



Universidade de Brasília
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

**NANOGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE
DROGAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Brasília
2019**

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

**NANOGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE
DROGAS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi
Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus
Gomes

Brasília
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSI618n SIQUEIRA, FELIPE SOUSA
NANOSEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS / FELIPE
SOUSA SIQUEIRA; orientador CLAURE NAIN LUNARDI GOMES ; co
orientador ANDERSON DE JESUS GOMES . -- Brasília, 2019.
42 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. LIBERAÇÃO CONTROLADA. 2. NANOSEL. 3. DICKKOPF. 4.
QUITOSANA . 5. GALOCIANINA. I. GOMES , CLAURE NAIN LUNARDI
, orient. II. GOMES , ANDERSON DE JESUS, co-orient. III.
Título.

FELIPE SOUSA SIQUEIRA

NANOSEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE DROGAS

BANCA EXAMINADORA



Orientador(a): Prof. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes
Prof. Dra. Claire N. Lunardi Gomes
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências
(Universidade de Brasília/FCE)



Co-Orientador(a): Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes
Prof. Dr. Anderson J. Gomes
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências
(Universidade de Brasília/FCE)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(Universidade de Brasília/FCE)

Prof. MSc. Natane Castelo Branco Duarte
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA
2019

Esse trabalho é dedicado a todas as pessoas que nunca deixam de sonhar e lutam por tudo aquilo que acreditam.

AGRADECIMENTOS

Sonhos se realizam, basta termos fé em Deus e um pouco de ação para que eles aconteçam. Sermos gratos por tudo o que temos e no que nos tornamos como profissionais e seres humanos é uma virtude que todos nós devemos ter, pois só com esse sentimento e atitude podemos devolver ao mundo com excelência o que Deus e boas pessoas fizeram por nós.

Dessa forma, agradeço em primeiro lugar ao meu Deus, aquele que me deu a vitória de chegar até aqui, deu a sua vida por mim e que me fez entender que não estou só, mas que em meio as situações e dificuldades que eu passe Ele sempre estará lá para me ajudar.

Agradeço de coração aos meus pais Manoel Cardoso e Risoneide Pires por toda a educação e princípios que me ensinaram, por todas as vezes que me escutaram e me aconselharam a nunca desistir, bem como a minha irmã Anna, que sempre me estendeu a mão e me apoiou nas minhas decisões.

Agradeço também aos meus familiares, em especial aos meus tios e tias, por toda a ajuda durante essa jornada e por dizerem sempre que eu era capaz e aos meus amigos que me incentivaram a não desistir e a continuar lutando por esse sonho.

Agradeço a Universidade de Brasília por me proporcionar conhecimentos e experiências incríveis durante essa caminhada no término da graduação.

Gratifico a minha orientadora Cláudia Nain Lunardi Gomes, por esse trabalho e por toda dedicação e empenho em me orientar e me ensinar o valor de uma pesquisa e o impacto que ela pode causar no mundo, assim como meu co-orientador Anderson de Jesus Gomes pelo suporte durante esse processo.

E por fim, sou grato pela minha Igreja Ministério Amor de Deus e por todas as pessoas que intercederam por mim e me mostraram a força e o poder de uma oração durante essa jornada acadêmica.

*“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo
de você, menos o seu conhecimento”
Albert Einstein*

RESUMO

Um dos sistemas utilizados para a liberação controlada de fármacos é o nanogel, uma estrutura polimérica que pode ser de origem natural ou sintética, podendo ter como um dos principais componentes a quitosana devido as suas propriedades físico-químicas. Estudos relatam que uma pequena molécula (NCI8642) denominada galocianina, comumente utilizada como corante neurológico, possui a capacidade de inibir a interação de uma proteína denominada Dickkopf 1 e os receptores LRP5/6 da via de sinalização Wnt. Dessa forma, a galocianina é uma possível chave para um novo tratamento de doenças neurodegenerativas. O objetivo desse trabalho é a síntese e a caracterização de um sistema nanotecnológico de liberação controlada contendo galocianina. Para a produção do nanogel, fez-se um levantamento bibliográfico, com análise das metodologias descritas na literatura. O método escolhido foi o de adesão direta à quitosana, por meio de agitação magnética por aproximadamente 36 horas para produção do nanogel de quitosana-galocianina. A presença do corante foi analisada pela técnica de UV-vis, o potencial zeta e o tamanho foram medidos por intermédio do aparelho zetasizer e o perfil de liberação foi feito em diferentes pHs. Como resultados, observou-se que o nanogel de quitosana-galocianina é polidisperso apresentando tamanhos entumecidos de até 900 nm e secos de até 500 nm, no qual possui um melhor perfil de liberação em pH 7,4, uma eficiência de encapsulamento de 16% e uma carga superficial de 68 mV. Conclui-se então, que o nanogel de quitosana-galocianina pode ser uma forma promissora de um sistema nanotecnológico de liberação controlada para o tratamento de taupatias.

Palavras-chave: Liberação controlada, nanogel, dickkopf, quitosana, galocianina

ABSTRACT

One of the mechanisms used to monitor the release of drugs is nanogel, a polymeric material that can be of natural or synthetic origin and may have chitosan as one of the main components due to its physicochemical properties. Studies report that a small molecule (NCI8642) called galocyanin, widely used as a neurological dye, has the ability to inhibit the interaction of a protein called Dickkopf 1 and the LRP5/6 Wnt signaling pathway. Therefore, galocyanine is a potential catalyst to neurodegenerative disease treatment. This research aims to synthesize and characterize a controlled release nanotechnology system containing galocyanin. For nanogel development, a bibliographic survey was conducted, evaluating the methodologies mentioned in the literature. The method chosen was direct adhesion to chitosan by magnetic stirring for about 36 hours to create chitosan-galocyanine nanogel. UV-vis technique examined the presence of the dye, zeta potential and size were determined using the zetasizer tool, and the release profile was rendered at different pHs. As a result, chitosan-galocyanin nanogel was found to be polydisperse with swollen sizes up to 900 nm and dry up to 500 nm, which has a good release profile at pH 7,4, an encapsulation efficiency of 16 percent and a surface load of 68 mV. It is concluded that chitosan-galocyanine nanogel is a promising type of a controlled release nanotechnology system for taupathy treatment.

Keywords: drug release, nanogel, dickkopf, chitosan, galocyanine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos tradicionais de multi dosagem e sistemas de liberação controlada. | 17 |
| Figura 2 – Sinalização Wnt canônica: inibição do complexo multiproteico (Ck1, APC, Axine, GSK3) aumentando a presença de β -catenina resultando na expressão dos genes alvos. | 20 |
| Figura 3 – Ausência da Sinalização Wnt: O complexo multiproteico (Ck1, APC, Axine, GSK3) marca a β -catenina para degradação, inibindo a expressão de genes alvos. | 21 |
| Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana. | 22 |
| Figura 5 – Estrutura molecular da galocianina. | 23 |
| Figura 6 – Processo de Produção do nanogel de quitosana-galocianina. | 28 |
| Figura 7 – A) gráfico indicando as principais áreas do conhecimento; B) mapa de densidade de co-relação entre os termos. | 32 |
| Figura 8 – Imagens em alta resolução da superfície da amostra do nanogel de quitosana contendo galocianina | 36 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho e índice de polidispersão do nanogel de quitosana-galocianina. 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| APC | Células apresentadoras de antígeno |
| Ck1 | Casein kinase 1 |
| DKK | Dickkopf |
| DKK1 | Dickkopf 1 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| FGF9 | Fibroblast Growth Factor 9 |
| g | Grama |
| GSK3 | Glycogen synthase kinase 3 |
| HEMA | Metacrilato de Hidroxietilo |
| LILACS | Literatura Latino Americano em Ciências de Saúde |
| MEDLINE | Literatura Internacional em Ciências da Saúde |
| MEV | Microscópio Eletrônico de Varredura |
| mg | Miligrama |
| MITF | Melanocyte Inducing Transcription Factor |
| ml | Mililitro |
| NH ₂ | AMINO |
| NHS | N-hidroxissuccinimida |
| nm | Nanômetros |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PMN | Polimorfonucleares |
| PPAR- | Peroxissoma |
| SciELO | Scientific Eletronic Library Online |
| THF | Tetrahidrofurano |

UV

Ultra Violeta

β -AP

β -amilóide

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | Nanotecnologia | 16 |
| 2.2 | Liberação controlada de fármacos / Hidrogéis | 17 |
| 2.3 | Taupatias | 19 |
| 2.4 | Quitosana | 21 |
| 2.5 | Galocianina | 23 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 25 |
| 4 | OBJETIVOS | 26 |
| 4.1 | Objetivos específicos | 26 |
| 5 | METODOLOGIA | 27 |
| 5.1 | Pesquisa de protocolos e levantamento bibliográfico | 27 |
| 5.2 | Seleção e montagem dos protocolos experimentais | 27 |
| 5.3 | Produção do nanogel de quitosana/galocianina | 27 |
| 5.4 | Análise de tamanho, polidispersão e potencial zeta do nanogel de quitosana-galocianina | 28 |
| 5.5 | Processo de centrifugação do nanogel | 29 |
| 5.6 | Secagem do nanogel | 29 |
| 5.7 | Microscopia eletrônica de varredura. | 29 |
| 5.8 | Eficiência de encapsulamento | 29 |
| 5.9 | Perfil de liberação <i>in vitro</i> | 30 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 37 |
| | REFERÊNCIAS | 38 |

1 INTRODUÇÃO

Os nanomateriais tem sido foco de estudos há mais de 40 anos, mas somente agora ganharam relevância, pois tornaram-se uma área de interesse de diversos campos da ciência, principalmente da nanociência e nanotecnologia. (NATH; BANERJEE, 2013). Isso se deu devido as diversas vantagens e aplicações que um nanomaterial pode ter, como na liberação controlada de medicamentos, engenharia de tecidos e de diagnóstico e imagem (RAEMDONCK; DEMEESTER; SMEDT, 2009). Tendo tamanhos na faixa de 10 e 1000 nanômetros (nm) (FIGUEIRAS; MIRANDA, 2014).

Com o aumento da expectativa de vida na população, doenças neurológicas como tauopatias, alzheimer e doença de parkinson tiveram um aumento na sua incidência e passaram a ser mais recorrentes. Porém as intervenções utilizadas para o seu tratamento, na maioria das vezes, não funcionam, devido à complexidade que os fármacos possuem de atravessar a barreira hematoencefálica. Isso ocorre porque a barreira possui meios de impedir com que moléculas externas atravessem e gerem dano ou desequilíbrio cerebral, tornando-se seletiva na passagem de moléculas que saem do sangue e vão para o cérebro (FIGUEIRAS; MIRANDA, 2014).

No entanto, um tipo de nanomaterial tem sido amplamente utilizado, são eles os nanogéis, estruturas constituídas por cadeias poliméricas hidrofílicas ou anfifílicas cujo seu objetivo é transportar drogas, ou se ligar em moléculas biologicamente ativas (KABANOV; VINOGRADOV, 2009). Devido a sua eficiência, eles podem ser produzidos sem a presença de um fármaco, podendo ser inserido posteriormente quando são entumecidos em água ou em fluidos biológicos atingindo o seu estado de equilíbrio (SONI; YADAV, 2016).

A produção de um nanogel pode ser feita através de polímeros sintéticos ou naturais por causa da capacidade de serem biodegradáveis, biocompatíveis e de sua atoxicidade, evitando assim a acumulação em órgãos e tecidos, e não sendo prejudicial para os seres humanos. Um exemplo muito utilizado, são os polissacarídeos, como a quitosana (SONI; YADAV, 2016; YADAV; HALABI; ALSALLOUM, 2017).

A quitosana é um produto de origem natural muito importante para a sustentabilidade, pois é de baixo custo, é biodegradável e renovável, sendo benéfico para a economia e para o meio ambiente, de modo que, depois da celulose é o polímero mais abundante da natureza (MENDES et al., 2011).

De caráter catiônico, a sua obtenção provém da desacetilação da quitina encontrada em carapaças de crustáceos e insetos, possuindo uma estrutura molecular parecida com a da celulose, mudando apenas os grupos funcionais (MENDES et al., 2011).

Suas propriedades advém conseqüentemente do grau de sua desacetilação e de massa molar aparente, pois são esses fatores que definem a solubilidade de um polissacarídeo em meio aquoso, tendo a quitosana uma grande solubilidade em

ácidos fracos por possuir em sua estrutura grupos amino protonados que conferem uma maior solvatação, conseqüentemente, um aumento da solubilidade (ABREU et al., 2013; PINHEIRO; GOMES, 2016).

Outra característica muito importante da quitosana, é que ela é uma biomolécula bioadesiva, característica que favorece a sua passagem quanto a do seu fármaco carregado através de barreiras epiteliais, o que pode gerar uma administração por via oral, nasal entre outras (MEDEIROS, 2011; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; TAVARIA et al., 2013).

A galocianina é uma substância de caráter básico sintético, conhecida principalmente por possuir propriedades de coloração nuclear (STENRAM, 1953). Recentemente foi descrito que a galocianina denominada também como NCI8642, é a primeira e única molécula capaz de inibir a interação existente entre a proteína Dickkopf 1 (DKK1) e o receptor LRP6 (MPOUSIS et al., 2016). Tornando-se assim uma possível droga para atuar entre essa interação e conseguir auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas e ósseas (IOZZI et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

Na década de 50 originou-se a ideia de que seria possível a manipulação de átomos individualmente numa escala nanométrica. O que foi algo revolucionário na época, de modo que os olhos dos pesquisadores se voltaram para a nanotecnologia.

A European Medicines Agency estabelece que a nanotecnologia é a utilização de estruturas que são menores que 1000 nanômetros de diâmetros, cujo sua formação e apresentação são para usos e propriedades específicas (DIMER et al., 2013; MOREIRA, 2014).

De maneira geral a nanotecnologia, ciência e tecnologia que trata de pesquisas a nível da nanoescala, tem chamado a atenção nos últimos anos devido ao grande impacto que estes materiais nanoestruturados podem gerar na preservação do meio ambiente e na qualidade de vida, onde esse avanço promove a exploração de novas teorias e fenômenos e pode ser que futuramente promovendo um grande crescimento na economia mundial (FERREIRA; RANGEL, 2009; CAETANO, 2017).

Isso ocorre porque os investimentos em nanotecnologia e nanociência estão crescentes em diversas áreas do conhecimento, representando assim uma ordem de investimentos de bilhões de dólares por parte de agências e fomento em pesquisa e desenvolvimento presentes em todo o mundo (FERREIRA; RANGEL, 2009; CAETANO, 2017; MOREIRA, 2014).

A ordem de recursos em detrimento do desenvolvimento de nanopartículas é US\$ 40 bilhões anuais, onde os Estados Unidos, Japão, China e a Coreia do Sul, são os países com o maior índice de investimento nesses programas e patentes na área de nanotecnologia. Já no Brasil, houve um investimento de US\$ 30 milhões, no período de 2005 a 2006 por parte do Programa Nacional de Desenvolvimento em Nanociência e Nanotecnologia (FERREIRA; RANGEL, 2009).

De uma forma mais precisa o que a nanotecnologia oferece é a realização dos mesmos processos de produtos já conhecidos, mas com a utilização de menos energia e matéria-prima, conseqüentemente, trazendo uma grande vantagem para o planeta e para as diferentes categorias de ecossistemas existentes (MARTINS, 2009).

Com aplicações em diversos âmbitos desde energia e eletrônica até a indústria farmacêutica, a nanotecnologia se destaca principalmente porque essas matérias conseguem mudar sua forma estrutural, onde os átomos presentes passam a demonstrar propriedades e características singulares, reduzindo apenas o tamanho, sem alterar a substância (ROSSI-BERGMANN, 2008; BARIL et al., ; GOMES et al., 2005).

Outro avanço científico que se dá com a utilização da nanotecnologia é a utilização do orgânico com o inorgânico, na qual a parte orgânica passa a ser a fonte de energia da inorgânica, possibilitando a capacidade de manipular átomos e moléculas.

Sendo assim, cria-se inúmeras possibilidades de produzir novas composições de átomos e moléculas que poderão produzir diferentes e inúmeros materiais (MARTINS, 2009).

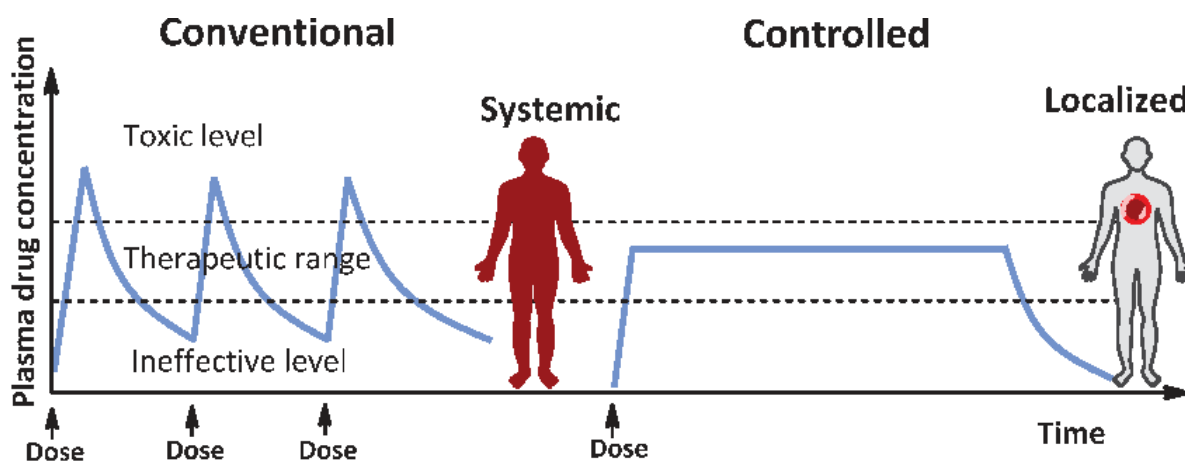
Na área da saúde, a nanotecnologia também está se destacando, principalmente na produção de nanomedicamentos que oferecem vantagens em relação aos medicamentos convencionais. Porém, a escolha dos materiais utilizados é feita de acordo com algumas características essenciais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, conjugação, encapsulamento etc. Um exemplo desses materiais é a quitosana (DIMER et al., 2013).

2.2 Liberação controlada de fármacos / Hidrogéis

Na terapia convencional medicamentosa a administração de um fármaco ocorre por meio de um tipo de forma farmacêutica seja ela líquida, sólida ou gasosa e que consiga chegar até o local de ação desejado, no qual o êxito do tratamento irá depender principalmente da quantidade de doses, horários específicos, adesão ao tratamento pelo paciente, de modo que, se não for seguido corretamente, o esquema terapêutico pode falhar ou pior, atingir níveis tóxicos e prejudiciais ao organismo (LIMA et al., 2010).

Diferente deste tipo de terapia a liberação controlada cresce cada vez mais, pois o seu objetivo é prolongar e melhorar o controle da administração, onde comparado aos outros tipos de dosagem, acaba tendo muitas vantagens como a constância de liberação na maioria do tempo de ação do fármaco, diminuição dos efeitos colaterais, maior tempo de permanência da droga, diminuição da toxicidade e a utilização de substâncias hidrofílicas e lipofílicas na administração medicamentosa (CASTRO; RODRIGUES, 2011; RODRIGUES, 2012).

Figura 1 – Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos tradicionais de multi dosagem e sistemas de liberação controlada.



O primeiro conceito de liberação controlada, teve início na década de 1930 na Inglaterra, mas só em 1970 ocorreu o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com taxas controladas para uso em seres humanos (LIMA et al., 2010). Para a indústria, um dos motivos essenciais para os investimentos nesse novo tipo de liberação e tecnologia é que esse novo setor possa gerar um alto retorno financeiro, até mesmo a longo prazo (HOLANDA et al., 2011).

Várias características são necessárias para que haja um sistema de distribuição de fármacos adequado e controlado, são elas a biocompatibilidade, a não alteração da atividade do fármaco na distribuição, o controle da taxa de distribuição e etc. Dessa forma, muitos materiais vêm sendo testados e utilizados, e um deles são os polímeros naturais, como a quitosana, que diferente dos polímeros sintéticos, a sua degradação é mediada por células de acordo com os mecanismos fisiológicos do organismo humano, além de minimizar reações teciduais, tem outros efeitos terapêuticos e ao mesmo tempo minimiza efeitos tóxicos (PATEL et al., 2012).

Um desses sistemas formados por esse polímero, são os hidrogéis, estruturas hidrofílicas, tridimensionais, cujo a formação é constituída por dois ou mais componentes. Em detrimento disso, sua estrutura pode dilatar e encolher, dependendo da presença ou ausência do solvente (KOPPOLU et al., 2014; AOUADA et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2009)

O campo de atuação dos hidrogéis é vasto e vai desde fraldas descartáveis até a agricultura, sendo utilizado como superabsorventes, biomateriais e substitutos do solo. Recentemente, devido a sua grande funcionalização, muitas indústrias utilizam os hidrogéis como sistemas de encapsulação de fármacos, para que seja funcional na liberação controlada de medicamentos. Historicamente a primeira utilização do hidrogéis como biomateriais foi na década de 60, constituídos de Metacrilato de Hidroxietilo (HEMA) (NOGUEIRA et al., 2009; MEDEIROS, 2011).

Entretanto há algumas limitações na liberação controlada dos hidrogéis. Embora sejam em alguns casos favoráveis na liberação de certas substâncias, o tamanho dos poros em sua estrutura e a alta quantidade de água absorvida por eles acarretam em uma liberação muito rápida (MOLINOS et al., 2012).

Já os nanogéis possuem um tamanho muito menor e respondem com facilidade a estímulos ambientais, além de conseguirem uma liberação simplesmente por difusão, o que é almejado quando se trata de um sistema de liberação controlada. Outra grande vantagem dos nanogéis se dá pela capacidade de serem absorvidos pelas células e chegar em locais do organismo humano que não são acessíveis pelos hidrogéis, sendo assim aspirantes ideais para serem administrados por via endovenosa (RAEMDONCK; DEMEESTER; SMEDT, 2009; MOLINOS et al., 2012).

2.3 Taupatias

As taupatias são doenças neurodegenerativas que podem ser ocasionadas por diversos fatores como pela hiperfosforilação da proteína Tau. Muitas evidências demonstram e indicam que a sinalização Wnt canônica é importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente na formação, regulação, função dos circuitos neuronais, formação precoce do eixo ântero-posterior, o crescimento e desenvolvimento neural em vertebrados, a regulação da estrutura e a função do sistema nervoso adulto (WAN et al., 2014).

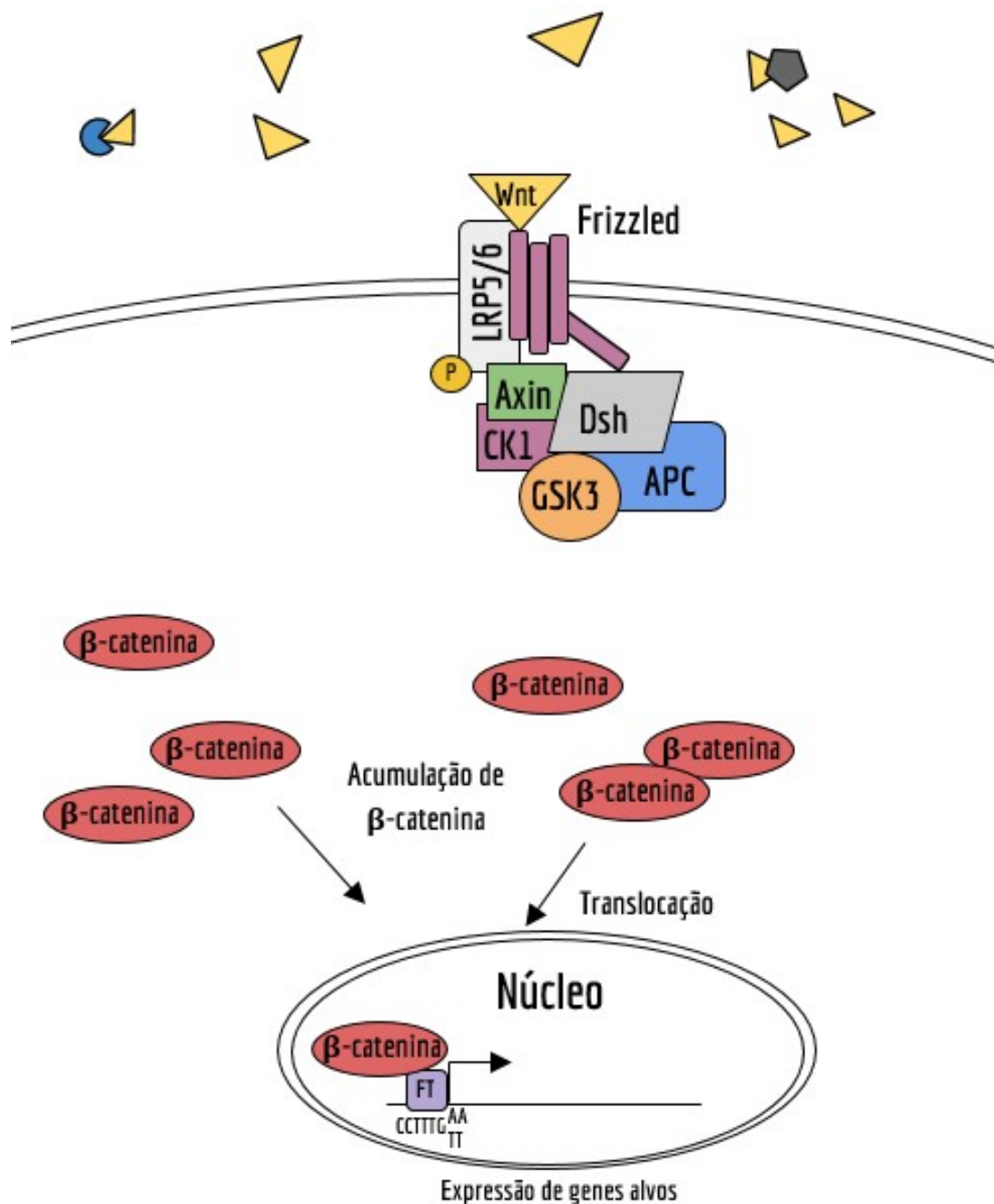
Sua ativação se dá por meio de uma ligação direta entre a glicoproteína Wnt e o receptor Frizzled (presente na membrana) e aos seus co-receptores LRP5 / 6 que pode ser visto na Figura 2. Essa interação gera um recrutamento da axina-GSK3 β para o plasma reduzindo assim a fosforilação da β -catenina, que se acumula no citoplasma e transloca-se para o núcleo, onde vai interagir com proteínas ligadas ao DNA e ativando a transcrição de genes alvo (IOZZI et al., 2012).

No núcleo a β -catenina vai regular a expressão gênica que a via de sinalização wnt atinge, esses alvos incluindo o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-), ciclina D-1, MITF (*Melanocyte Inducing Transcription Factor*) e FGF9 (*Fibroblast Growth Factor 9*) estão envolvidos no desenvolvimento de membros, tubo neural, cérebro anterior, mesencéfalo, cerebelo, na manutenção de neurotransmissão e plasticidade sináptica (WAN et al., 2014).

Desta forma, se ocorrer alguma disfunção na sinalização Wnt canônica mostrado na Figura 3, pode-se ocasionar diversas doenças humanas, desde câncer, osteoporose, esquizofrenia, autismo, transtornos de humor, epilepsia e doença de Alzheimer (WAN et al., 2014).

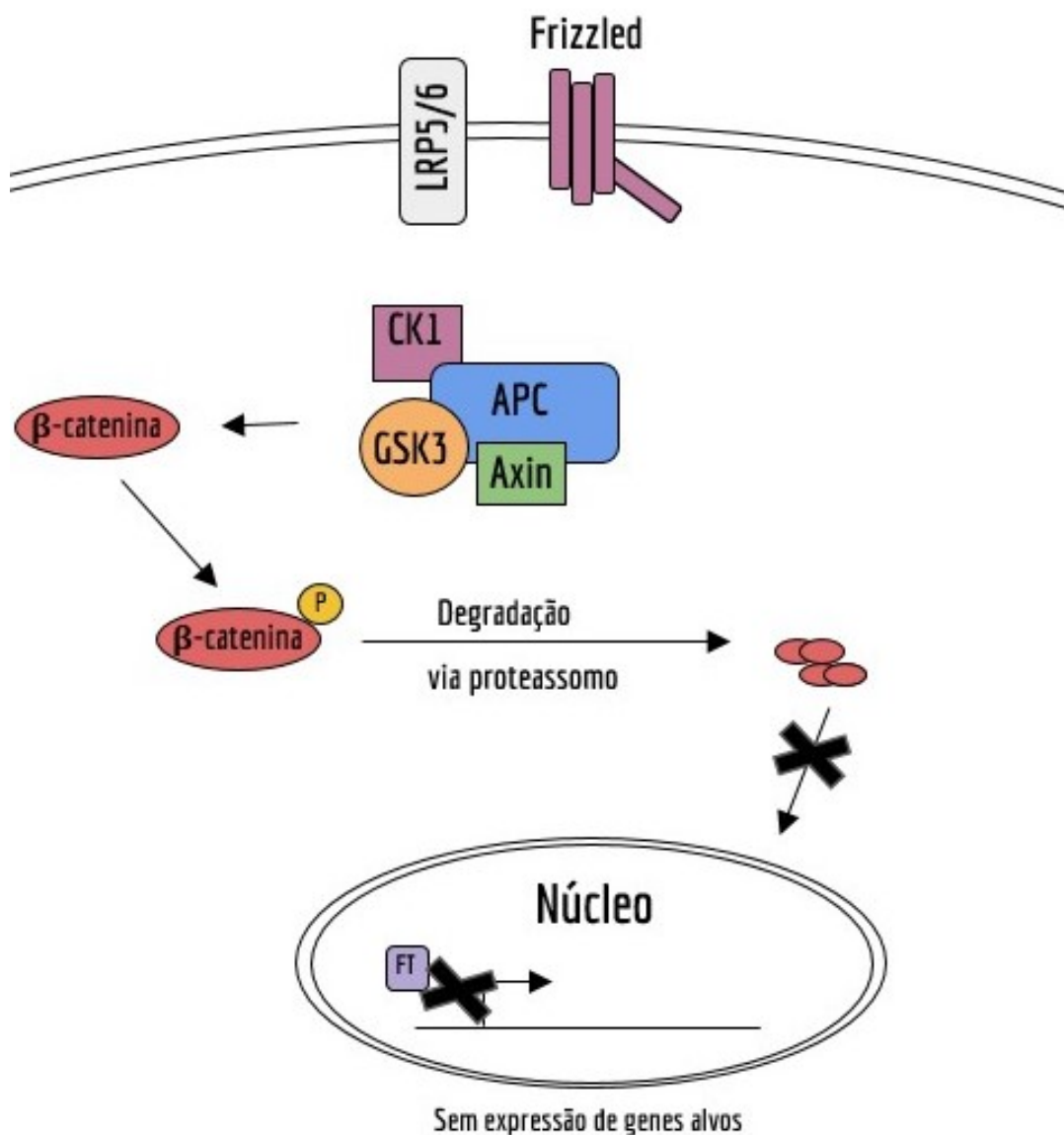
A Dkk1 é uma proteína que pertence à família Dickkopf (DKK) identificada como um potente inibidor da sinalização canônica de Wnt devido a sua capacidade de se ligar ao receptor Wnt LRP5 / 6, bloqueando a via canônica Wnt / β -catenina. O aumento da expressão da DKK1 em neurônios corticais expostos ao peptídeo β -amilóide (β -AP), é responsável pela hiperfosforilação da tau, mostrando-se neurotóxica em locais onde ocorre processos neurodegenerativos em doenças como isquemia cerebral e doença de Alzheimer (IOZZI et al., 2012).

Figura 2 – Sinalização Wnt canônica: inibição do complexo multiproteico (Ck1, APC, Axine, GSK3) aumentando a presença de β -catenina resultando na expressão dos genes alvos.



Rodrigues, Lucas Reis 2018. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Via_de_sinaliza%C3%A7%C3%A3o_Wnt> Acesso em out. 2019.

Figura 3 – Ausência da Sinalização Wnt: O complexo multiproteico (Ck1, APC, Axine, GSK3) marca a β -catenina para degradação, inibindo a expressão de genes alvos.



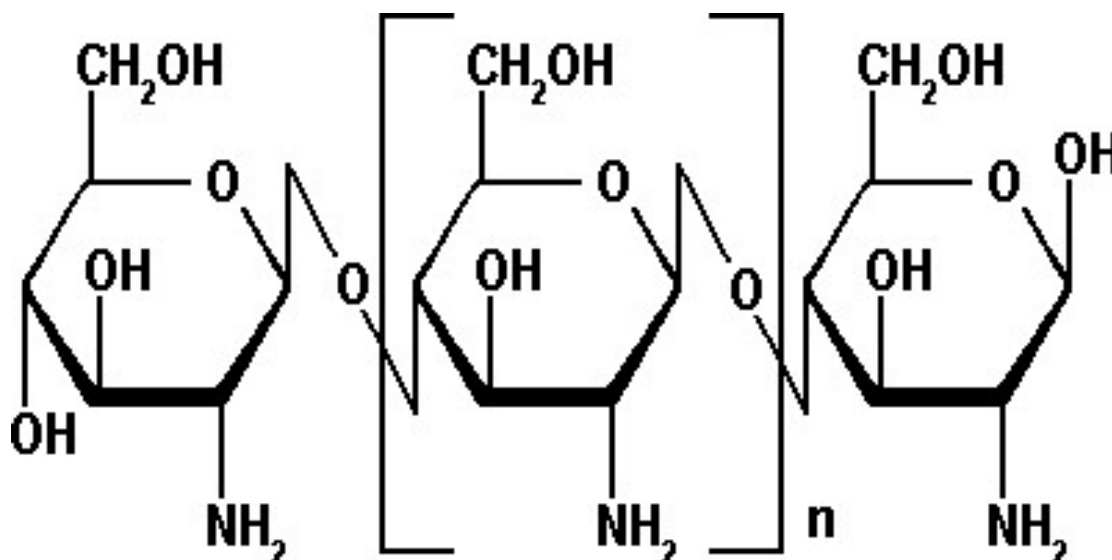
Rodrigues, Lucas Reis 2018. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Via_de_sinaliza%C3%A7%C3%A3o_Wnt> Acesso em out. 2019

2.4 Quitosana

A quitosana é quimicamente conhecida como β -[1→4]-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, é um polímero obtido através da desacetilação da quitina, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. Proveniente de organismos vivos como crustáceos, fungos e insetos, ela é um produto bio-sustentável, de origem natural, de

baixo custo para a sociedade, e biodegradável, o que gera uma grande importância para a economia e para o meio ambiente. (MENDES et al., 2011; FREDDO, 2009; CERQUEIRA et al., 2011).

Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana.



Murúg 2007. "Obra do próprio, Domínio público". Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Quitosana#/media/Ficheiro:Chitosan_Haworth.gif> Acesso em out. 2019

Com uma estrutura semelhante à da celulose, a quitosana consegue se diferenciar devido à presença de grupos amino (NH₂) em sua estrutura, sendo solúvel em meio ácido fraco, com propriedades diferenciadas em diversos aspectos (MENDES et al., 2011).

Uma de suas propriedades, é que a quitosana além de não ser tóxica, tem boa biocompatibilidade, não é antigênica, possui fatores antimicrobianos e a capacidade de ser homeostática. Outro ponto importante é que esse polímero consegue através do recrutamento de células inflamatórias, como macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) a aceleração da cicatrização de feridas. (MOURA et al., 2014).

Estudos revelam que a quitosana possui também diversas outras utilidades, como componente de ataduras e materiais odontológicos utilizados atualmente, além de ter grande eficácia no tratamento de hemorragias. É por isso que nos dias de hoje a indústria farmacêutica e os centros de pesquisa, têm tido um olhar inovador para a quitosana, principalmente na área de desenvolvimento de fármacos de liberação controlada (TAVARES, 2011).

Essas propriedades apresentadas por esse polímero, dependem essencialmente de sua massa molar aparente e do grau de desacetilação, pois são estes dois aspectos que irão definir o grau de solubilidade desse polissacarídeo quando em meio aquoso. Devido à sua capacidade de formar sais com ácidos orgânicos e inorgânicos por ser de caráter básico e seus grupamentos aminos presentes em sua estrutura se

tornarem protonados, ele acaba se tornando um polissacárido carregadamente positivo (TAVARES, 2011; ABREU et al., 2013).

Por possuir características mucoadesivas decorrente de sua capacidade de ficar carregada positivamente, a quitosana consegue ficar mais tempo no local de absorção do fármaco, não causando reações alérgicas e rejeição no organismo humano, gerando assim uma forma melhor de tratamento para diversos tipos de doenças e outras atividades terapêuticas (TAVARES, 2011; TORRES, 2018).

Dessa forma, diversos estudos e testes são realizados para que ocorram diversas modificações e funcionalização de sua estrutura química, criando um material com características físico-químicas para ser testado e utilizado em várias áreas de aplicação, como na nanotecnologia (TORRES, 2018).

E para ser utilizada em processos de nanoestruturas, a quitosana deve conter um índice de desacetilação maior que 80%, o que demonstra um grau de pureza e biocompatibilidade, no qual a formação de nanocápsulas com formas e tamanhos homogêneos irá depender da viscosidade apresentada pela solução de quitosana a 1% em ácido acético (FREDDO, 2009).

2.5 Galocianina

Historicamente a galocianina é descrita na literatura como um corante utilizado na coloração nuclear de caráter básico sintético, proveniente da classe de oxazinos. Mais especificamente, ela é um derivado do cloreto de fenoxazonio, que possui diversas vantagens, principalmente por ser um material encontrado em produtos naturais e moléculas bioativas que possuem diversas atividades biológicas (BOURNE; DANIELLI, 1976; MPOUSIS et al., 2016).

Figura 5 – Estrutura molecular da galocianina.



Com a sua obtenção feita a partir da condensação do ácido gálico (um polifenol) e N, N-dimetil-p-nitrosoanilina e sendo o mais simples desses derivados, a galocianina conseguiu uma importância significativa entre eles, principalmente porque recentemente foi-se descoberto que ela é a única molécula com capacidade de inibir a interação existente entre a proteína Dkk1 e o receptor Lrp5 / 6 (MPOUSIS et al., 2016)

A via Wnt é descrita por muitos autores como uma via de grande importância na fase do desenvolvimento de invertebrados e vertebrados e no equilíbrio da homeostase do tecido adulto. Dessa forma a galocianina pode ser utilizada como um meio de tratamento ósseo e de desordens neurodegenerativas, tendo como potencial alvo a interação entre a DKK1 e o receptor de Wnt Lrp5 / 6 (IOZZI et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento de ocorrência das doenças neurodegenerativas aumentou-se também o interesse no estudo das mesmas, possuindo como característica a diminuição de células em certas populações neuronais. Essas alterações no número de células acabam ocasionando uma série de distúrbios e diferentes tipos de doenças, como o Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Desta forma, com o baixo êxito no tratamento dessas doenças, seja por fármacos ou formas farmacêuticas, o presente estudo visa a criação de um sistema de liberação controlada acoplado com galocianina, para que seja capaz de atravessar tecidos e permanecer por mais tempo no organismo, diminuindo possíveis efeitos adversos e a quantidade de fármaco utilizado (MEDEIROS, 2011).

4 OBJETIVOS

O objetivo deste presente trabalho é a síntese e a caracterização do nanogel de quitosana para liberação controlada de galocianina.

4.1 Objetivos específicos

- Síntese do nanogel de quitosana contendo galocianina.
- Avaliar o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.
- Avaliar o perfil de liberação do nanogel, mediante a estimulação de sua liberação por meio de diferentes tipos de tampões.
- Quantificação da eficiência de encapsulamento.
- Avaliar os aspectos topográficos por meio de microscopia eletrônica de varredura.

5 METODOLOGIA

5.1 Pesquisa de protocolos e levantamento bibliográfico

A revisão da bibliografia foi realizada por intermédio de consultas a artigos científicos, teses e dissertações entre os anos de 2009 e 2019, nas bases de dados: SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*), PubMed, LILACS, (*Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*) e MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line*). Além disso, pesquisou-se relatórios técnicos e livros no motor de busca do Google Acadêmico para a produção da revisão sistemática.

Foram utilizados as seguintes palavras-chaves nas línguas portuguesa e inglesa e suas combinações correspondentes: “*gallocyanine*”, *Gallocyanin*”, “*Fast Violet*”, *Mordant blue 10*” e “*Solid Violet*”. Como critério de inclusão para a seleção dos artigos, utilizou-se: artigos em língua portuguesa, inglesa e espanhola, disponibilidade de texto completo em suporte eletrônico, publicados em periódicos nacionais e internacionais. Dos textos obtidos, excluiu-se aqueles que não se vincularem diretamente ao tema os repetidos por sobreposição de palavras-chave. Em contrapartida, como critérios de exclusão, definiu-se os artigos elencados anteriormente ao período de 9 anos, com exceção daqueles usados para embasamento histórico, sendo excluídos aqueles que não correspondiam aos objetos de estudo já citados. Utilizando a metodologia apoiada em big data, foi realizada mineração dos dados sobre os principais trabalhos que referiam-se ao corante galocianina obtidos nas plataformas de pesquisa listadas acima construindo um arquivo único com os descritores. Nesse caso entende-se por dados os textos das palavras chaves e títulos. Após esta etapa utilizando o software VOS Viewer, construiu-se um mapa de densidade bibliométrico, como resultado desta mineração de dados.

5.2 Seleção e montagem dos protocolos experimentais

Após o levantamento bibliográfico, a pesquisa de protocolos e a análise das metodologias que se enquadrariam melhor para esse trabalho, foram determinados os procedimentos necessários para toda a pesquisa.

5.3 Produção do nanogel de quitosana/galocianina

Para a produção do nanogel, utilizou-se como referência a metodologia presente no artigo “*Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potente anti-angiogenesis in tumor*” (JIN et al., 2016).

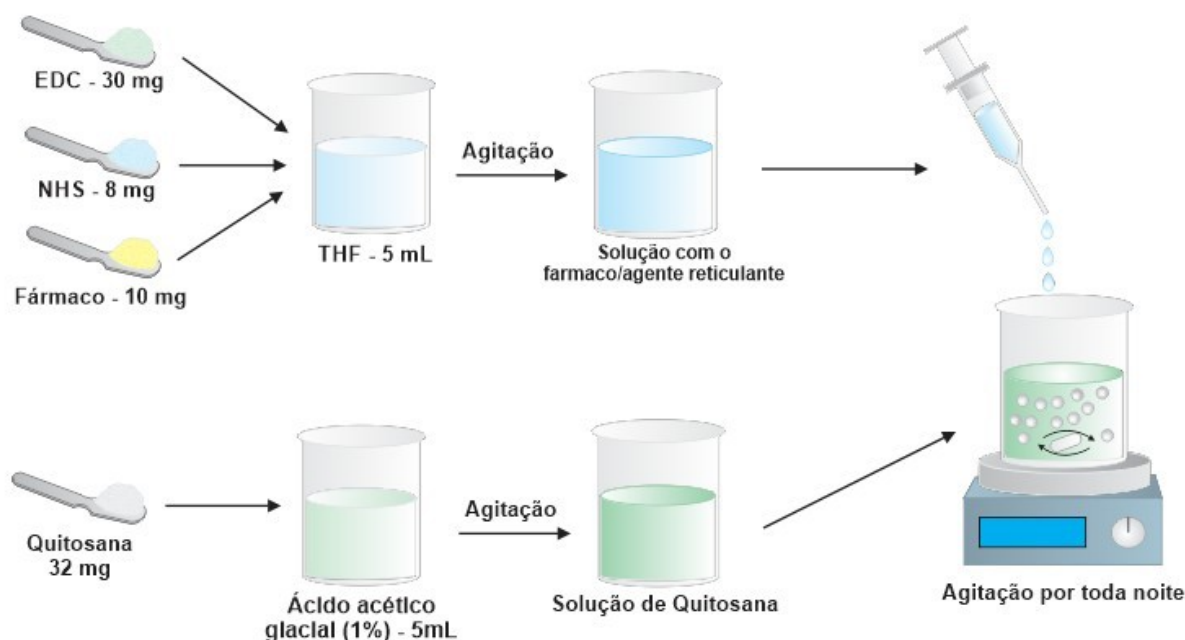
Com isso, estabelecemos que para a produção do nanogel seria necessário 32 mg de quitosana dissolvidos em 5 ml de ácido acético glacial a 1% (v/v) (solu-

ção 1); 10 mg de galocianina previamente diluída em 200 microlitros de água destilada, 30 mg de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e 8 mg de NHS (N-hidroxissuccinimida) dissolvidos em 5 mL de THF (tetrahydrofurano) (solução 2).

Dessa forma: Dissolveu-se 31,9 mg de quitosana em 5 mL de ácido acético glacial a 1% (v/v) (**solução 1**); dissolveu-se 30,1 mg de EDC, 9 mg de NHS e solução de galocianina (10 mg de galocianina dissolvida em 200 microlitros de água) em 5 ml de THF (**solução 2**);

Adicionou-se a solução 1 na solução 2 sob agitação magnética, deixando-se sob por aproximadamente 36 horas.

Figura 6 – Processo de Produção do nanogel de quitosana-galocianina.



Grupo de Pesquisa Fotonanobio, 2016

5.4 Análise de tamanho, polidispersão e potencial zeta do nanogel de quitosana-galocianina

A Análise de tamanho, polidispersão e potencial zeta do nanogel de quitosana-galocianina em solução preparada, foi determinada por intermédio da técnica de espalhamento dinâmico de luz juntamente com a técnica de laser doppler velocimetria associada à microeletroforese respectivamente, de modo que antes do processo de centrifugação, diluiu-se 25 microlitros da solução contendo o nanogel em 975 microlitros de água destilada em uma cubeta, a qual foi posta no equipamento zetasizer (Malvern) para ser analisado à uma temperatura de 25°C.

5.5 Processo de centrifugação do nanogel

Ao final do processo de agitação, separou-se a solução em 4 microtubos com volumes iguais e colocou-se para centrifugar por 25 minutos à 14000 rpm. Em seguida retirou-se e guardou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 microlitros de uma solução crioprotetora a base de sacarose a 0,5% e congelou-se.

5.6 Secagem do nanogel

Após o congelamento do nanogel, a secagem foi feita por meio de liofilização no qual utilizou-se o Liofilizador L101 da Liotop®. Com aproximadamente 12 horas de secagem retirou-se as amostras e começou-se as análises.

5.7 Microscopia eletrônica de varredura.

Com o nanogel pronto e seco, colocou-se uma pequena porção direto na fita de carbono e metalizou-se com 50 nm de ouro de cobertura. Após esse processo, inseriu-se na laminula e no Stub e fez-se a varredura.

5.8 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento do nanogel de quitosana-galocianina foi obtida mediante a solução estoque de galocianina e do volume do sobrenadante da amostra preparada. Assim sendo, retirou-se 100 microlitros da solução estoque de galocianina e do sobrenadante e adicionou 3 ml de água purificada, para em seguida fazer a leitura da absorbância de cada uma das soluções em espectrofotômetro UV para $\lambda = 550$ nm. Por meio do valor de absorbância encontrado, utilizou-se a lei de Lambert-Beer " $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ " para encontrar a concentração de galocianina na cubeta.

O valor de absorbância encontrado para a solução estoque de galocianina foi de 0,7 tendo o ϵ no valor de 6.600 e a cubeta no valor de 1 e de 0,6 para o sobrenadante. Encontrado a concentração de galocianina presente em cada cubeta, aplicou-se a equação abaixo para determinar a concentração de galocianina que foi encapsulada no nanogel.

A eficiência de encapsulamento foi então medida pela seguinte equação:

$$CE\% = \frac{\text{Con. de galocianina inicial} - \text{Con. de galocianina no sobrenadante}}$$

5.9 Perfil de liberação *in vitro*

A liberação controlada da galocianina foi avaliada por meio de estudos de liberação *in vitro* a partir do nanogel sintetizado, no qual pesou-se 0,0001 grama e diluiu-se em 2 ml de tampão fosfato pH 1,0, 7,4 e 10,0. As soluções formadas foram colocadas em cubetas e levadas para o Espectrofotômetro UV-visível Hitachi U-3900 para a determinação da galocianina liberada a 550 nm em intervalos de tempo selecionados. Essa análise reológica foi realizada primeiramente de 60 em 60 segundos por 2 horas e depois de 100 em 100 segundos por mais 2 horas observadas por aproximadamente 7 dias . As medidas foram feitas até que a liberação do composto agisse de uma forma contínua ou que o nanogel se agregasse.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

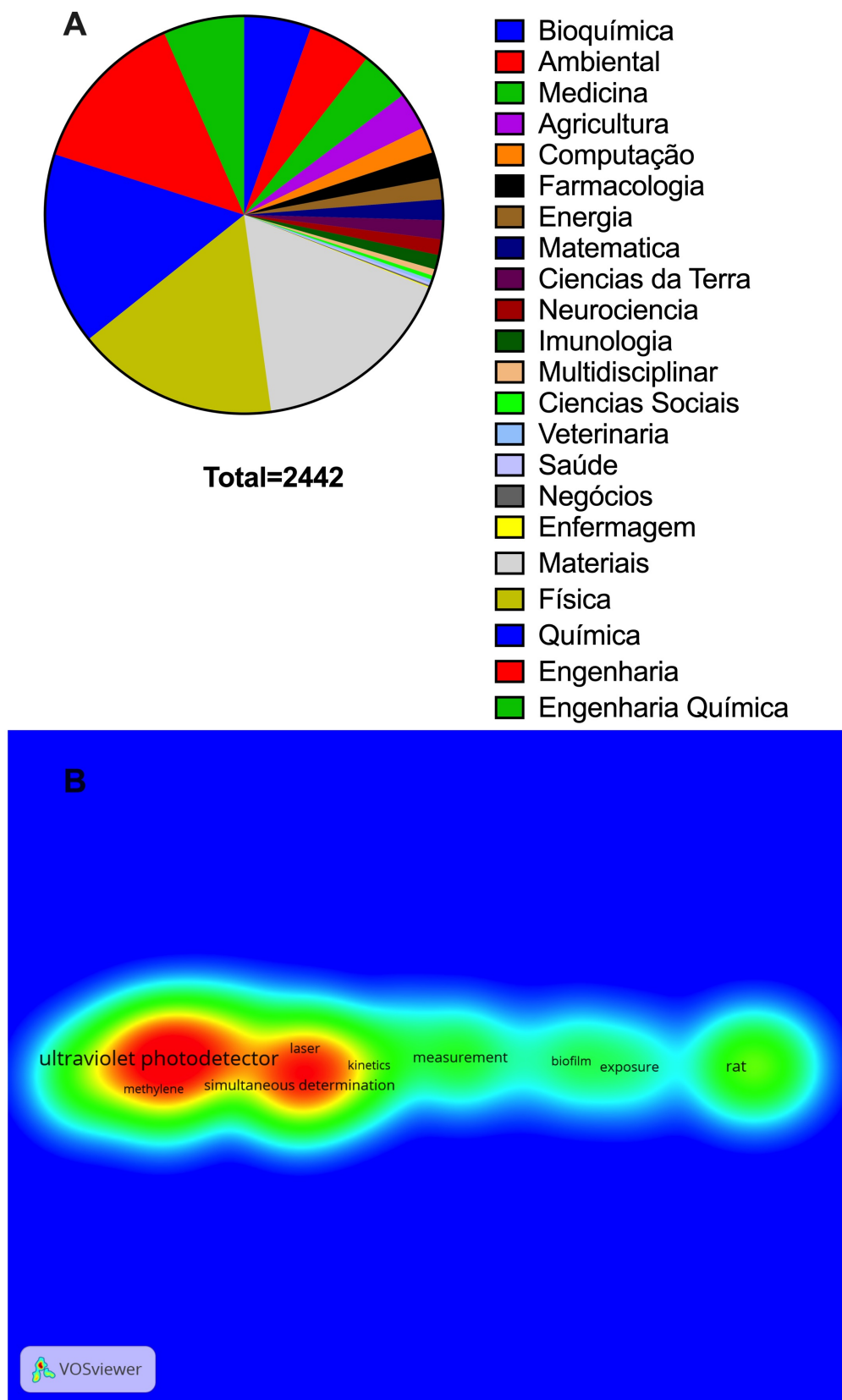
Revisão Bibliográfica

Os resultados obtidos da revisão da literatura que foram feitos com a base de dados Scopus Preview, possibilitou a construção de gráficos ilustrando a área de conhecimento e de densidade por meio da ferramenta VOSviewer (ZHANG et al., 2017; KUANG; HONG; ZENG, 2016; WATAD et al., 2017).

As palavras chaves que coincidiram entre a maior parte dos artigos nesta pesquisa, foram: “fotodetector de UV-vis”, “laser”, “TiO₂”, “medida”, “biofilme” e “rato”.

Na criação do mapa de densidade com todas as palavras chaves, ou seja, incluindo além dos termos definidos pelos autores das publicações e os do index, obteve-se um resultado mais representativo. Este mapa agrupou um número mínimo de 3 ocorrências de cada palavra chave num universo de 3949 termos das publicações selecionadas. Para cada uma das 202, as densidades dos links de co-ocorrência com outras palavras-chave foi calculado e as com maior densidade de link total foram selecionadas e apresentadas na figura XXX (ECK; WALTMAN, 2010).

Figura 7 – A) gráfico indicando as principais áreas do conhecimento; B) mapa de densidade de co-relação entre os termos.



Síntese do Nanogel

Durante o percurso da produção do nanogel, quatro preparações foram produzidas, porém somente a quarta produção se mostrou eficiente para o início das análises que foram avaliadas a partir de 5 parâmetros:

- 1) Tamanho e índice de polidispersão
- 2) Potencial zeta
- 3) Perfil de liberação
- 4) Eficiência de encapsulamento
- 5) Morfologia externa por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação dos parâmetros se iniciaram imediatamente após a liofilização das amostras.

Tamanho e índice de polidispersão

As medidas obtidas do tamanho do nanogel em solução nos mostrou que houve a formação de duas populações, uma com 948,8 nm com intensidade de 97% e outra com 5164 nm com intensidade de 3%, diferentemente do nanogel enxuto que se mostrou menor, perfeitamente compatível com o tipo de estrutura desejável. Esse aumento de tamanho em solução acontece pelo simples fato de que o polímero utilizado possui grande afinidade com a água, o que acaba acarretando no entumescimento do nanogel e no aumento do seu tamanho. A literatura narra que nanomateriais são estruturas com tamanhos que variam na faixa de 10 e 1000 nm, dessa forma mesmo com a variação de tamanho em diferentes meios, seja por estarem em solução ou não, eles continuam dentro do padrão de um nanomaterial (FIGUEIRAS; MIRANDA, 2014).

O índice de polidispersão foi de 0,368 conforme observado na tabela 1, referindo-se ao grau de homogeneidade da amostra. Isso revela que dependendo da via de administração o valor encontrado pode ser aceito, mesmo que valores menores que 0,300 sejam mais adequados. Estudos comprovam que quanto menor o valor do índice de polidispersão maior será a homogeneidade do diâmetro das partículas e que quanto maior o valor, menor será a homogeneidade, permitindo-se saber se o sistema estudado é mono ou polidisperso (NEMEN; LEMOS-SENNÁ, 2011).

Tabela 1 – Tamanho e índice de polidispersão do nanogel de quitosana-galocianina.

FATORES GERAIS

FATORES GERAIS**Z- Avarage (d.nm):** 784,8**Pdl:** 0,368**Intercept:** 0,930**Qualidade dos resultados:** Excelente

Potencial zeta

O potencial zeta define-se pela energia eletrostática que há entre as camadas que rodeiam uma partícula, ou seja, é a carga eletrostática superficial presente. Sua determinação é fundamental, visto que seu valor consegue revelar se as partículas produzidas possuem certa estabilidade, indicando o grau de repulsão entre as mesmas. Autores afirmam que partículas pequenas com grandes valores de potencial zeta resistem a agregação e indicam elevada capacidade de dispersão em água, enquanto que valores mais baixos é um parâmetro de baixa estabilidade, dado que a capacidade de atração entre as partículas é muito maior do que sua capacidade de repulsão ocasionando-se na agregação entre elas (MAYORAL; CUADROS MORENO; MARTÍN MARTÍNEZ, 2014; LENGOWSKI, 2016).

O potencial zeta do nanogel de quitosana-galocianina foi de 68,3 mV, demonstrando assim, um elevado grau de estabilidade, no qual os valores acima de $\pm 30,0$ mV acarretam em produções mais estáveis e valores de $\pm 15,0$ mV é considerando o valor limite para que aconteça agregação entre as partículas (LENGOWSKI, 2016).

Perfil de Liberação *in vitro*

O perfil de liberação comprova os diversos aspectos comportamentais dos nanocompostos em diferentes pHs, mimetizando uma possível liberação em diferentes partes do organismo humano, que apresentam distintos valores de pH. A avaliação da cinética de liberação do nanogel é de extrema importância, visto que sua liberação pode acontecer pela degradação da matriz do nanogel ou por difusão gradativa da matriz, isso através de uma estimulação que pode ser química ou física, bem como mudanças no pH, temperatura e força iônica (HERCULANO, 2014).

A vantagem de se caracterizar e produzir um nanogel como um sistema de liberação controlada, é que ele proporciona uma baixa na frequência de doses, bem como a diminuição de efeitos adversos e desconfortos, ocasionados por medicamentos produzidos em outras formas farmacêuticas sejam comprimidos, xaropes, pastilhas entre outros que são de uso convencional e passam pelo metabolismo de primeira passagem (RIBEIRO, 2016).

O nanogel de quitosana-galocianina foi submetido a uma avaliação de liberação do composto, determinado por meio de valores de absorbância medidos por Espectrofotometria Uv-visível.

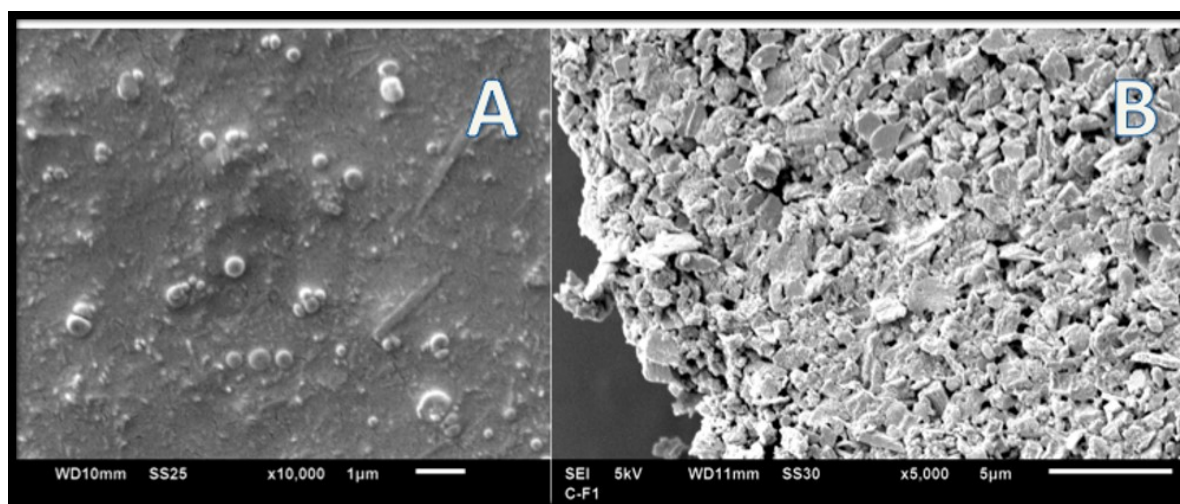
Em pH 1 que simula a acidez estomacal não ocorreu uma liberação significativa da galocianina. Porém, em pH 7,4 que simula o pH sanguíneo a liberação foi de grande relevância percebendo-se uma alta concentração de galocianina sendo liberada e uma constância durante o período de tempo avaliado. Já em pH 10 que simula o pH intestinal também não houve uma liberação significativa.

Isso ocorre, porque em pH 1 e 10 o polímero tenta proteger o composto e começa a se agregar impedindo sua liberação. Já em pH 7,4 a quebra de ligações entre a quitosana e a galocianina favorece a liberação do composto. Evidenciando que o nanogel de quitosana-galocianina possui excelente viabilidade para ser administrado por via endovenosa (HERCULANO, 2014).

Eficiência de encapsulamento

Através da lei de Lambert-Beer " $A = e b c$ ", obteve-se a concentração da solução estoque de galocianina que foi de 0,000106 mol e do sobrenadante que foi de 0,00009 mol. Diante disso, conseguimos calcular a concentração de galocianina encapsulada que foi de 0,000016, revelando que somente 15% do total de galocianina utilizado na preparação foi encapsulado.

Não há descrições na literatura sobre a eficiência de encapsulamento da galocianina em nanogéis, igualmente em nanogéis de quitosana. Contudo, essa baixa eficiência de encapsulamento era de se esperar, levando em conta que o composto utilizado é bastante solúvel em água e o sistema criado não possui nenhum tipo de otimização que favoreça a adesão do composto no interior do nanogel de quitosana.

Morfologia externa por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**Figura 8 – Morfologia da amostra do nanogel de quitosana-galocianina: A) Nanogel na ausência de sobrenadante; B) Nanogel liofilizado.**

A microscopia eletrônica de varredura é fundamental em várias áreas da nanociência, sua utilização é indispensável porque fornece informações detalhadas dos nanomateriais através de aumentos de até 300.000 vezes (COSTA, 2006).

A figura 8 mostra a morfologia do nanogel de quitosana-galocianina obtida por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura. A figura 8A refere-se a análise do nanogel após a retirada do sobrenadante, assim sendo, podemos observar que há diferentes tamanhos do nanogel sintetizado, porém nenhum deles ultrapassa 500 nm. Percebe-se também, que a maioria dos nanogéis é menor que 200 nm, nos mostrando uma certa homogeneidade nas amostras, todavia com uma baixa aproximação, em detrimento do derretimento das amostras menores ocasionados pelo feixe de elétrons. Possui uma boa dispersão entre elas, o que nos garante que não haverá agregação entre as mesmas. Já a figura 8B observa-se a imagem do nanogel liofilizado, revelando sua superfície e demonstrando que sua estrutura se baseia na formação de um filme constituído pelo polímero de quitosana.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia escolhida e utilizada para a síntese do nanogel foi eficaz. Visto que de acordo com a literatura todos os parâmetros utilizados para avaliação do sistema criado foram de grande excelência.

O nanogel sintetizado foi capaz de acoplar a galocianina em seu interior, embora as características físico-químicas da galocianina favoreçam sua solubilização em água e cause uma baixa eficiência de encapsulamento. Toda via, não existem trabalhos descritos a respeito do acoplamento da galocianina e da sua taxa de encapsulação, o que presume que ainda assim é algo auspicioso para novos estudos e técnicas de otimização para que haja um aumento dessa taxa.

Com relação a distribuição do tamanho, os resultados confirmam que o nanogel entumecido é em escala nano, determinado por intermédio de uma solução aquosa, evidenciando o diâmetro e as propriedades físico-químicas de um nanomaterial. O índice de polidispersão encontrado apontou que o sistema é polidisperso, tendo a carga superficial maior que 30, comprovando ser um material estável para diversos testes.

O perfil de liberação *in vitro* assegurou que o melhor meio para a liberação do composto é em pH 7.4, tendo uma constância na liberação da galocianina, indicando que pode ser administrada por via endovenosa, visto que o sangue possui o mesmo pH, diferentemente dos pHs 1 e 10 respectivamente que impediram a liberação do composto.

A microscopia eletrônica de varredura determinou que o nanogel não passa de 500 nm, possui homogeneidade em relação aos tamanhos e sua superfície após a liofilização é caracterizada por um filme constituído pelo polímero de quitosana, ou seja, o próprio nanogel.

Desse modo, em virtude dos resultados obtidos, pode-se considerar que o nanogel de quitosana-galocianina é um sistema promissor de liberação controlada. A utilização de técnicas para otimização do encapsulamento, juntamente com mais testes de estabilidade e a viabilidade em células neuronais, pode melhorar sua síntese para futuramente ser testado em seres humanos e ser gerada uma nova forma de tratamento para tauopatias.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. et al. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Associação Brasileira de Polímeros, v. 23, n. 5, p. 630 – 635, 2013.
- AOUADA, F. A. et al. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. In: **Embrapa Instrumentação - Artigo em anais de congresso (ALICE)**. [S.l.: s.n.], 2009.
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. D.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 06, p. 1 – 09, agosto 2006.
- BARIL, M. B. et al. NANOTECNOLOGIA APLICADA AOS COSMÉTICOS
NANOTECHNOLOGY APPLIED TO COSMETICS.
- BOURNE, G. H.; DANIELLI, J. F. **International Review of Cytology**. 44. ed. [S.l.]: New York: Academic Press, 1976.
- CAETANO, R. C. Grafeno: características, propriedades e aplicações. 2017.
- CASTRO, G. V. de; RODRIGUES, T. Estudo espectroscópico de corantes fenazínicos: aspectos fotoquímicos e radicalares. In: **I Encontro de Iniciação Científica-2011 (ENCERRADO)**. [S.l.: s.n.], 2011.
- CERQUEIRA, T. S. et al. Recobrimento de goiabas com filmes proteicos e de quitosana. **Bragantia**, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, v. 70, n. 1, p. 216 – 221, 2011.
- COSTA, A. C. F. M. et al. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. **Cerâmica**, v. 52, n. 324, p. 255 – 259, Agosto 2006.
- DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 36, n. 10,(2013), p. 1520-1526**, 2013.
- ECK, N. J. V.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, p. 523 – 538, 2010.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. do C. Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis. **Química Nova**, SciELO Brasil, v. 32, n. 7, p. 1860 – 1870, 2009.
- FIGUEIRAS, A. R.; MIRANDA, A. Aplicações da nanotecnologia em doenças do foro neurológico: vantagens e desafios. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 4, 2014.
- FREDDO, R. J. Estudos para obtenção e caracterização de sistemas nanoparticulados contendo ácido valpróico e avaliação da penetração deste através da barreira hematoencefálica. 2009.

GOMES, A. J. et al. Photobiological and ultrastructural studies of nanoparticles of poly (lactic-co-glycolic acid)-containing bacteriochlorophyll-a as a photosensitizer useful for PDT treatment. **Drug Delivery**, Taylor & Francis, v. 12, n. 3, p. 159 – 164, 2005.

HERCULANO, R. D. et al. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 01, p. 89 – 95, Maio 2014.

HOLANDA, A. L. de et al. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. Universidade Federal de Campina Grande, 2011.

IOZZI, S. et al. Functional characterization of a small-molecule inhibitor of the DKK1-LRP6 interaction. **ISRN molecular biology**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.

JIN, J. P. H. et al. Ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles induce potent anti-angiogenesis in tumor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6643 – 6652, February 2016.

KABANOV, A. V.; VINOGRADOV, S. V. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. **Angewandte Chemie International Edition**, Wiley Online Library, v. 48, n. 30, p. 5418 – 5429, 2009.

KOPPOLU, B. prasanth et al. Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery. **Biomaterials**, v. 35, n. 14, p. 4382 – 4389, 5 2014. ISSN 0142-9612. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975584/>.

KUANG, Y.; HONG, M.; ZENG, J. Big data research analysis based on bibliometrics. **Hans Journal of Data Mining**, v. 6, n. 3, p. 125 – 137, 2016.

LARANJEIRA, M. C.; FÁVERE, V. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672 – 678, 2009.

LENGOWSKI, E. C. **Formação e caracterização de filmes com nanocelulose**. 2016. 226 p. Tese (Engenharia Florestal) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

LIMA, R. S. C. et al. Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana/insulina. Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

MARTINS, P. Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável. **Estudios sociales (Hermosillo, Son.)**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC, v. 17, n. 34, p. 293 – 311, 2009.

MAYORAL, J. B.; CUADROS MORENO, A.; MARTÍN MARTÍNEZ, E. S. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Latin-American Journal of Physics Education**, Instituto Politécnico Nacional, v. 8, n. 4, 2014.

MEDEIROS, K. A. de. Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais. 2011.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831 – 840, 2011.

- MOLINOS, M. et al. Development of a hybrid dextrin hydrogel encapsulating dextrin nanogel as protein delivery system. **Biomacromolecules**, ACS Publications, v. 13, n. 2, p. 517 – 527, 2012.
- MOREIRA, J. R. L. A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama. 2014.
- MOURA, L. I. et al. Chitosan-based dressings loaded with neurotensin\textemdashan efficient strategy to improve early diabetic wound healing. **Acta biomaterialia**, Elsevier, v. 10, n. 2, p. 843 – 857, 2014.
- MPOUSIS, S. et al. Synthesis and evaluation of gallocyanine dyes as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. **European journal of medicinal chemistry**, Elsevier, v. 108, p. 28 – 38, 2016.
- NATH, D.; BANERJEE, P. Green nanotechnology-a new hope for medical biology. **Environmental toxicology and pharmacology**, Elsevier, v. 36, n. 3, p. 997 – 1014, 2013.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408 – 413, 2011.
- NOGUEIRA, G. M. et al. Hidrogéis e filmes de fibroína de seda para fabricação ou recobrimento de biomateriais. [sn], 2009.
- PATEL, D. D. et al. Preparation and evaluation of Levosalbutamol sulphate chitosan microsphere for the treatment of asthma. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, Medknow Publications & Media Pvt Ltd, v. 4, n. Suppl 1, p. S46 – S47, 3 2012. ISSN 0976-4879. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467846/>.
- PINHEIRO, W. M.; GOMES, C. N. L. **Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia, baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e nanopartículas de ouro associada a doxorubicina**. 2016. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/19149>.
- RAEMDONCK, K.; DEMEESTER, J.; SMEDT, S. D. Advanced nanogel engineering for drug delivery. **Soft Matter**, Royal Society of Chemistry, v. 5, n. 4, p. 707 – 715, 2009.
- RIBEIRO, S. D. **Obtenção de triacetato de celulose a partir do bagaço de cana-deaçúcar para revestimento de micropartículas de goma gelana e avaliação do seu perfil de liberação in vitro e da mucoadesão ex vivo**. 2016. 103 p. Tese (Programa de Pós-graduação em Química) — Universidade Federal de Uberlândia.
- RODRIGUES, N. O. L. Estudo da Liberação Controlada de Fármacos por Hidrogéis de PVA/Atapulgota. **Projeto de graduação**, 2012.
- ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, v. 60, n. 2, p. 54 – 57, 2008.

SONI, G.; YADAV, K. S. Nanogels as potential nanomedicine carrier for treatment of cancer: A mini review of the state of the art. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Elsevier, v. 24, n. 2, p. 133 – 139, 2016.

STENRAM, U. The specificity of the gallocyanin-chromalum stain for nucleic acids as studied by the ribonuclease technique. **Experimental Cell Research**, Elsevier, v. 4, n. 2, p. 338 – 389, 1953.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 56 p. Dissertação (Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

TAVARIA, F. K. et al. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, SciELO Brasil, v. 29, n. 1, p. 110 – 120, 2013.

TORRES, K. G. **Desenvolvimento de nanogel de quitosana ligada ao ácido diidrocafeico para encapsulação do óleo essencial de *Matricaria recutita***. 2018.

WAN, W. et al. The role of Wnt signaling in the development of Alzheimer's disease: a potential therapeutic target? **BioMed research international**, Hindawi, v. 2014, 2014.

WATAD, A. et al. Is autoimmunology a discipline of its own? A big data-based bibliometric and scientometric analyses. **Autoimmunity**, v. 50, n. 4, p. 269 – 274, 2017.

YADAV, H.; HALABI, N. A. A.; ALSALLOUM, G. A. Nanogels as novel drug delivery systems-a review. **J. Pharm. Pharm. Res**, v. 1, n. 5, 2017.

ZHANG, W. et al. Big data analysis of global advances in pharmaceuticals and drug delivery 1980–2014. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1201 – 1208, 2017.