

31. Saúde Humana

Estratégias associadas como uma nova perspectiva no combate a células tumorais

Natália Noronha Ferreira¹; Fátima Baltazar²; Maria Palmira DaflonGremião¹

noronhanat@hotmail.com; fbaltazar@med.uminho.pt; pgremiao@fcfar.unesp.br

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho –UNESP” Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

²Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho; ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

Resumo

Glioblastomas (GBM) representam cerca de 80% dos tumores malignos que acometem o sistema nervoso central (SNC) e, ainda hoje, possuem um prognóstico muito limitado. A existência de barreiras fisiológicas, especialmente barreira hematoencefálica (BBB), representa o principal obstáculo que limita a passagem de concentrações adequadas de muitos fármacos destinados ao seu combate. Por suas vantagens anatômicas, uma estratégia proposta para o fornecimento de agentes terapêuticos para o SNC consiste no uso da via nasal de administração, uma vez que ela evita a passagem pela BBB permitindo que o fármaco atinja o parênquima cerebral através de canais perineurais. Entretanto, essa via embora promissora, possui algumas características que podem limitar o tempo de residência das formulações na mucosa impedindo que o fármaco alcance o tecido alvo. Do ponto de vista farmacotécnico e tecnológico, a nanotecnologia pode proporcionar ferramentas capazes de contornar tais limitações. Além deste aspecto, o entendimento do comportamento molecular das células tumorais altamente agressivas e adaptáveis sugere que a terapêutica desta patologia deve englobar a abordagem de alvos múltiplos, minimizando assim, a adaptação e resistência. Portanto, a nanotecnologia é capaz de integrar essas lacunas fornecendo ferramentas que poderão proporcionar a entrega seletiva de fármacos, facilitar sua internalização ou ainda, conferir a liberação do agente terapêutico no alvo intracelular. Neste sentido, este trabalho propõe o design racional de nanopartículas poliméricas multifuncionais para a administração nasal de diferentes agentes terapêuticos criando assim uma nova perspectiva no combate a células tumorais.

Palavras Chave: glioblastoma, nanopartículas, via nasal para a administração de fármacos.

Introdução

Os tumores cerebrais representam uma das principais causas de morte relacionada ao câncer. A incidência de tumores primários aumenta com a idade, atingindo um percentual máximo entre 75 e 84 anos [1]. Glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral mais frequentemente diagnosticado, mais agressivo, altamente invasivo e resistente à quimioterapia, dentre os que acometem o sistema nervoso central [2]. Diferente dos demais tumores malignos, GBM possuem características únicas que irão em conjunto, resultar em seu mau prognóstico. Esses tumores apresentam alta taxa de células dormentes com forte resistência às radioterapias e quimioterapias convencionais. Por outro lado, a dificuldade de diferenciar estruturas cerebrais normais e tumorais, muitas vezes dificulta uma intervenção cirúrgica de sucesso. Além de todos esses fatores, essas células encontram-se, ainda, protegidas pela barreira hematoencefálica (BBB) que irá dificultar a passagem de concentrações adequadas da maioria dos fármacos destinados ao seu combate. Muitos esforços focados em alcançar melhores resultados na terapia dos tumores cerebrais visam o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que tem como alvo a inibição de mediadores de sinalização ativados em tumores malignos. Embora já exista um grande arsenal desses inibidores, diversos

ensaios clínicos não apontam resultados muito encorajadores[3]. Em grande parte, estes problemas estão relacionados às propriedades farmacotécnicas e farmacocinéticas inadequadas desses agentes aliados a dificuldades na transposição de barreiras biológicas. Neste sentido, a otimização da terapia padrão bem como a racionalização de novas abordagens terapêuticas incluindo a entrega adequada desses agentes nos tecidos alvos, são metas importantes que irão ajudar a superar os obstáculos presentes no tratamento [3, 4].

Devido às suas características anatômicas, a via nasal vem sendo proposta quando se pretende atingir o sistema nervoso central (SNC) através de uma rota extracelular de canais perineurais[5, 6]. Entretanto, embora esta via possa ser promissora, existem alguns fatores capazes de limitar a absorção de fármacos na mucosa nasal como a depuração mucociliar, que pode remover a formulação da cavidade nasal, a atividade enzimática e a baixa permeabilidade deste epitélio, o que irá dificultar o transporte do fármaco para SNC[7]. Do ponto de vista farmacotécnico e nano-tecnológico, diferentes estratégias podem ser adotadas para contornar tais limitações e, embora o desenvolvimento de medicamentos administrados pela via nasal apresente grandes desafios, diversos sistemas vem sendo desenhados e estudados para viabilizar o transporte de

fármacos através desta mucosa para o SNC[8].

Para combater as células tumorais é preciso estar atento aos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento dos tumores[9, 10]. A ampliação do conhecimento e entendimento do comportamento molecular dos GBM sugere que a utilização de um agente terapêutico capaz de interferir em única via de sinalização não trará avanços significativos na terapia desta patologia. Diante do comportamento agressivo e altamente adaptativo das células tumorais, está cada vez mais evidente que a abordagem de alvos múltiplos pode proporcionar um futuro mais favorável no seu combate[11, 12]. A possibilidade de interferir em diferentes vias de sinalização simultaneamente, aumentando a eficácia, além da utilização de uma via de administração que favorece o alcance do alvo, constituem a base racional para a utilização de estratégias associadas no seu combate.

Uma das características moleculares conhecida dos GBM é a amplificação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), pertencente à família HER de receptores¹². Sua ligação com fator de crescimento promove a transdução a partir da superfície celular para o meio intracelular resultando na proliferação, na sobrevivência e na produção de fatores pró-angiogénicos que irão garantir e induzir o crescimento do

tumor. Neste sentido, a inibição da ativação de EGFR apresenta-se como uma estratégia promissora na terapêutica de GBM[13, 14]. O cetuximabe (CTX) é um anticorpo monoclonal (MAb) quimérico, que se liga com alta afinidade a EGFR impedindo a estimulação de ligantes internos que resulta em inibição da proliferação celular, redução da angiogênese, invasão e metástase[15]. Embora a literatura aponte que seu uso sistêmico tenha demonstrado efeito em modelos xenográficos de GBM[15, 16] assim como os demais anticorpos monoclonais, CTX apresenta um alto peso molecular e a dificuldade de transpor a barreira hematoencefálica o que torna seu uso limitado nesta terapia. Para contornar tais limitações, um processo conhecido como fornecimento de convecção[17], baseado no uso de cateter intercerebral implantado, foi desenvolvido na tentativa de proporcionar a entrega do agente terapêutico diretamente no parênquima cerebral. Entretanto, embora esta abordagem tenha apresentado eficácia clínica, trata-se de um procedimento cirúrgico altamente invasivo[13, 18]. Por outro lado, esses resultados demonstram que ao atingir o parênquima cerebral em concentrações adequadas esses fármacos são eficazes.

Durante sua intensa proliferação, outro aspecto muito característico das células tumorais consiste na necessidade de adaptações metabólicas para a

produção do aporte energético necessário. Um fenômeno clássico que descreve essa adaptação consiste na passagem da fosforilação oxidativa à glicólise como principal fonte de ATP, mesmo na presença de oxigênio, fenômeno este conhecido como Efeito Warburg[2, 19-21]. As altas taxas do metabolismo glicolítico produzem altos níveis de lactato/ ácido láctico que precisam ser externalizados prevenindo acidose e conseqüentemente a morte celular por apoptose[22]. Assim, os transportadores de monocarboxilatos (MCTs), presentes na membrana plasmática, desempenham um papel fundamental no metabolismo celular promovendo o transporte transmembrana de moléculas como o lactato[9]. A família dos MCTs compreende 14 membros; entretanto, apenas os MCTs 1-4 estão relacionados ao transporte de prótons e controle do pH fisiológico. A superexpressão dos MCT1 e MCT4 em GBM tem uma importante contribuição para a manutenção do metabolismo glicolítico e, conseqüentemente, a sobrevivência das células tumorais, estando também, fortemente associado aos processos de invasão e agressividade do tumor[2, 9, 23]. Desta maneira, a inibição destes transportadores vem sendo recentemente descrita como interessante alvo terapêutico no combate aos GBM[1, 24-26]. Dentre as substâncias capazes de promover esta inibição, o

ácido alfa-ciano-4 hidroxycinâmico (CHC), uma pequena molécula aromática, vem demonstrando resultados interessantes, proporcionando a necrose completa do tumor, além de um aumento na taxa de sobrevivência (50%) em modelo xenográfico[1]. Em células de gliomas (U251), CHC foi capaz de inibir a proliferação celular e induzir a morte[2].

Usado em combinação com outros quimioterápicos, CHC deve proporcionar um sinergismo terapêutico ou ainda um aumento significativo de eficácia[6, 18, 27]. Entretanto, embora esses resultados sejam encorajadores, a molécula CHC apresenta uma solubilidade bastante limitada o que deve limitar o seu efeito terapêutico quando administrada através de vias de administração comuns. Na tentativa de contornar estas limitações, CHC já foi incorporado a zeólitos para o desenvolvimento de sistemas de liberação aplicados ao tratamento do câncer o que resultou em um aumento significativo no seu potencial terapêutico[8].

O uso da nanotecnologia apresenta grande potencial quando se objetiva um futuro revolucionário para o diagnóstico e a terapêutica do câncer [28, 29]. Esta ferramenta permite a combinação das propriedades de sistemas nanoestruturados com o sinergismo farmacológico de diferentes agentes terapêuticos, criando-se uma nova perspectiva estratégica para a entrega seletiva de fármacos em células tumorais,

facilitando a internalização e promovendo a liberação controlada no alvo intracelular. Nanopartículas poliméricas (NPs) constituem hoje, uma plataforma versátil[30] para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, particularmente para o transporte através de mucosas [31, 32]. Importantes aspectos que contribuem de maneira significativa para o uso das NPs consistem no seu tamanho; a possibilidade de encapsulação de fármacos em seu interior, ou ainda, associados à sua superfície, viabilizando assim, a abordagem de alvos múltiplos na terapêutica [29, 32]. Além de todos estes fatores, dependendo do polímero utilizado na sua produção, esses sistemas podem apresentar propriedade mucoadesiva, contornando a depuração mucociliar e facilitando o transporte através de barreiras epiteliais extremamente organizadas como a mucosa nasal [14, 33-35]. Entre os polímeros utilizados para esta finalidade, a quitosana (QS) e o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) são conhecidos por sua alta biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade e pelas propriedades bio-mucoadesivas que possuem[34, 36].

No desenvolvimento de NPs para administração nasal, um aspecto importante a ser considerado consiste na carga superficial resultante, que irão afetar sua mobilidade através da mucosa. Partículas carregadas positivamente

possuem grande capacidade de interagir com a mucina, principal constituinte do muco[37].

Desta maneira, a combinação destes fatores com as vantagens anatômicas oferecidas pela via nasal irá compor a investigação de uma nova estratégia no combate aos GBM.

Objetivos

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados multifuncionais contendo fármacos capazes de atuar em diferentes alvos moleculares a serem administrados através da via nasal na terapia dos GBM (Figura 1).

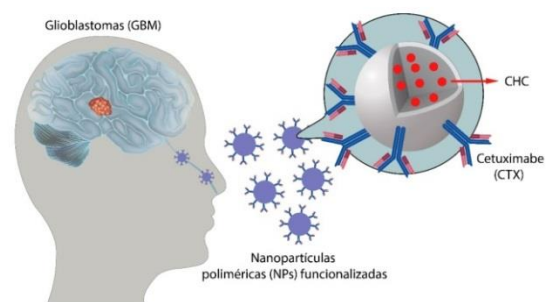


Figura 1: Representação esquemática da proposta de estratégias associadas no combate dos GBM.

Materiais e métodos

Materiais

Erbix® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) que contém a substância ativa cetuximab 5mg/mL foi utilizado como material de referência. Quitosana trimetilada (QS) foi gentilmente fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Instrumentação,

São Carlos, Brasil). Poly(D,L-lactide-coglycolide) e demais reagentes químicos foram utilizados em grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Métodos

Desenvolvimento e caracterização das NPs

Nanopartículas de PLGA e QS foram produzidas com a utilização do método de nanoprecipitação[38]. Resumidamente, o agente terapêutico ácido alfa-ciano-4 hidroxicinamico (CHC) e o polímero PLGA foram solubilizados em 5mL de acetona. Posteriormente, esta solução foi gotejada com a utilização de seringa e agulha em uma solução contendo Pluronic 188 e QS. Após o gotejamento, o sistema foi deixado sob agitação magnética para evaporação do solvente. Em seguida, as nanopartículas foram recolhidas por ultracentrifugação 14000rpm, 20 minutos, lavadas e armazenadas para determinação de diâmetro médio, polidispersidade (PDI), potencial zeta (ZP) e eficiência de encapsulação (EE%). A determinação do diâmetro médio foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons empregando equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). ZP foi determinado a partir da mobilidade eletroforética[39]. Para determinação da EE%, as partículas formadas foram separadas do sobrenadante por

centrifugação e a quantificação foi realizada utilizando espectrofotômetro UV-VIS em 325nm (metodologia analítica validada) de maneira indireta[40].

Funcionalização das NPs utilizando CTX

Nanopartículas foram adicionadas ao cetuximab (400µL: 100µL) em diferentes valores de pH para avaliação das interações supramoleculares entre o sistema desenvolvido e o anticorpo monoclonal (CTX). As NPs e CTX permaneceram em contato sob agitação magnética por 4 horas e foram posteriormente filtradas com a utilização de filtro Amicon® MWCO 100kDa centrifugado a 3000rpm por 10 minutos para separação do CTX não associado ao sistema. A eficiência do acoplamento foi calculada através da quantificação do CTX livre coletado na porção inferior do filtro Amicon® utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Avaliação do efeito sinérgico entre CHC e CTX e da atividade biológica das NPs desenvolvidas

Para avaliar o efeito sinérgico entre CHC e CTX bem como a atividade biológica das NPs desenvolvidas utilizou-se a determinação da concentração necessária de cada subatância e sua combinação para reduzir o crescimento populacional em 50% de linhagens

celulares (U251 e SW1088) de glioblastoma (IC₅₀). Eficácia e sinergismo terapêutico foram avaliados com utilização do cálculo do índice de combinação (IC) utilizando software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK). Para este modelo, quando IC<1, o efeito é considerado sinérgico; IC=1 o efeito é aditivo e IC>1, o efeito é antagonista³⁸.

Resultados e Discussões

Nanopartículas poliméricas de PLGA e QS foram produzidas pelo método da nanoprecipitação. As partículas possuem um tamanho aproximado de 300±50nm, PDI de 0,3, ZP de +40mV e EE% de aproximadamente 75%.

O PDI é um valor adimensional que indica se amostra é monodispersa, ou seja, se ela possui uma distribuição de diâmetro homogênea [41]. Para as partículas produzidas, cerca de 90% exibem um tamanho de 400nm com alta capacidade de encapsulação do CHC.

Os valores de ZP podem indicar a estabilidade física do sistema. De maneira geral, quando partículas possuem um alto valor de potencial zeta, seja ele positivo ou negativo, a repulsão entre elas deve ser suficiente para manter a sua estabilidade. Além disso, o ZP positivo evidencia a presença da QS na porção externa desses sistemas [42]. A literatura revela que carreadores nanométricos a base de quitosana são capazes de aumentar a permeação de fármacos uma vez que promovem a abertura das junções

intercelulares do epitélio[43]. Além disso, a carga residual positiva conferida pelos grupamentos NH³⁺ da QS presente na superfície das NPs, podem proporcionar a sua associação com oligossacarídeos presentes na mucosa nasal, o que deve garantir um maior tempo de residência do sistema neste local[44].

Associações supramoleculares entre a NPs e o CTX foram avaliadas em Ph 4,0 e 6,0. Após a filtração das amostras, foi possível determinar uma associação de 53 ± 5,2% para o pH 4,0 e 90 ± 2,3% para pH 6,0. Como a mucosa nasal de um adulto possui um valor de pH de 5,5 a 6,5 [45, 46], este ambiente contribui para uma associação mais efetiva entre as NPs contendo CHC e o CTX.

Nos estudos *in vitro* utilizando diferentes linhagens de gliomas, a combinação de CHC e CTX resultou em um aumento significativo no potencial citotóxico do fármaco. Além disso, um efeito sinérgico foi observado quando a combinação foi avaliada. As nanopartículas desenvolvidas foram ainda capazes de exercer uma atividade terapêutica mais significativa quando comparada com a utilização das substâncias em conjunto

Conclusões

Esses resultados destacam que as nanopartículas produzidas na qual foram inseridas substâncias capazes de interferir em diferentes alvos moleculares de células tumorais podem representar a

possibilidade da utilização de novas estratégias associadas garantindo desta maneira, um futuro mais favorável à terapêutica dos GBM.

Bibliografía

1. Colen, C.B., et al., *Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study*. *Neoplasia*, 2011. **13**(7): p. 620-632.
2. Miranda-Goncalves, V., et al., *Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets*. *Neuro-oncology*, 2013. **15**(2): p. 172-188.
3. Kaluzova, M., et al., *Targeted therapy of glioblastoma stem-like cells and tumor non-stem cells using cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles*. *Oncotarget*, 2015. **6**(11): p. 8788-8806.
4. Bouras, A., M. Kaluzova, and C.G. Hadjipanayis, *Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles*. *Journal of neuro-oncology*, 2015. **124**(1): p. 13-22.
5. Hashizume, R., et al., *New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163*. *Neuro-Oncology*, 2008. **10**(2): p. 112-120.
6. Alex, A.T., et al., *Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery*. *Drug delivery*, 2015: p. 1-10.
7. Illum, L., *Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions*. *J Control Release*, 2003. **87**(1-3): p. 187-198.
8. Vyas, T.K., et al., *Intranasal drug delivery for brain targeting*. *Current drug delivery*, 2005. **2**(2): p. 165-175.
9. Izumi, H., et al., *Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy*. *Cancer treatment reviews*, 2003. **29**(6): p. 541-549.
10. Arjaans, M., et al., *VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside*. *Oncotarget*, 2016.
11. Taylor, T.E., F.B. Furnari, and W.K. Cavenee, *Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012. **12**(3): p. 197-209.
12. Veliz, I., et al., *Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma—is there any hope for the future?*

- Annals of Translational Medicine, 2015. **3**(1): p. 7.
13. Loew, S., et al., *The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(6): p. 703-715.
 14. Zalba, S., et al., *EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocal carcinoma model*. Nanomedicine (Lond), 2016. **11**(5): p. 465-477.
 15. Harding, J. and B. Burtneess, *Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody*. Drugs of today, 2005. **41**(2): p. 107-127.
 16. Eller, J.L., et al., *Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme*. Neurosurgery, 2002. **51**(4): p. 1005-1013.
 17. Jahangiri, A., et al., *Convection-enhanced delivery in glioblastoma: a review of preclinical and clinical studies*. Journal of neurosurgery, 2016: p. 1-10.
 18. Hall, W.A., E. Rustamzadeh, and A.L. Asher, *Convection-enhanced delivery in clinical trials*. Neurosurgical focus, 2003. **14**(2): p. e2.
 19. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
 20. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
 21. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
 22. Baltazar, F., et al., *Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response*. Histol Histopathol, 2014. **29**(12): p. 1511-24.
 23. Lim, K.S., et al., *Inhibition of monocarboxylate transporter-4 depletes stem-like glioblastoma cells and inhibits HIF transcriptional response in a lactate-independent manner*. Oncogene, 2014. **33**(35): p. 4433-4441.
 24. Mathupala, S.P., P. Parajuli, and A.E. Sloan, *Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study*. Neurosurgery, 2004. **55**(6): p. 1410-1419.
 25. Cheng, C., et al., *Alterations of monocarboxylate transporter densities during hypoxia in brain*

- and breast tumour cells*. Cellular oncology, 2012. **35**(3): p. 217-227.
26. Marchiq, I., et al., *Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin*. Cancer research, 2015. **75**(1): p. 171-180.
27. Illum, L., et al., *Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines*. Advanced drug delivery reviews, 2001. **51**(1-3): p. 81-96.
28. Shargh, V.H., H. Hondermarck, and M. Liang, *Antibody-targeted biodegradable nanoparticles for cancer therapy*. Nanomedicine (Lond), 2016. **11**(1): p. 63-79.
29. Pourgholi, F., et al., *Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma*. Biomed Pharmacother, 2016. **77**: p. 98-107.
30. Nagpal, K., S.K. Singh, and D.N. Mishra, *Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery*. Chemical & pharmaceutical bulletin (Tokyo), 2010. **58**(11): p. 1423-1430.
31. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Advanced drug delivery reviews, 2001. **47**(1): p. 65-81.
32. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
33. Jain, D.S., et al., *Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route*. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications, 2016. **63**: p. 411-421.
34. Goycoolea, F.M., et al., *Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules*. Biomacromolecules, 2009. **10**(7): p. 1736-1743.
35. Ben Messaoud, G., et al., *Influence of internal composition on physicochemical properties of alginate aqueous-core capsules*. J Colloid Interface Sci, 2016. **469**: p. 120-128.
36. Elzoghby, A.O., et al., *Natural polymeric nanoparticles for brain-targeting: Implications on drug and gene delivery*. Current pharmaceutical design, 2016.
37. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(2): p. 75-85.
38. Wang, J., et al., *Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment*. Int J Pharm, 2010. **400**(1-2): p. 194-200.

39. Wongsagonsup, R., et al., *Zeta Potential (ζ) and Pasting Properties of Phosphorylated or Crosslinked Rice Starches*. *Starch - Stärke*, 2005. **57**(1): p. 32-37.
40. Leonard, M., et al., *Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **98**(3): p. 395-405.
41. Azevedo, M.A., et al., *Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014. **71**: p. 141-146.
42. Schatz, C., et al., *Versatile and efficient formation of colloids of biopolymer-based polyelectrolyte complexes*. *Biomacromolecules*, 2004. **5**(5): p. 1882-1892.
43. Vllasaliu, D., et al., *Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: comparison with chitosan solution*. *Int J Pharm*, 2010. **400**(1-2): p. 183-193.
44. Dhawan, S., A.K. Singla, and V.R. Sinha, *Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods*. *AAPS PharmSciTech*, 2004. **5**(4): p. e67.
45. Taherali, F., F. Varum, and A.W. Basit, *A slippery slope: On the origin, role and physiology of mucus*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018. **124**: p. 16-33.
46. Arora, P., S. Sharma, and S. Garg, *Permeability issues in nasal drug delivery*. *Drug Discovery Today*, 2002. **7**(18): p. 967-975.

Financiamiento

FAPESP (2016/09671-3; 2017/16324-0, 2018/04546-1), INCT-MCTI/CNPq/CAPES/FAPESP 16/2014, proc. FAPESP 2014/50928, proc. CNPq 465687/2014-8; CNPq; CAPES, PADCF-CF-Ar