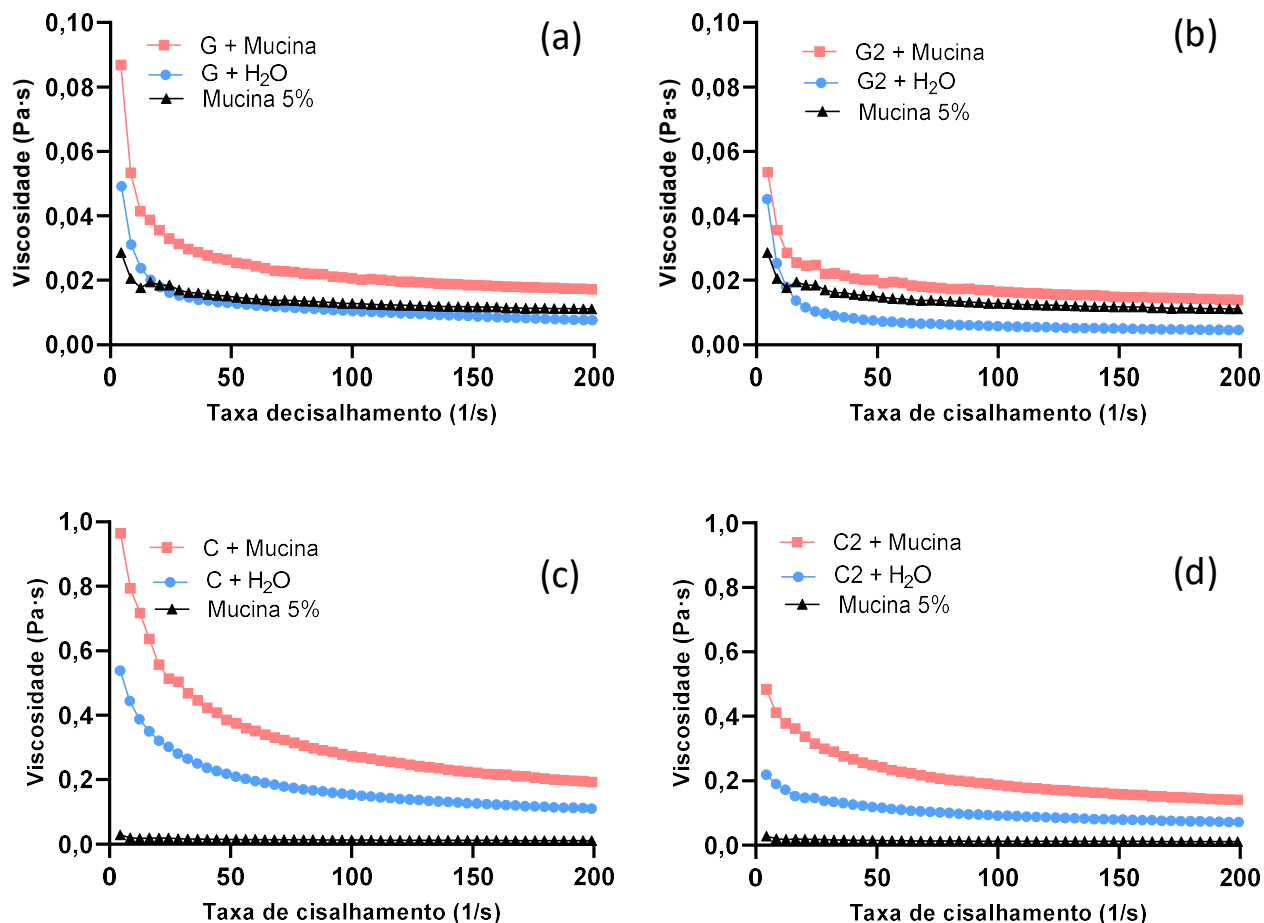
Formulações	η_t (Pa.s)	η_m (Pa.s)	η_p (Pa.s)	η_b (Pa.s)	F_b (Pa)
G + Mucina	0,08686 ($\dot{\gamma}=4,4$)	0,02859 ($\dot{\gamma}=4,5$)	0,04922 ($\dot{\gamma}=4,6$)	0,000905 ($\dot{\gamma}_M=4,5$)	0,0040725
G2 +Mucina	0,05356 ($\dot{\gamma}=4,6$)	0,02859 ($\dot{\gamma}=4,5$)	0,04519 ($\dot{\gamma}=4,4$)	-0,02022 ($\dot{\gamma}_M=4,5$)	-0,09099
C + mucina	0,9649 ($\dot{\gamma}=4,6$)	0,02859 ($\dot{\gamma}=4,5$)	0,5386 ($\dot{\gamma}=4,4$)	0,39771 ($\dot{\gamma}_M=4,5$)	1,789695
C2 + mucina	0,4834 ($\dot{\gamma}=4,4$)	0,02859 ($\dot{\gamma}=4,5$)	0,21890 ($\dot{\gamma}=4,4$)	0,23591 ($\dot{\gamma}_M=4,4$)	1,038004

$\dot{\gamma}_M$ = taxa de cisalhamento média

Com relação às formulações preparadas a partir da blenda de CMC com PVA, o componente de bioadesão foi positivo para todas as amostras, incluindo aquelas que continham papaína. Entretanto, o gel sem enzima (formulação C) apresentou um η_b quase duas vezes maior que os encontrados para a formulação com papaína (formulação C2). Os valores positivos se deram, certamente, devido

às interações e, conseqüente bioadesão entre os géis e a mucina. Ademais, os géis de CMC com PVA, apresentaram viscosidades mais altas quando comparadas com as formulações de gelatina devido à concentração de CMC. Provavelmente, em consequência da maior viscosidade dos géis, a presença da papaína não acarretou componentes de adesão negativos como observado nas amostras de gelatina, entretanto, a diminuição significativa de η_b sugere que a papaína também consumiu a mucina presente no meio. Ivarsson e coautores também descreveram o aumento da viscosidade de géis de CMC mesclados com mucina devido à adesão, corroborando com os resultados aqui apresentados (IVARSSON; WAHLGREN, 2012). Portanto, a partir deste ensaio, foi possível confirmar a propriedade mucoadesiva dos géis propostos e a atividade mucolítica da papaína, o que será importante para auxiliar na penetração do fármaco.

Figura 22. Resultados de reologia para análise de interação entre os polímeros e mucina das amostras (a) G; (b) G2; (c) C; e (d) C2.

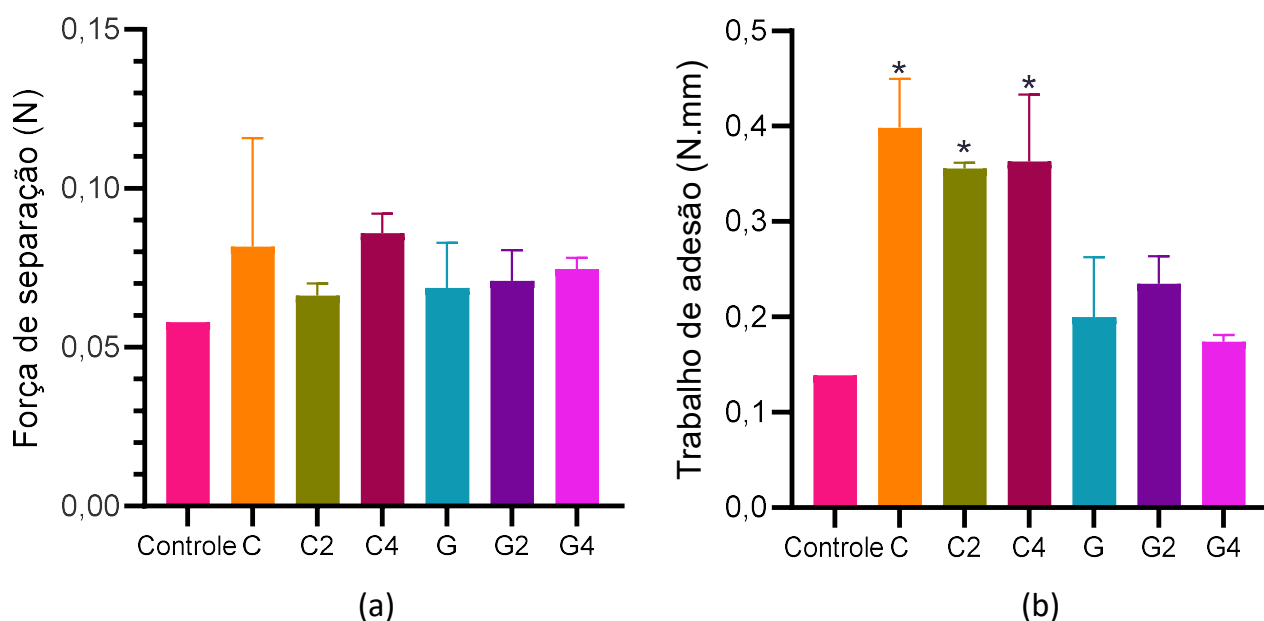


5.11 Ensaio de Força de Bioadesão

O ensaio de força de adesão foi realizado nas formulações sem a presença do fármaco. A força máxima de descolamento é a força necessária para quebrar as pontes adesivas formadas entre as formulações e a mucina presente no tecido da bexiga. Além disso, a área do gráfico força por distância fornece o trabalho de adesão (KOLAWOLE; LAU; KHUTORYANSKIY, 2019). Em relação à força de descolamento, na presença das formulações a força necessária foi maior que a utilizada na separação dos controles (Figura 23). As formulações com base de CMC com PVA solicitaram maior força de descolamento que aquelas preparadas a partir de goma gelana, entretanto, nenhuma delas apresentou significância estatística em relação ao controle ($p > 0,05$). Por outro lado, em termos de trabalho de adesão, as formulações de CMC com PVA apresentaram valores superiores ao controle, com significância estatística ($p < 0,05$), confirmando que houve interações de bioadesão entre a mucosa urotelial e a matriz polimérica. O trabalho de adesão é considerado como melhor avaliação quantitativa das propriedades de mucoadesão do que a força máxima aplicada (PEPPAS; SAHLIN, 1996). Da perspectiva da mecânica, a força adesiva é expressa por “trabalho de adesão” (w), ou seja, a força externa necessária para separar uma unidade de área das superfícies aderidas (JOHNSON, 1998). As formulações de goma gelana também demandaram maior trabalho para o descolamento em relação ao controle, entretanto, não foi observada significância estatística.

Estes resultados corroboram com os resultados encontrados no ensaio de interação entre polímeros e mucina, uma vez que as formulações de CMC com PVA apresentaram maior componente de bioadesão que as formulações de goma gelana. Entretanto, vão de encontro com os resultados do ensaio de retenção dos geis, em que a gelana apresentou melhor retenção nas bexigas suínas.

Figura 23. Força de descolamento (a) e trabalho de adesão (b) das formulações propostas.



5.10 Estudo da estabilidade das formulações

5.10.1 Estabilidade Preliminar

Todas as amostras de gelana e CMC com PVA foram aprovadas no teste de centrifugação. As amostras preparadas a partir do polímero gelana apresentaram um aspecto homogêneo e transparente, como coloração esbranquiçada. A formulação controle foi classificada como inodora e aquelas que continham papaína, apresentaram odor característico da proteína. Entre as amostras controle, 62% delas pareceram “separar fases” ou reticular fisicamente (Figura 24). O mesmo fenômeno foi observado em 61,11% das amostras contendo papaína. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à desestabilização das formulações ou devido a um processo de reticulação física desencadeado pela presença de cátions somada às alternâncias de temperatura, visto que o gel foi preparado em solução salina. Para verificação, o ensaio foi sendo repetido com o polímero dissolvido em água e em solução de CaCl_2 (0,1%). As amostras solubilizadas em água não apresentaram reticulação física em nenhum momento do ensaio, mas 94,4% das amostras diluídas em solução de CaCl_2 reticularam, confirmando que o processo tem influência da presença dos íons, mas também sofre influência da temperatura, visto que as amostras “padrão” mantidas em geladeiras não apresentaram alterações. Conforme discutido em seção anterior, quando submetidas a

temperaturas baixas, as moléculas de gelana tendem a formar três duplas hélices, estabilizadas por pontes de hidrogênio que, na presença de forças iônicas na solução, se associam formando uma rede 3D interconectada (YAMAMOTO; CUNHA, 2007; PICONE; DA CUNHA, 2010). Em termos de pH, observou-se que os controles apresentaram queda, variando em torno de 6, enquanto as formulações com papaína apresentaram valores mais estáveis em torno de 7, devido à presença do tampão em que a proteína foi preparada Figura 25.

Figura 24. Gel de gelana reticulado

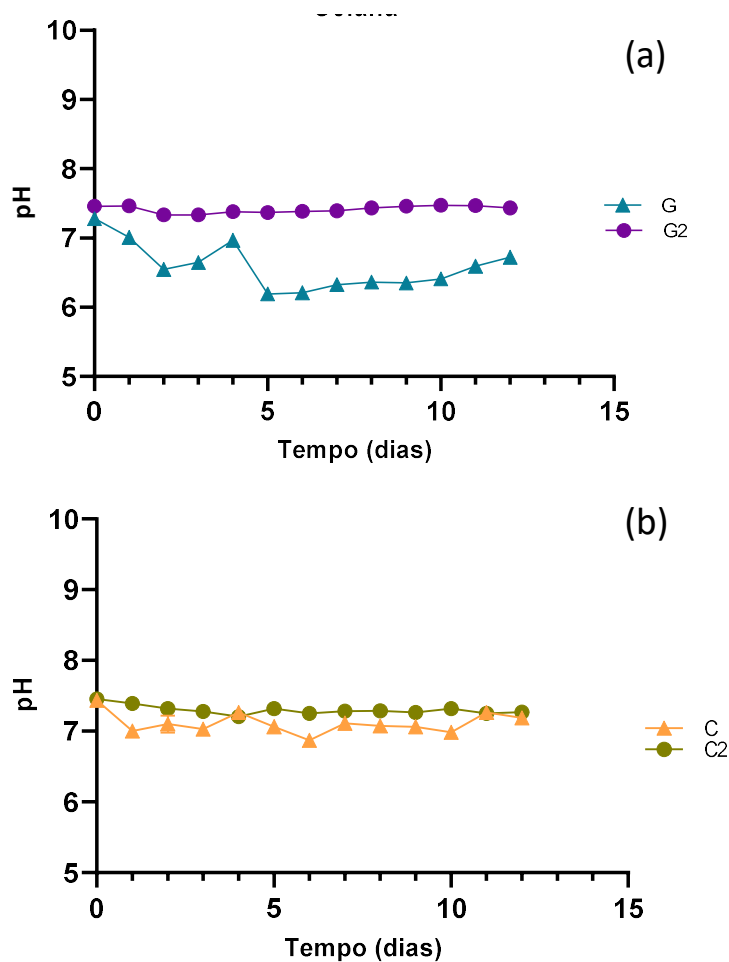


Todas as amostras de CMC com PVA permaneceram estáveis durante todo o ensaio. No tempo zero, os géis apresentaram aspecto homogêneo, viscoso, transparente e incolor. A formulação controle foi classificada como inodora e as que continham papaína apresentaram odor característico da enzima. Até o período final de 15 dias, todas as amostras foram classificadas como “normais, sem alterações” para as propriedades organolépticas (Tabela 7). O pH também permaneceu na faixa neutra, sem apresentar alterações representativas.

Tabela 7. Propriedades Organolépticas – Tempo Zero

Formulação	Aspecto	Cor	Odor
G	Homogêneo, transparente	Esbranquiçado	Inodoro
G2	Homogêneo, transparente	Esbranquiçado	Odor de papaína
C	Homogêneo, viscoso, transparente.	Incolor	Inodoro
C2	Homogêneo, viscoso, transparente.	Incolor	Odor de papaína

Figura 25. pHs aferidos no ensaio de estabilidade preliminar



5.10.2 Estabilidade Acelerada

As formulações apresentaram no tempo zero aspecto homogêneo. O pH das formulações foi medido e observou-se que a presença do cloridrato de gencitabina abaixou o pH para uma faixa entre 3 e 4. Em torno do pH 2, a papaína começa a perder a estrutura terciária e inicia-se o processo de desnaturação. Um estudo relacionado à estabilidade da papaína em relação a alterações de pH e temperatura desenvolvido por Milošević et al. mostrou que em um pH de 3, a papaína apresenta uma atividade residual de 75% (MILOŠEVIĆ et al., 2019). O pH da urina varia de 4,8 a 8, dependendo da dieta e das medicações. (KOLAWOLE et al., 2017).

Durante o período de 90 dias, o pH das formulações não sofreu grandes mudanças e permaneceu relativamente estável (Figura 26). Entretanto, todas as formulações compostas pela matriz de goma gelana apresentaram, aos 90 dias, um precipitado branco e um sobrenadante completamente transparente, indicando desestabilização dos géis. As formulações de CMC com PVA não apresentaram alterações em relação ao aspecto visual, porém, as formulações contendo papaína apresentaram uma queda da viscosidade devido à ação amilolítica da papaína.

Quando adicionada às matrizes poliméricas, houve uma perda mínima de atividade (Figura 27). Todas as formulações com base de goma gelana apresentaram pelo menos 90% de atividade em relação à papaína nativa. Por outro lado, as formulações de CMC com PVA apresentaram $81,37 \pm 7,3\%$ (C3) e $85,11 \pm 9,5\%$ (C2), na presença e na ausência da gencitabina, respectivamente, quando comparadas à atividade da enzima nativa isolada. Embora a perda de atividade tenha sido maior para essas formulações, não comprometeria a ação da formulação.

Figura 26. Variação de pH das formulações com base de (a) goma gelana e de (b) CMC com PVA

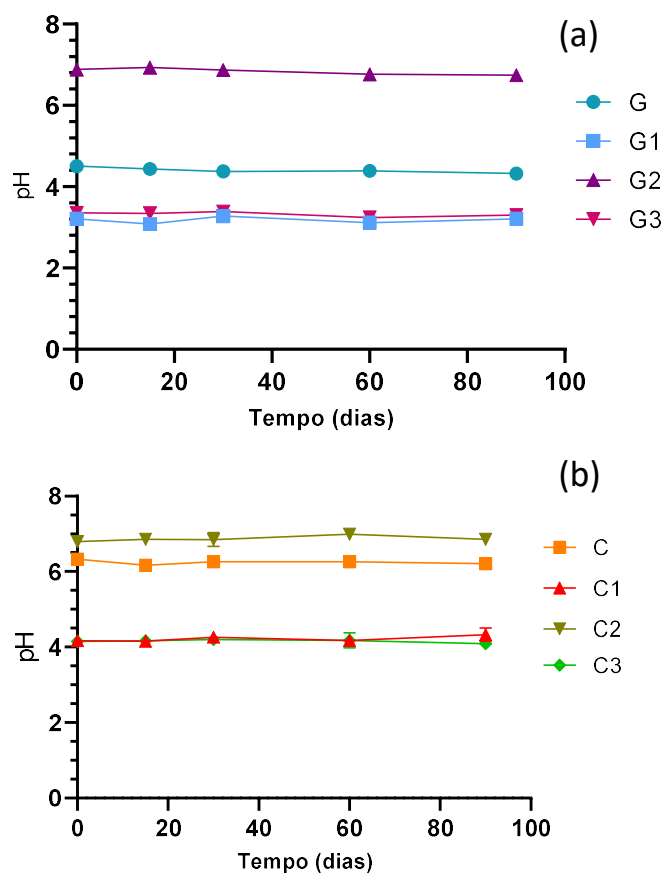
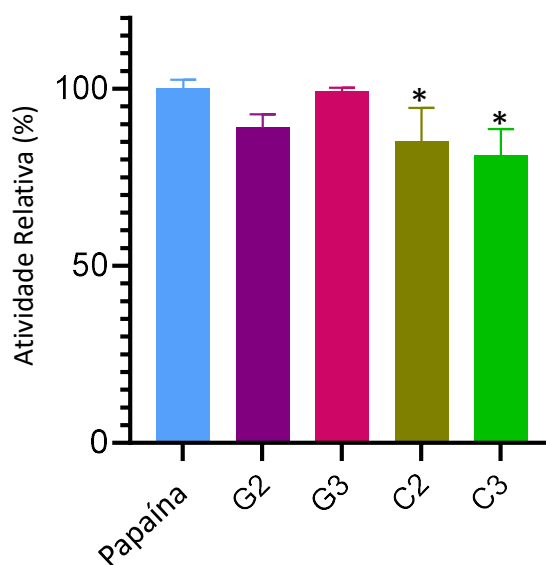


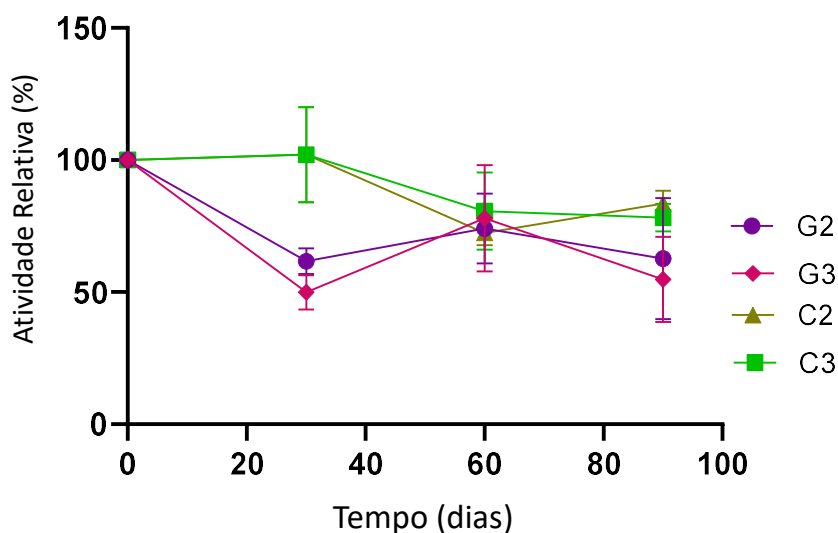
Figura 27. Atividade enzimática relativa das formulações contendo papaína no início do ensaio de estabilidade (tempo zero).



A atividade das formulações também foi avaliada durante o período de 90 dias, considerando o tempo zero como 100% de atividade para cada formulação (Figura 28). A queda da atividade era esperada, pois a papaína faz autólise e consome a si mesma, entretanto a viscosidade dos meios em que a enzima estava inserida poderia diminuir a taxa de perda de atividade ao dificultar a mobilidade das moléculas. Após 90 dias, as formulações de CMC com PVA com papaína nativa (formulação C2) apresentaram $83,5 \pm 4,9\%$ de atividade residual. Sheng e colaboradores demonstraram que após 28 dias de armazenamento, a 4°C , a papaína nativa tende a perder 50% da sua atividade inicial enquanto que, a papaína imobilizada em nanopartículas magnéticas preparadas pelo grupo, perdeu apenas 15%, no mesmo período (SHENG et al., 2018). Neste estudo, a perda de atividade em 90 dias para ambas as formulações foi equivalente à perda previamente observada para a enzima imobilizada em 28 dias. A presença da gencitabina e a consequente queda do pH impactou na atividade a longo prazo, uma vez que as atividades residuais baixaram para $78,16 \pm 5,28\%$ (G3-papaína nativa com gencitabina).

As formulações com base de goma gelana não foram capazes de manter a atividade residual tão alta, mas ainda assim apresentaram alguma vantagem. As amostras com papaína nativa (G2) apresentaram atividade de $62,72 \pm 22,8\%$ após 90 dias. A presença da gencitabina também causou impacto, baixando este valor para $54,82 \pm 16,08\%$ (G3).

Figura 28. Atividade relativa residual das formulações contendo papaína.

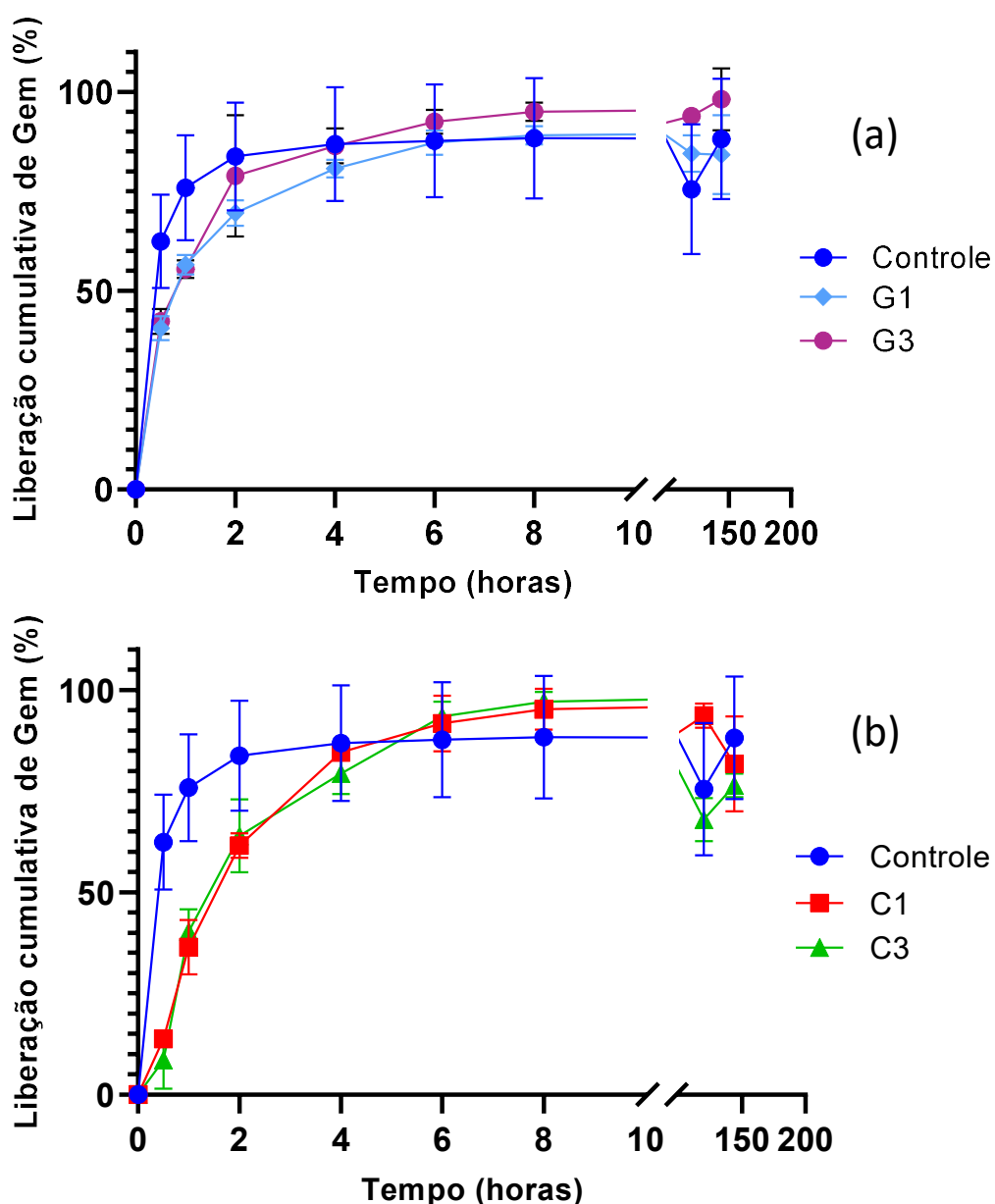


6.11 Ensaio de liberação in vitro do princípio ativo

A liberação do princípio ativo é de importância fundamental para garantir um tratamento prolongado, mais efetivo e com menos efeitos colaterais. O perfil de liberação da gencitabina pelas formulações propostas está demonstrado na Figura 29. Durante os primeiros 30 minutos de teste, o controle (gencitabina em solução salina) liberou $62,4 \pm 11,7$ %. As formulações de goma gelana também apresentaram uma liberação rápida, com $40,5 \pm 2,9$ %, $42,3 \pm 3,1$ %, do gel sem enzima (G1) e com papaína nativa (G3), respectivamente, na primeira meia hora de ensaio. Por outro lado, as formulações de CMC com PVA apresentaram um perfil mais lento com $13,8 \pm 1,7$ % e $85,4 \pm 7,1$ %, no mesmo período para as formulações sem enzima (C1) e com papaína (C3), respectivamente. Após 24h, todas as amostras de CMC com PVA liberaram toda a droga carregada ($98,8 \pm 4,5$ % e 101 ± 2 %;).

Matricardi et al. (2009) reportaram um comportamento similar de hidrogéis físicos de gelana, com uma liberação rápida a 37 °C. No estudo citado, a liberação da vitamina B12 foi de 80% nas primeiras 8 horas, ainda que as matrizes tivessem maior concentração (2%) que a proposta neste trabalho, e a vitamina também apresentasse maior peso molecular o que, em general, tende a diminuir a taxa de liberação (MATRICARDI et al., 2009). Guhusakar e coautores (2017) publicam um estudo com liberação mais lenta de paclitaxel de uma matriz de gelana. Após 52 horas de experimento, apenas 20% do fármaco havia sido liberado. No modelo desenvolvido por eles, entretanto, a droga lipofílica estava encapsulada em lipossomos com bicamada que, por sua vez, eram carregados à matriz polimérica. Desta maneira, o efeito de *burst release* foi evitado, já que a droga precisava atravessar a duas camadas dos lipossomos e, depois, a matriz de gelana (GUHASARKAR; MORE; BANERJEE, 2017).

Figura 29. Perfil de liberação acumulativa da gencitabina. Os resultados estão apresentados como valores médios (n=3) em % de gencitabina carregada nas (a) formulações preparadas a partir de goma gelana e (b) formulações preparadas a partir da blenda CMC com PVA.



Em relação aos estudos de matrizes de CMC e PVA, Ghorpade e colaboradores prepararam filmes de CMC e PVA reticulados com ácido cítrico para a entrega de fármacos hidrossolúveis. Os resultados obtidos mostraram um *burst* com 27% de liberação da droga (sulfato de gentamicina) em tampão fosfato na primeira hora de experimento. A liberação se estendeu por até 8 horas (GHORPADE et al., 2019). Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram

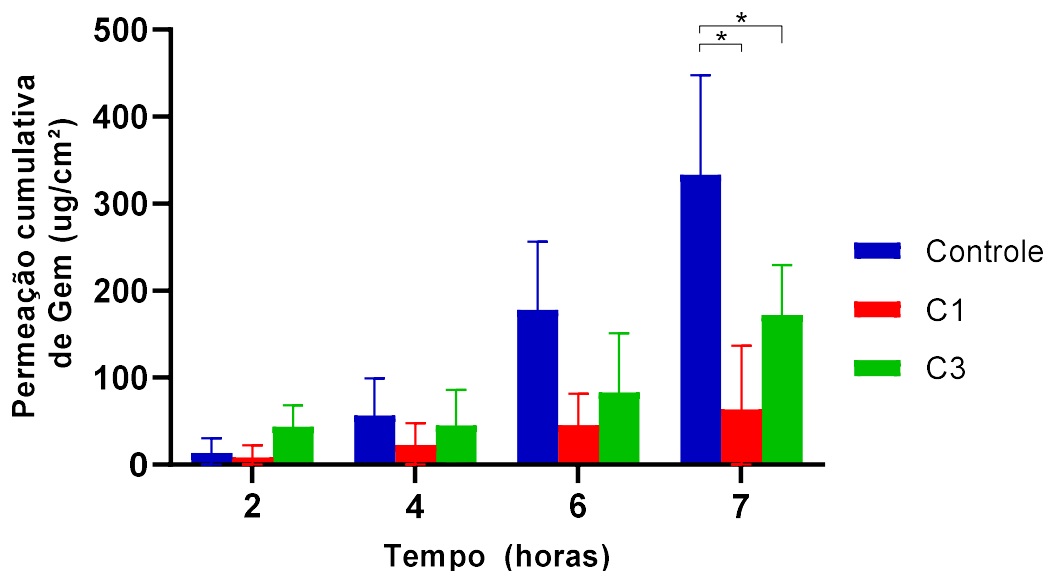
perfil semelhante, com um *burst* inicial seguido por uma liberação prolongada de até 8 horas. Estender o tratamento por este período significaria um importante avanço às terapias que, atualmente, agem por cerca de 2 horas, devido à necessidade de micção dos pacientes. Além disso, a liberação sustentada ao longo do tempo vislumbra uma diminuição de efeitos colaterais e a possibilidade de queda na frequência das instilações, representando uma significativa melhoria da qualidade de vida do paciente.

5.12 Capacidade de permeação das formulações em *ex-vivo*

O ensaio de permeação *ex vivo* foi realizado com as melhores formulações (CMC com PVA) considerando os resultados anteriores com perfil de liberação mais lento, melhores propriedades mucoadesivas e estabilidade. Uma solução de gencitabina em solução salina (NaCl 0,9% m/v) na mesma concentração dos hidrogéis (10 mg/mL) e o gel sem papaína (formulação C1) foram usados como controles. A quantidade de gencitabina permeada através da bexiga e a quantidade retida no tecido foram quantificadas por HPLC. A concentração da gencitabina na câmara receptora foi passível de quantificação apenas 2 horas depois do início do ensaio para todas as amostras. O tempo de latência (*lag time*) foi menor para todas as formulações em comparação com o controle de salina (Tabela 8). Às 2 horas de experimento, as formulações contendo papaína nativa apresentaram maior capacidade de permeação, com detecção de $13,6 \pm 17,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $8,6 \pm 13,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, e $43,8 \pm 24,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, para o controle, CMC com PVA sem enzima (formulação C1), e CMC com PVA e papaína (formulação C3), respectivamente. Entretanto, com o decorrer do tempo, as amostras de controle em salina apresentaram maior capacidade de permeação, e, portanto, maiores concentrações na câmara receptora ($333,30 \pm 114,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no $t=7\text{h}$). A formulação sem enzima (formulação C1) apresentou menores concentrações de permeação durante todo o período de teste, com $63,45 \pm 73,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ após 7 horas, e a formulação CMC+PVA com papaína nativa (formulação C3) apresentou capacidade de permeação intermediária, com $172,39 \pm 57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. É importante notar que a presença do hidrogel retardou a liberação do fármaco permitindo uma liberação prolongada e, certamente, influenciando no processo de permeação – retardando-o. Isso fica claro ao comparar o controle de salina com o controle de gel sem papaína

(formulação C1) em que a permeação do último é mais lenta que no primeiro caso. Mas, por outro lado, na presença da papaína, a capacidade de permeação do fármaco carregado no gel aumenta (Figura 30).

Figura 30. Permeação cumulativa através do tecido da bexiga urinária.



O tempo de latência (T_0) e o fluxo estacionário (J) calculados para as formulações estão apresentados na Tabela 8. O tempo de latência foi maior para o controle quando comparado com as formulações contendo hidrogel. A presença da papaína diminuiu em média 3,8 vezes o tempo necessário para a droga atravessar o tecido. Entretanto, a presença do polímero por si mesmo parece já ter permitido uma permeação mais rápida que o controle em salina, uma vez que a formulação C apresentou um lag time 1,5 vezes menor que o calculado para o controle. Isso pode ter acontecido devido às propriedades de bioadesão (e, portanto, interação) das cadeias poliméricas quando em contato com as glicoproteínas presentes na mucina do urotélio. Conforme observado nos ensaios de reologia apresentados anteriormente para avaliação da mucoadesividade, as formulações de CMC com PVA apresentaram um componente de viscosidade positivo devido à bioadesão, indicando a presença de energia relacionada a pontes físicas e químicas formadas entre polímero e mucina. O fluxo estacionário (J) encontrado para o controle foi maior que os calculados para os géis, entretanto, a presença da papaína na formulação, aumentou a taxa de fluxo em relação à formulação sem enzima.

Um estudo recente reportou o desenvolvimento de uma microemulsão para o carreamento de cisplatina, com capacidade de permeação aumentada para a administração intravesical. O ensaio em células de Franz foi realizado com pele de ratos como forma indireta de avaliar a capacidade de permeação no urotélio das formulações propostas. Os resultados obtidos mostraram um aumento de permeação da ordem de 26 vezes e 14 vezes para as formulações estudadas em comparação ao controle (solução de cisplatina). O tempo de latência também diminuiu de forma significativa de 7,5h para uma faixa de 0,5-3h, confirmando a capacidade de aumento de permeação das microemulsões formuladas (CHEN et al., 2021).

Outro estudo baseado no desenvolvimento de formulações de hidrogel para a entrega de quimioterapia para o tratamento de melanoma mostrou a capacidade de permeação das formulações através da pele. Os resultados obtidos permitiram concluir que a presença do polímero Pluronic® F-127 aumentava a capacidade de permeação da formulação devido à presença de um bloco central hidrofóbico, capaz de interagir com os lipídeos presentes na pele. Além disso, observou-se que concentrações mais altas (23% e 25%) acarretavam na formação de fortes redes poliméricas que diminuíam ou impediam a liberação e permeação do ativo (FONSECA et al., 2021).

Tabela 8. Tempo de latência e fluxo estacionário das formulações testadas.

Amostra	Tempo de latência (T₀ - h)	Fluxo estacionário (J - µg/cm²/h)
<i>Controle (NaCl+Gem)</i>	2,3±0,2	60,5±18,8
<i>C1</i>	1,5±0,31	10,8±10,3
<i>C3</i>	0,6±0,5	24,3±10,7

Em relação à massa retida nos tecidos, as amostras de bexiga com controle apresentaram maior quantidade de fármaco (Tabela 9. Massa de gencitabina retida nos tecidos de bexiga urinária após 7 horas de ensaio de permeação. Isso foi possível por causa da liberação mais rápida da gencitabina. As formulações de CMC com PVA apresentaram valores similares de fármaco retido, considerando o erro.

Tabela 9. Massa de gencitabina retida nos tecidos de bexiga urinária após 7 horas de ensaio de permeação.

Amostra	Massa de gencitabina retida (μg)
<i>Controle (NaCl+Gem)</i>	792,18 \pm 9,42
C1	271,41 \pm 440
C3	198,40 \pm 14,80

A partir dos resultados foi possível concluir que as formulações propostas foram capazes de liberar de forma sustentada o fármaco por um período prolongado e aumentar a permeação do mesmo, diminuindo o tempo de latência.

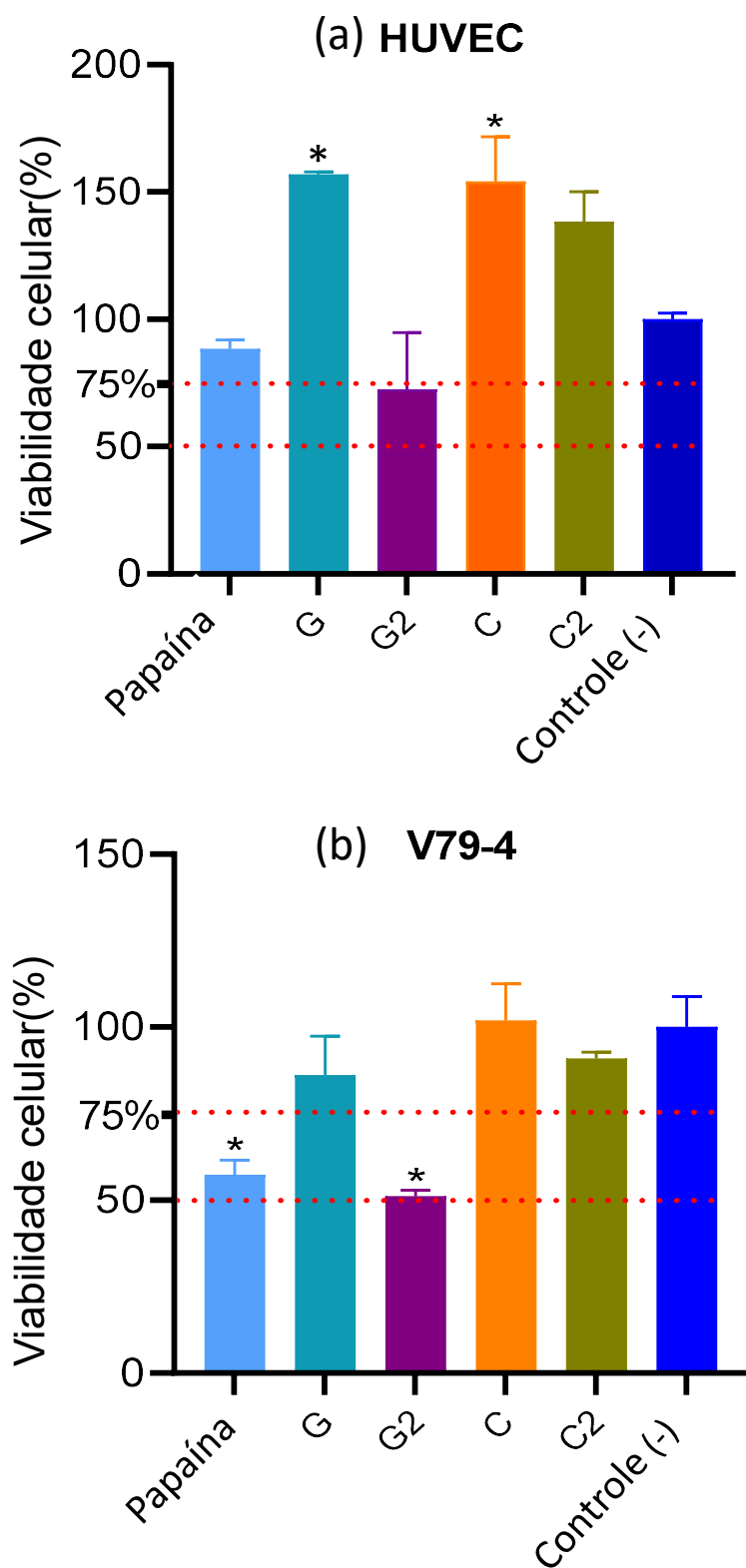
5.13 Ensaio de Biocompatibilidade

5.13.1 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade mostrou que nenhuma das matrizes apresentou toxicidade às linhagens celulares testadas (Figura 31). Para a linhagem HUVEC (célula endotelial humana), a papaína livre e combinada com os géis de gelana e de CMC e PVA não apresentou citotoxicidade, com viabilidades celulares de 88,4 \pm 3,4%, 72,41 \pm 22,4% e 138,2 \pm 11,8% ($p > 0,05$).

Para a linhagem celular V79-4, de fibroblastos, as matrizes poliméricas isoladas também não apresentaram citotoxicidade, com 86,14 \pm 11,3% de viabilidade para as células incubadas com a gelana e 101,94 \pm 10,6% para as células incubadas com a blenda de CMC e PVA. Estudos anteriores mostraram que hidrogéis preparados a partir de goma gelana e também blendas poliméricas de CMC, PVA e PEG (polietilenoglicol) não apresentam toxicidade a linhagens de fibroblastos (ISMAIL et al., 2019; LI et al., 2020). Os fibroblastos apresentaram maior sensibilidade à papaína, com viabilidade celular menor que 75% para a enzima livre e para as formulações com gelana. Todavia, as formulações de CMC e PVA com papaína permitiram a multiplicação celular com viabilidade em 90,92 \pm 1,9%.

Figura 31. Viabilidade celular das linhagens (a) HUVEC e (b) V79-4 após incubação com as formulações propostas



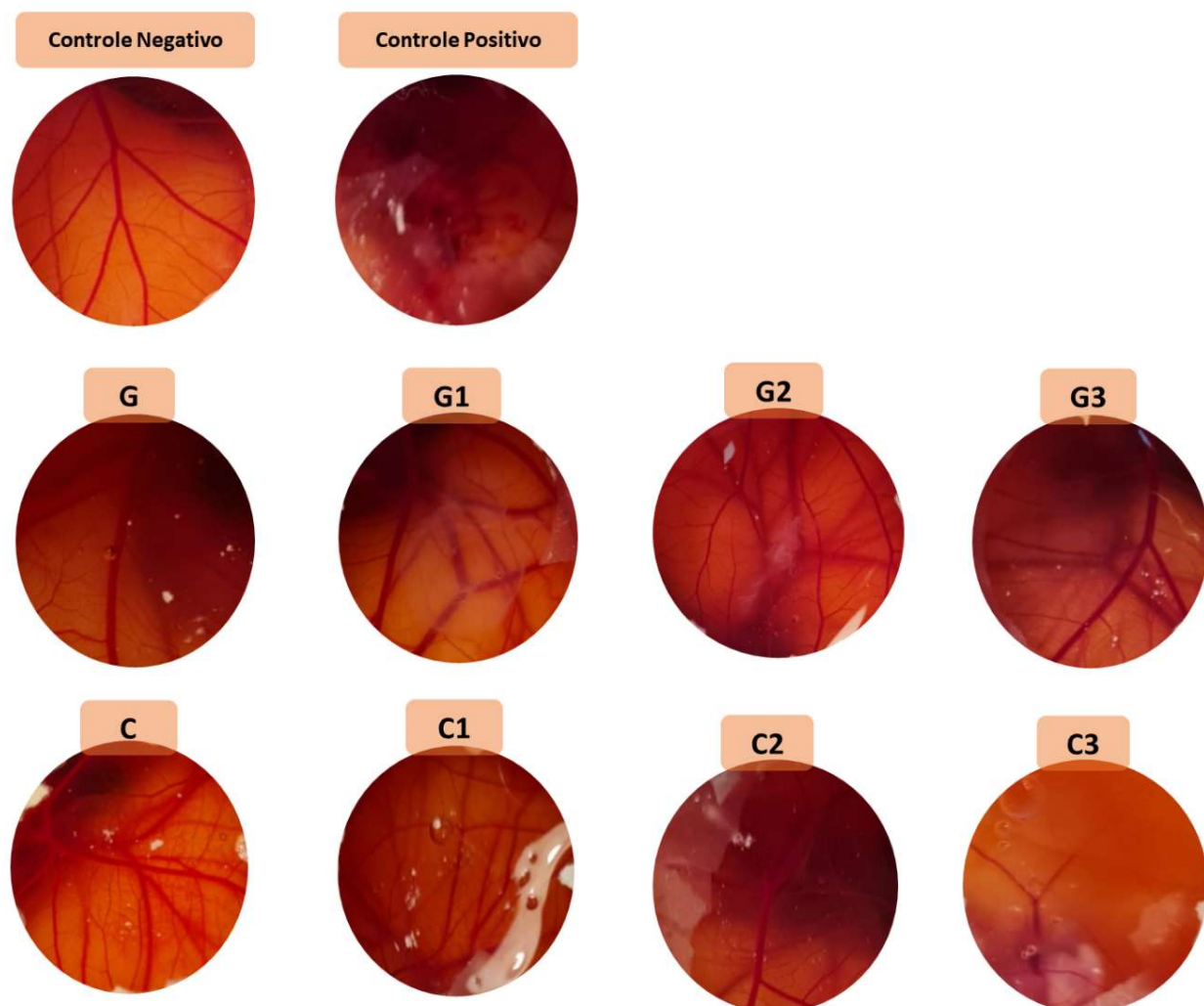
Apesar de algumas amostras terem apresentado viabilidade menor que 75%, nenhuma ficou abaixo de 50%. Nos ensaios com a linhagem HUVEC, apenas as amostras de gel gelana (G) e de gel de CMC e PVA (C), quando comparadas ao controle negativo apresentaram $p < 0,05$. Para a linhagem de fibroblastos, as amostras de papaína e gelana com papaína (G2) apresentaram diferença significativa do controle negativo ($p < 0,05$).

5.13.2 Avaliação do potencial irritante das formulações pelo método HET CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane)

O ensaio de HET-CAM é um ensaio simples e efetivo para prever o potencial de irritação de uma formulação por meio da avaliação de alterações na membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha fertilizados. A membrana apresenta um tecido completamente vascularizado, contendo capilares, veias e artérias que podem induzir um processo inflamatório na presença de agentes nocivos. Portanto, o ensaio pode ser uma forma fácil e rápida para selecionar formulações em termos de biocompatibilidade antes de estudos pré-clínicos (ALVAREZ-RIVERA et al., 2016). Na Figura 32 estão representadas as fotos de todos os ovos após 5 minutos de contato com as formulações e controles.

Após observação por 5 minutos, os ovos tratados com as formulações não apresentaram nenhum sinal de hemorragia, lise ou coagulação. De acordo com o protocolo do teste a pontuação obtida classifica as formulações, portanto, como “Não irritante ou praticamente nenhuma”.

Figura 32. Imagens do ensaio de HET-CAM após 5 minutos de contato com as formulações. Os códigos estão em acordo com as tabelas 2 e 3. Os controles + e – foram soluções de 0,1 N NaOH e 0,9% NaCl, respectivamente (n=2).



6. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver novas formulações contendo papaína como agente de aumento de permeação, para melhora da entrega da quimioterapia, bem como torná-la menos árdua para o paciente, diminuindo os efeitos colaterais e a frequência de aplicação. Para tanto, mucoadesividade, reologia adequada e capacidade de permeação aumentada foram as propriedades de interesse para as formulações propostas. A goma gelana, a carboximetilcelulose e o polivinil álcool, polímeros biocompatíveis e biodegradáveis e com propriedades de gelificação, foram selecionados como veículos para o fármaco gencitabina. A papaína pela primeira vez foi testada como agente de aumento de permeabilidade para este tipo de terapia.

As formulações obtidas apresentaram boa estabilidade com armazenamento em geladeira, a 4 °C. Os géis preparados com gelana se mantiveram estáveis por 60 dias, enquanto as formulações preparadas com a blenda de CMC com PVA não desestabilizaram até o final do período do ensaio (90 dias) e foram capazes de preservar a atividade enzimática de forma mais efetiva.

O comportamento reológico de todas as formulações foi de caráter pseudoplástico e, portanto, adequado para a aplicação por cateter e seringa. Em termos de interações entre os polímeros e a mucina, os ensaios reológicos mostraram que tanto a gelana quanto a blenda CMC com PVA apresentaram um componente de bioadesão positivo, confirmando o efeito sinérgico entre os componentes da mescla e, portanto, capacidade de mucoadesão. Para além disso, as formulações contendo enzima apresentaram componentes de bioadesão inferiores aos controles (géis sem enzima, C e G), indicando a ação mucolítica da papaína. A utilização de agentes mucolíticos é uma estratégia já estudada para outros tratamentos com o intuito de melhorar a capacidade de permeação de um ativo. Desta maneira, com este ensaio foi possível confirmar o potencial de adesão e permeação das formulações propostas.

A capacidade de mucoadesão também foi estudada por meio de ensaios de retenção e força de bioadesão, indicando que as formulações de gelana apresentaram melhor capacidade de adesão. Por outro lado, o ensaio de força de adesão corroborou com os resultados de interação entre mucina e polímeros,

mostrando maior mucoadesividade por parte das formulações preparadas a partir das blendas de CMC com PVA.

Os testes de liberação *in vitro* também apresentaram resultados mais favoráveis às formulações de CMC com PVA, que tiveram capacidade de sustentar a liberação da gencitabina por até 8 horas. O ensaio de permeação em *ex vivo* confirmou a capacidade da papaína aumentar a permeabilidade da quimioterapia após o carreamento no gel.

Por fim, os ensaios preliminares de biocompatibilidade sugeriram que as formulações são seguras para aplicação e têm potencial para seguirem a etapa de ensaios pré-clínicos. Portanto, as formulações obtidas, em especial a C3 (CMC com PVA, papaína e gencitabina) foram capazes de prolongar a liberação, melhorar a permeabilidade da quimioterapia e, em teoria, aumentariam o seu tempo de residência por meio das suas propriedades mucoadesivas. E, dessa forma, podem, futuramente, representar uma alternativa às terapias intravesicais para o tratamento do câncer de bexiga superficial.

6.1 Estudo Futuros

As formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram evidências de serem potenciais alternativas aos tratamentos disponíveis para o câncer de bexiga superficial. Até o presente, estudos *ex vivo* e *in vitro* foram realizados e apresentaram resultados promissores. Contudo, experimentos complementares ainda *in vitro* necessitam ser realizados para detalhamento em relação à eficiência das formulações, isto é, a citotoxicidade às células cancerosas. Estudos complementares de biocompatibilidade também seriam de interesse para garantia da segurança e determinação da viabilidade de se seguir para uma etapa de estudos pré-clínicos.

REFERÊNCIAS

AADIL, K. R. et al. Investigation of poly(vinyl) alcohol-gellan gum based nanofiber as scaffolds for tissue engineering applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, n. September, p. 101276, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101276>>.

ABD AL-JABBAR, S. et al. Fabrication of dopamine conjugated with protein @metal organic framework for targeted drug delivery: A biocompatible pH-Responsive nanocarrier for gemcitabine release on MCF-7 human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 118, n. November 2021, 2022.

ADDEO, R. et al. Randomized phase III trial on gemcitabine versus mytomicin in recurrent superficial bladder cancer: evaluation of efficacy and tolerance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 543–548, 2010.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 273–286, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>>.

ALJAYYOUSI, G. et al. Pharmaceutical nanoparticles and the mucin biopolymer barrier. **BiolImpacts**, v. 2, n. 4, p. 173–174, 2012.

ALVAREZ-RIVERA, F. et al. α -Lipoic Acid in Soluplus® Polymeric Nanomicelles for Ocular Treatment of Diabetes-Associated Corneal Diseases. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2855–2863, 2016.

ANVISA. **Guia de estabilidade dos cosméticos anvisa**. [s.l.: s.n.]v. 1

ARIAS, J. L.; REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Fe₃O₄/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 15, p. 7622–7632, 2012.

ASKELAND, E. J. et al. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. **Advances in Urology**, n. June, 2012.

BAHADUR, A. et al. FT-IR spectroscopic and thermal study of waterborne polyurethane-acrylate leather coatings using tartaric acid as an ionomer. **E-Polymers**, v. 16, n. 6, p. 463–474, 2016.

BASSI DA SILVA, J. et al. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 7, p. 1053–1070, 3 jul. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2017.1294600>>.

BEZERRA, J. R. M. V. **Comportamento reológico da polpa de manga (Mangifera indica L-Keitt)**. 2000. Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BIRD, R. B.; ARMSTRONG, R. C.; HASSAGER, O. **Dynamics of polymeric liquids. volume 1: fluid mechanics**. New York: Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1987.

BOATENG, J. S.; PAWAR, H. V.; TETTEH, J. Polyox and carrageenan based composite film dressing containing anti-microbial and anti-inflammatory drugs for effective wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 181–191, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.045>>.

BOTOS, I. SEGALB, D.M. DAVIES, D. r. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. **National Institutes of Health**, v. 19, n. 4, p. 447–459, 2011. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075535/pdf/nihms278426.pdf>>.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de Polímeros Fundidos**. 2° Edição ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

BUSS, J. H. et al. Nano-BCG: A promising delivery system for treatment of human bladder cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JAN, 2018.

CALÓ, E. et al. Antimicrobial hydrogels based on autoclaved poly(vinyl alcohol) and poly(methyl vinyl ether-: Alt -maleic anhydride) mixtures for wound care applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 60, p. 55211–55219, 2016.

CARDOSO, V. M. de O. et al. Design of mucoadhesive gellan gum and chitosan nanoparticles intended for colon-specific delivery of peptide drugs. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 628, n. July, 2021.

CARDOSO, V. M. de O.; GREMIÃO, M. P. D.; CURY, B. S. F. Mucin-polysaccharide interactions: A rheological approach to evaluate the effect of pH on the mucoadhesive properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 234–245, 2020.

CHANDIRA, M. et al. Formulation Development and Evaluation of Gemcitabine Hydrochloride Dry Powder for Intravenous Infusion. **International Journal of Pharmacology and Technology**, v. 2, n. 1, p. 23–36, 2010. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/304627325>>.

CHANNAMADE, C. et al. Promise Approach on Chemical Stability Enhancement of Papain by Encapsulation System: A Review. **Journal of Young Pharmacists**, v. 13, n. 2, p. 87–90, 2021.

CHEJARA, D. R. et al. Synthesis and evaluation of a sodium alginate-4-aminosalicylic acid based microporous hydrogel for potential viscosupplementation for joint injuries and arthritis-induced conditions. **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, p. 1–14, 2017.

CHEN, T. Y. et al. Fabrication, optimisation and evaluation of cisplatin-loaded nanostructured carriers for improved urothelium permeability for intravesical administration. **Journal of Microencapsulation**, v. 38, n. 6, p. 405–413, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1957037>>.

CHICKERING III, D. E.; MATHIOWITZ, E. Definitions, Mechanisms, and Theories of Bioadhesion. In: MATHIOWITZ, E.;CHICKERING III, D. E. (Ed.). **Bioadhesive Drug Delivery Systems - Fundamentals, Novel Approaches and Development: Drugs and The Pharmaceutical Sciences**. [s.l: s.n.]p. 1–10.

CHUTIPONGTANATE, S.; THONGBOONKERD, V. Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study. **Analytical Biochemistry**, v. 402, n. 1, p. 110–112, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.031>>.

DAL, I. et al. Reologia de líquidos viscoelásticos e termossensíveis em

cisalhamento. **Monografia (Graduação - Engenharia Mecânica) - - Universidade de Brasília**, 2017.

DAVOODI, P. et al. Drug delivery systems for programmed and on-demand release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, p. 104–138, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.002>>.

DE LIMA, C. S. A. et al. An updated review of macro, micro, and nanostructured hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 10, p. 1–28, 2020.

DIMATTEO, R.; DARLING, N. J.; SEGURA, T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 167–184, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.007>>.

DONG, S. et al. Factors influencing the adhesive behavior of carboxymethyl cellulose-based hydrogel for food applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 398–406, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.027>>.

DOWN, C. J.; NAIR, R.; THURAIRAJA, R. Bladder cancer. **Surgery (United Kingdom)**, v. 34, n. 10, p. 532–539, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2016.08.001>>.

DUCHÊNE, D.; TOUCHARD, F.; PEPPAS, N. A. Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 2, p. 283–318, 1988.

DUTTA, D. et al. Targeting Gemcitabine hydrochloride to tumor microenvironment through stimuli-responsive Nano-conjugate: Synthesis, characterization, and in vitro assessment. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. June, p. 101981, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101981>>.

ESHEL-GREEN, T.; BIANCO-PELED, H. Mucoadhesive acrylated block copolymers micelles for the delivery of hydrophobic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 42–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.044>>.

FARR, S. E.; CHESS-WILLIAMS, R.; MCDERMOTT, C. M. Gemcitabine: Selective cytotoxicity, induction of inflammation and effects on urothelial function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 316, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.011>>.

FAZOLIN, G. N. et al. The effects of radiation and experimental conditions over papain nanoparticle formation: Towards a new generation synthesis. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 169, n. August, 2018.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; CASTAÑEDA, D.; HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, p. 91–101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>>.

FERRAZ, C. C. et al. Validation of in vitro analytical method to measure papain activity in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 658–661, 2014.

FERRIS, C. J. et al. Modified gellan gum hydrogels for tissue engineering applications. **Soft Matter**, v. 9, n. 14, p. 3705–3711, 2013.

FLORES-HUICOCHEA, E. et al. Sol-gel transition temperatures of high acyl gellan with monovalent and divalent cations from rheological measurements. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 299–305, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.007>>.

FONSECA, A. de M. et al. Development of transdermal based hydrogel formulations of vinorelbine with an evaluation of their in vitro profiles and activity against melanoma cells and in silico prediction of drug absorption. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, n. February, 2021.

FU, C. et al. Conjugating an anticancer drug onto thiolated hyaluronic acid by acid liable hydrazone linkage for its gelation and dual stimuli-response release. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 163–170, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.024>>.

GALLI, R. et al. TLR Stimulation of Prostate Tumor Cells Induces Chemokine-Mediated Recruitment of Specific Immune Cell Types. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6658–6669, 2010.

GARCIA, P. V. et al. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: Mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2474-z>>.

GHORPADE, V. S. et al. Citric acid crosslinked carboxymethylcellulose-polyvinyl alcohol hydrogel films for extended release of water soluble basic drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, n. May, p. 421–430, 2019.

GRABOVAC, V. et al. Papain: An effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 1001–1006, 2007.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1713–1723, 2005.

GUHASARKAR, S.; MORE, P.; BANERJEE, R. Urothelium-adherent, ion-triggered liposome-in-gel system as a platform for intravesical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 245, p. 147–156, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.031>>.

GUO, P. et al. A gel system for single instillation of non-muscle-invasive bladder Cancer: A “divide-and-rule” strategy. **Journal of Controlled Release**, v. 285, n. June, p. 46–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.036>>.

HALIM, N. F. A. et al. Gellan Gum-Lil gel polymer electrolytes. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 554, n. December 2014, p. 232–238, 2012.

HÄNZE, J. et al. Effects of multi and selective targeted tyrosine kinase inhibitors on function and signaling of different bladder cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 316–325, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.110>>.

HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. **A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength** *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 1990. .

HOMAEI, A.; SAMARI, F. Investigation of activity and stability of papain by adsorption on multi-wall carbon nanotubes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1630–1635, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.038>>.

HU, Q.; CHEN, Q.; GU, Z. Advances in transformable drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 178, p. 546–558, 2018.

INCA. **Câncer de bexiga**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

ISMAIL, N. A. et al. Gellan gum incorporating titanium dioxide nanoparticles biofilm as wound dressing: Physicochemical, mechanical, antibacterial properties and wound healing studies. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, n. December 2018, p. 109770, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109770>>.

IVARSSON, D.; WAHLGREN, M. Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 353–359, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.12.020>>.

JACOB, J. et al. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 43–55, 2018.

JAIN, P.; KATHURIA, H.; MOMIN, M. Clinical therapies and nano drug delivery systems for urinary bladder cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 226, 2021.

JOHNSON, K. L. Mechanics of adhesion. **Tribology International**, v. 31, n. 8, p. 413–418, 1998.

KALDYBEKOV, D. B. et al. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. September 2017, p. 83–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.039>>.

KAMPHUIS, I. G. et al. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 179, n. 2, p. 233–256, 1984.

KARAVANA, S. Y. et al. Gemcitabine hydrochloride microspheres used for intravesical treatment of superficial bladder cancer: A comprehensive in vitro/ex vivo/in vivo evaluation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 1959–1975, 2018.

KATOCH, A.; CHOUDHURY, A. R. Understanding the rheology of novel guar-gellan gum composite hydrogels. **Materials Letters**, v. 263, p. 127234, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127234>>.

KOLAWOLE, O. M. et al. Advances in intravesical drug delivery systems to treat bladder cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 105–117, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.120>>.

KOLAWOLE, O. M.; LAU, W. M.; KHUTORYANSKIY, V. V. Chitosan/ β -glycerophosphate in situ gelling mucoadhesive systems for intravesical delivery of mitomycin-C. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 1, n. November 2018, p. 100007, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100007>>.

KUNDU, D.; BANERJEE, T. Carboxymethyl Cellulose-Xylan Hydrogel: Synthesis, Characterization, and in Vitro Release of Vitamin B 12. **ACS Omega**, v. 4, n. 3, p. 4793–4803, 2019.

LAFTAH, W. A.; HASHIM, S.; IBRAHIM, A. N. Polymer hydrogels: A review. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 50, n. 14, p. 1475–1486, 2011.

LAMMERS, T. et al. Simultaneous delivery of doxorubicin and gemcitabine to tumors in vivo using prototypic polymeric drug carriers. **Biomaterials**, v. 30, n. 20, p. 3466–3475, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.040>>.

LEE, Y. H. et al. Characterization of HGF/Met signaling in cell lines derived from urothelial carcinoma of the bladder. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 2313–2329, 2014.

LEUNG, S. H. S.; ROBINSON, J. R. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. **Journal of Controlled Release**, v. 12, n. 3, p. 187–194, 1990.

LI, Y. et al. Construction of porous sponge-like PVA-CMC-PEG hydrogels with pH-sensitivity via phase separation for wound dressing. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 8, p. 505–515, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581200>>.

LIEDBERG, F. et al. Local recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer in Sweden: A population-based follow-up study. **Scandinavian Journal of Urology**, v. 49, n. 4, p. 290–295, 2015.

LIMA, F. et al. Chitosan-based hydrogel for treatment of temporomandibular joint arthritis. **Polimeros**, v. 31, n. 2, p. 1–6, 2021.

LIU, Z. et al. Preparation and characterization of papain embedded in magnetic cellulose hydrogels prepared from tea residue. **Journal of Molecular Liquids**, v. 232, p. 449–456, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.100>>.

MAHDI, M. H.; CONWAY, B. R.; SMITH, A. M. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 488, n. 1–2, p. 12–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.011>>.

MAHINROOSTA, M. et al. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. **Materials Today Chemistry**, v. 8, p. 42–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.02.004>>.

MARTINEZ RODRIGUEZ, R. H.; BUISAN RUEDA, O.; IBARZ, L. Bladder cancer: Present and future. **Medicina Clinica**, v. 149, n. 10, p. 449–455, 2017. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.06.009>>.

MATRICARDI, P. et al. Preparation and characterization of novel Gellan gum hydrogels suitable for modified drug release. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3376–3391, 2009.

MILOŠEVIĆ, J. et al. Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol. **Amino Acids**, v. 51, n. 5, p. 829–838, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-019-02724-3>>.

MORRIS, B. A. Rheology of Polymer Melts. **The Science and Technology of Flexible Packaging**, p. 121–147, 2017.

MORSI, M. A. et al. Preparation, structural analysis, morphological investigation and electrical properties of gold nanoparticles filled polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose blend. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 6, p. 5996–6010, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.09.074>>.

MOSER, P. **Comportamento Reológico De Gomas Guar E Xantana Na Presença De Polióis**. 2012. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.

MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>>.

NAIR, A. B. et al. Development of asialoglycoprotein receptor-targeted nanoparticles for selective delivery of gemcitabine to hepatocellular carcinoma. **Molecules**, v. 24, n. 24, 2019.

OLIVEIRA, M. B.; VILLA NOVA, M.; BRUSCHI, M. L. A review of recent developments on micro/nanostructured pharmaceutical systems for intravesical therapy of the bladder cancer. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2017.1312441>>.

ONCOGUIA. **Graves falhas na produção da Onco BCG foram vistas pela Anvisa**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/graves-falhas-na-producao-da-onco-bcg-foram-vistas-pela-anvisa/15314/8/>>. Acesso em: 20 jun. 2023.

ONCOGUIA, I. **Estadiamento do Câncer de Bexiga**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estadiamento-do-cancer-de-bexiga/660/202/>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

OSMAŁEK, T. Z. et al. Rheological investigation of high-acyl gellan gum hydrogel and its mixtures with simulated body fluids. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 10, p. 1435–1449, 2018.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197–220, 2009.

PEPPAS, N. A.; HOFFMAN, A. S. Hydrogels. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, n. 1, p. 153–166, 2020.

PEPPAS, N. A.; HUANG, Y. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1675–1687, 2004.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: A review. **Biomaterials**, v. 17, n. 16, p. 1553–1561, 1996.

PERABO, F. G. E. et al. Preclinical evaluation of superantigen (Staphylococcal Enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer. **International Journal of Cancer**, v. 115, n. 4, p. 591–598, 2005.

PICONE, C. S. F.; DA CUNHA, R. L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 5, p. 502–511, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.12.007>>.

PRAJAPATI, S. K. et al. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 120, n. March, p. 109191, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>>.

RATNER, B. D. Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 21, p. 171–191, 2019.

RAVNIK, J. et al. Lyophilization model of mannitol water solution in a laboratory scale lyophilizer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, n. February, p. 28–38, 2018.

ROSA, A. L. **Caracterização físico-química de sistemas coloidais em Sprays Nasais**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

SANDELL, L. S.; LUNER, P. Flocculation of microcrystalline cellulose with cationic ionene polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 18, n. 7, p. 2075–2083, 1974.

SHAIKH, R. et al. Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 89–100, 2011.

SHENG, W. et al. Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 143–148, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.088>>.

SHI, K. et al. Sustained co-delivery of gemcitabine and cis-platinum via biodegradable thermo-sensitive hydrogel for synergistic combination therapy of pancreatic cancer. **Nano Research**, v. 12, n. 6, p. 1389–1399, 2019.

SHOUKET, H. A. et al. Study on industrial applications of papain: A succinct review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 614, n. 1, 2020.

SMITH, B. C. Organic Nitrogen Compounds IX: Urethanes and Diisocyanates. **Spectroscopy**, v. 35, n. 5, p. 17–21, 2020. Disponível em: <<https://www.spectroscopyonline.com/view/organic-nitrogen-compounds-ix-urethanes-and-diisocyanates>>.

SOARES, A. M. B. F. et al. Immobilization of papain enzyme on a hybrid support containing zinc oxide nanoparticles and chitosan for clinical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 243, n. May, 2020.

SUDHAMANI, S. R.; PRASAD, M. S.; UDAYA SANKAR, K. DSC and FTIR studies

on Gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 3, p. 245–250, 2003.

SWEIS, R. F.; GALSKY, M. D. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma—Immunobiology/biomarkers. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 34, n. 12, p. 556–565, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.10.006>>.

SZYMAŃSKA, E.; CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; WINNICKA, K. Comparison of rheological, drug release, and mucoadhesive characteristics upon storage between hydrogels with unmodified or beta-glycerophosphate-crosslinked chitosan. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 522, n. 1–2, p. 172–197, 2017.

TAYEL, S. A. et al. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, n. 1–2, p. 293–305, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.049>>.

TEKADE, M. et al. **Thiolated-Chitosan: A Novel Mucoadhesive Polymer for Better-Targeted Drug Delivery**. London, United Kingdom: Elsevier Inc., 2019.

TOFFOLETTO, N. et al. Asymmetry in drug permeability through the cornea. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, 2021.

TREISER, M. et al. **Degradable and Resorbable Biomaterials**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2013.

TYLER, A. Urothelial Cancers: Ureter, Renal Pelvis, and Bladder. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 28, n. 3, p. 154–162, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soncn.2012.05.004>>.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

VARCA, G. H. C. et al. Synthesis of papain nanoparticles by electron beam irradiation – A pathway for controlled enzyme crosslinking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 654–659, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.070>>.

VASCONCELOS, N. F. et al. Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 3065–3077, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.200>>.

XU, X. J. et al. Effects of Different Acyl Gellan Gums on the Rheological Properties and Colloidal Stability of Blueberry Cloudy Juice. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 5, p. 1215–1220, 2018.

YAMAMOTO, F.; CUNHA, R. L. Acid gelation of gellan: Effect of final pH and heat treatment conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 517–527, 2007.

YAN, J. et al. Comparison of different in vitro mucoadhesion testing methods for hydrogels. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 40, p. 157–163, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.06.012>>.

ZHANG, D. et al. A magnetic chitosan hydrogel for sustained and prolonged delivery of Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of bladder cancer. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 10258–10266, 2013.

ZHOU, T. C. et al. A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 35, n. 1, p. 14–20, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.10.004>>.

ZHU, J. et al. Effect of Na₂CO₃ on the Microstructure and Macroscopic Properties and Mechanism Analysis of PVA/CMC Composite Film. **Polymers**, v. 12, n. Cmc, p. 1–13, 2020.

ZIA, K. M. et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1068–1087, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099>>.

ZUIVERLOON, T. C. M. et al. Recommendations for follow-up of muscle-invasive bladder cancer patients: A consensus by the international bladder cancer network. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 36, n. 9, p. 423–431, 2018.

APÊNDICE - PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA

Resumos publicados em anais de congressos

- **Lima, C.S.A.**; Hermida, M.R.; Varca, G.C.; Freitas, L.F.; Lorenzo, C.A.; Lugao, A.B. Géis mucoadesivos para o tratamento do câncer de bexiga superficial. 24º CBECiMat – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – 06 a 10 de novembro de 2022 – água de Lindóia, SP – Brasil
- Varca, J.O.; Klingbeil, F.; Nogueira, K.; **Lima, C.S.A.**; da Cruz, C.C.; Freitas, L.F.; Varca, G. Mathor, M.B.; Lugao, A.B. A biological study of gelatin-PVA based scaffold functionalized with albumin for biomedical purposes. 24º CBECiMat – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – 06 a 10 de novembro de 2022 – água de Lindóia, SP – Brasil
- Nogueira, K.M.; Varca, J.O.; **Lima, C.S.A.**; da Cruz, C.C.; Ribeiro, A.H.; Freitas, L.F.; Varca, G.; Lugao, A.B. Solubility study of Kraft lignin for the development of electrospun nanofibers 24º CBECiMat – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – 06 a 10 de novembro de 2022 – água de Lindóia, SP – Brasil
- **Lima, C.S.A.**; Varca, G.; De Freitas, L.F.; Varca, J.O.; Lugão, A.B. Natural polymer hydrogel with gold nanoparticles for bladder cancer chemotherapy delivery.” 6ª Edição do Workshop de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharias de Tecidos. 29 a 31 de outubro de 2019 – MEMORIAL DA América Latina – São Paulo – SP – Brasil.
- **Lima, C.S.A.**; Varca, G.H.C.; Varca, J.P.R.O.; Nogueira, K.M.; Santos, F.A.; Ribeiro, A.P.H.; Lugão, A.B.; Freitas, L.F.; Rogero, S.O. CMC and PVA hydrogel containing papain nanoparticles for drug delivery. The second Pan-American Nanotechnology Conference. Águas de Lindoia, SP, Brazil – March 04-07, 2020.
- Nogueira, K.M.; Varca, J.P.R.O.; **Lima, C.S.A.**; Varca, G.H.C.; Lugão, A.B. The effects of gamma radiation dose on the swelling capacity of PVP/Lignin hydrogels dressing for wound treatment. 6ª Edição do Workshop de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharias de Tecidos. 29 a 31 de outubro de 2019 – MEMORIAL DA América Latina – São Paulo – SP – Brasil.
- Riello, F.N.; Varca, G.H.; **Lima, C.S.A.**; Freitas, L.F.; Ferreira, A.H.; Lugão, A.B. Synthesis and purification of albumin-based nanoparticles crosslinked

by radiation. The second Pan-American Nanotechnology Conference. Águas de Lindoia, SP, Brazil – March 04-07, 2020.

Artigos publicados em periódicos internacionais

- Lima, Caroline S.A. de; Rial-Hermida, M.I.; Freitas, L.F de; Pereira-da-Mota, A.F.; Vivero-Lopez, M.; Ferreira, A.H.; Kadłubowski, S.; Varca, G.H.C.; Lugão, A.B.; Alvarez-Lorenzo, C. Mucoadhesive gellan gum-based and carboxymethyl cellulose -based hydrogels containing gemcitabine and papain for bladder cancer treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 242, p. 124957, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124957>
- **De Lima, Caroline S. A.**; Varca, Justine P. R. O.; Alves, Victória M.; Nogueira, Kamila M.; Cruz, Cassia P. C.; Rial-Hermida, M. Isabel; Kad'ubowski, S'awomir S. ; Varca, Gustavo H. C. ; Lugão, Ademar B. . Mucoadhesive Polymers and Their Applications in Drug Delivery Systems for the Treatment of Bladder Cancer. **GELS**, 2022, v. 8, p. 587. Doi: <https://doi.org/10.3390/gels8090587>
- Freitas, Lucas F.; Ferreira, Aryel H.; Thipe, Velaphi C.; Varca, Gustavo H. C.; **Lima, Caroline S. A.**; Batista, Jorge G. S.; Riello, Fabiane N.; Nogueira, Kamila; Cruz, Cassia P. C.; Mendes, Giovanna O. A.; Rodrigues, Adriana S.; Sousa, Thayna S.; Alves, Victoria M.; Lugão, Ademar B. The State of the Art of Theranostic Nanomaterials for Lung, Breast, and Prostate Cancers In **Nanomaterials**, 2021, v.11, 2579. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11102579>
- **Lima, C.S.A.**; Varca, G. H. C.; Costa, S. M.; Ferraz, H. G.; Santos, A. C. S.; Lopes, P. S.; Costa, S. A. Development of natural polymeric microcapsules for antimicrobial drug delivery: Triclosan loaded chitosan-and alginate-based microcapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n°9, p. Pages 1477-1486, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1809445> Artigo referente à pesquisa realizada durante o Mestrado intitulado “Estudo do desenvolvimento de microcápsulas de polímeros naturais para aplicação em têxteis médicos” com bolsa FAPESP (processo #[2015/08845-5](#)).
- **Lima, C.S.A.**; Varca, J. P. R. O.; Nogueira, K. M.; Fazolin, G. N.; Freitas, L. F.; Souza, E. W.; Lugão, A. B.; Varca, G. H.C. Study of Semi-Solid Pharmaceutical Formulations for the Delivery of Papain Nanoparticles. **Pharmaceutics**, 2020, 12(12), 1170; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121170>.

- **Lima**, C.S.A; Balogh, T.S. Varca, J. P. R. O.; Varca, G. H. C.; Lugão, A. B. Lugão; Camacho-Cruz, L. A.; Bucio, E.; Kadlubowski, S. S. An Updated review of Macro, Micro, and Nanostructured Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Pharmaceutics**, **2020**, 12(10), 970; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100970>

Capítulos de livro publicados

- V.C. Thipe; C.S.A. **Lima**; K.M. Nogueira; Jorge G. S. Batista, Aryel H. Ferreira; Maxwell Thatyana, Kattesh V. Katti; Ademar B. Lugão. Silver nanoparticles applications and ecotoxicology for controlling mycotoxins. Chapter 25, in Silver Nanomaterials for Agri-Food Applications. Elsevier, 2021.
- Velaphi C. Thipe; Lucas F. Freitas; **Caroline S. A. de Lima**; Kamila M. Nogueira; Jorge G. S. Batista; Aryel H. Ferreira; Ademar B. Lugão. Cu and Cu-Based Nanomaterials as Nanofungicides Chapter 11 in Kamel Ahmed Abd-Elsalam (eds) Copper Nanostructures: Next-Generation of Agrochemicals for Sustainable Agroecosystems, Elsevier.
- Velaphi C. Thipe; Shireen Mentor; **Caroline S. A. Lima**; Lucas F. Freitas; Ana C. M. Fonseca; Kamila M. Nogueira; Adriana Souza; Jorge G. S. Batista; Aryel H. Ferreira; Ademar B. Lugão. The Role of Probiotics in maintaining immune homeostasis. Chapter 3, The Prevention & Management of Human diseases: A Scientific Perspective, Elsevier, 2021.

Disciplinas cursadas

TNM5783-4/4 - Biomateriais – Propriedades e Avaliação – Conceito A

QFL5817-6/3 - Nanotecnologia Molecular (Instituto de Química/ USP) – Conceito A

TNA5780-4/21 - Fundamentos de Tecnologia Nuclear – Física Nuclear e Aplicações (Obrigatória) - Conceito A

TNM5788-4/5 - Fundamentos de Tecnologia Nuclear – Materiais e Ciclo do Combustível (Obrigatória) - Conceito A

TNR5764-5/3 - Fundamentos de Tecnologia Nuclear – Reatores (Obrigatória) - Conceito A

TNA5781-4/1 - Fundamentos de Tecnologia Nuclear – Proteção Radiológica (Obrigatória) - Conceito A

FBF5821-2/2 – Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Conceito A

Créditos obtidos: 34

Créditos mínimos para depósito de tese: 24

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento,
associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**