

Desenvolvimento de grânulos de alginato para veiculação de derivado tiofênico 5CN06 por gelificação ionotrópica

Development of alginate granules for thiophenic derivative 5CN06 delivery by ionotropic gelation

Desarrollo de gránulos de alginato para la entrega del derivado tiofénico 5CN06 por gelificación ionotrópica

Recebido: 28/09/2022 | Revisado: 11/10/2022 | Aceitado: 13/10/2022 | Publicado: 18/10/2022

Kaline de Araújo Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6755-740X>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: kalinearaujo9197@hotmail.com

Michelle de Oliveira Pedrosa Rolim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5579-9724>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: farmich@yahoo.com.br

Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2865-4255>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: rayane.scruz@gmail.com

Dayanne Tomaz Casimiro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3872-3813>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: dayannecasimiro@hotmail.com

Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3588-833X>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: franciscojaime@servidor.uepb.edu.br

José Aleksandro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3851-7668>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: alexuepb@servidor.uepb.edu.br

Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0747-0297>

Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

E-mail: bolivarpqld@servidor.uepb.edu.br

Resumo

O uso de polissacarídeos biodegradáveis com capacidade de formação de gel para produção de grânulos não tem sido relatado na literatura associados a novos derivados 2-aminotiofênicos, que tem demonstrado atividade biológica antifúngica seletiva. Dessa forma o objetivo desse estudo foi avaliar a formação de grânulos de alginato para veiculação do derivado tiofênico e Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) 5CN06 por gelificação ionotrópica. Foi produzido uma emulsão de 5CN06 a 0,1%, uma solução de alginato de sódio 3% e uma solução de CaCl_2 a 10%. Sob distintos volumes a emulsão e o alginato foram misturadas e sob gotejamento, na solução CaCl_2 , os grânulos foram formados. A alteração da proporção de polímero interfere nesse rendimento, sendo esse igual e acima de 79,50 % \pm 0,03. Em meio ácido, pH 1,2, o grânulo não possui significativa taxa de intumescimento, após 180 min. Em meio pH 7,4 ele se dissolve devido a presença de Na^+ . Utilizando 10mL das misturas de emulsão que contém o fármaco e 10 mL de solução de alginato de sódio a 3%, obteve-se grânulos, com melhor eficiência de encapsulação (65,7%). A maior razão da mistura interferiu na capacidade de intumescimento e na estabilização térmica do IFA. Dessa forma, o estudo desse sistema foi promissor, a partir das condições experimentais, para o entendimento da formação dos grânulos para liberação do composto derivado tiofênico 5CN06, com ação antifúngica.

Palavras-chave: Grânulos; Derivado Tiofênico; Gelificação Ionotrópica; Alginato.

Abstract

The use of biodegradable polysaccharides with gel forming capacity to produce granules has been reported, but there are no reports in the literature associated with new 2-aminothiophene derivatives, which have demonstrated selective antifungal biological activity. Thus, the objective of this study was to evaluate the formation of alginate granules for the delivery of the thiophenic derivative and Active Pharmaceutical Ingredient (API) 5CN06 by ionotropic gelation. An emulsion of 0.1% 5CN06, a 3% sodium alginate solution and a 10% CaCl_2 solution was produced. The emulsion and the alginate were mixed under different volumes and, under drip, in the CaCl_2 solution, the granules were formed.

Changing the proportion of polymer interferes with this yield, which is equal to and above $79.50\% \pm 0.03$. In acid medium, pH 1.2, the granule does not have a significant swelling rate after 180 min. In a pH 7.4 medium it dissolves due to the presence of Na^+ . Using 10 ml of the emulsion mixtures containing the drug and 10 ml of 3% sodium alginate solution, granules were obtained with better encapsulation efficiency (65.7%). The higher mixing ratio interfered in the swelling capacity and in the thermal stabilization of the drug. Thus, the study of this system was promising, from the experimental conditions, for the understanding of the formation of granules to release the thiophenic derivative compound 5CN06, with antifungal action.

Keywords: Granules; Thiophenic Derivative; Ionotropic Gelation; Alginate.

Resumen

Se ha reportado el uso de polisacáridos biodegradables con capacidad gelificante para producir gránulos, pero no existen reportes en la literatura asociados a nuevos derivados del 2-aminotiofeno, que hayan demostrado actividad biológica antifúngica selectiva. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la formación de gránulos de alginato para la entrega del derivado tiofénico e Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) 5CN06 por gelificación ionotrópica. Se produjo una emulsión de 5CN06 al 0,1%, una solución de alginato de sodio al 3% y una solución de CaCl_2 al 10%. La emulsión y el alginato se mezclaron a diferentes volúmenes y, por goteo, en la solución de CaCl_2 , se formaron los gránulos. Cambiar la proporción de polímero interfiere con este rendimiento, que es igual y superior a $79,50\% \pm 0,03$. En medio ácido, pH 1,2, el gránulo no tiene una tasa de hinchamiento significativa después de 180 min. En un medio pH 7,4 se disuelve por la presencia de Na^+ . Usando 10 ml de las mezclas de emulsión que contenían el fármaco y 10 ml de solución de alginato de sodio al 3%, se obtuvieron gránulos con mejor eficiencia de encapsulación (65,7%). La mayor proporción de mezcla interfirió en la capacidad de hinchamiento y en la estabilización térmica del fármaco. Así, el estudio de este sistema resultó prometedor, a partir de las condiciones experimentales, para la comprensión de la formación de gránulos para la liberación del compuesto derivado tiofénico 5CN06, con acción antifúngica.

Palabras clave: Gránulos; Derivado Tiofénico; Gelificación Ionotrópica; Alginate.

1. Introdução

As empresas farmacêuticas continuam buscando inovações a partir de novas moléculas com propriedades terapêuticas, atividades eficazes e alvos específicos, além de novas tecnologias de veiculação de fármacos (Upadhyay et al., 2020). Essas novas tecnologias estão sendo frequentemente incentivadas devido à eficácia, capacidade de melhorar características físicas e químicas dessas moléculas. E nesse aspecto, muitos estudos são voltados para novos materiais/materiais avançados, que sirvam de reservatório para fármacos, ou que possuam propriedades específicas de veiculação (Winnicka, 2021), que permitam a encapsulação, isolando o insumo farmacêutico ativo (IFA) do ambiente externo, para melhora da biodisponibilidade (Kim et al., 2016; Li et al., 2022).

Dessa forma, materiais poliméricos têm sido utilizados para na área biomédica, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, não mutagênicos e possuem atrativo custo-benefício. Como exemplo, os polímeros naturais como a gelatina (Moreira et al., 2022; Szabó et al., 2014), quitosana (Kalidason & Kuroiwa, 2022; Kazemi-Andalib et al., 2022; Roy et al., 2022) e alginato (Gonçalves et al., 2016; Trinh et al., 2021; N. Yang et al., 2015), que tem sido utilizado para sintetizar micropartículas ou grânulos de hidrogel para liberação e encapsulamento de fármacos.

Esse último polímero, o alginato é um polissacarídeo aniônico encontrado na forma de uma combinação insolúvel de sais de potássio, sódio, magnésio e cálcio, do ácido algínico, que são componentes estruturais das paredes celulares das algas marrons (Reddy, 2022). Quimicamente são um heteropolissacarídeo formados por cadeias de ácido α -L-gulurônico (bloco G) e ácido β -D-manurônico (bloco M), arrançadas linearmente através de ligações covalentes α (1-4) (Jana et al., 2021).

Esses materiais naturais, são lavados, triturados, secos, pulverizados e são tratados com uma solução básica, especialmente com hidróxido de sódio (NaOH), para formação do sal ou alginato de sódio, que é solúvel em água (Kost et al., 2022; Shaikh et al., 2021). Por conter cadeias laterais contendo grupamentos ácido carboxílico, o alginato pode formar géis, quando na presença de íons divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}) ou íons trivalentes (Fe^{3+} e Al^{3+}). Dessa forma, utilizando-se dessas propriedades, partículas de gel podem ser formadas, utilizando metodologias distintas para formação de micropartículas ou grânulos (Gonçalves et al., 2016; Joye & McClements, 2014). Nesse sentido, utilizando-se de uma matriz hidrofílica, como o alginato, a formação do encapsulamento de fármacos com propriedades lipofílicas ainda é pouco investigada.

Moléculas orgânicas contendo anéis aromáticos heterocíclicos, como o tiofeno, são amplamente descritos na literatura devido a suas vastas aplicações farmacológicas. No que concerne atividade antifúngica, nosso grupo de pesquisa tem constantemente identificado derivados 2-aminotiofênicos (Oliveira et al., 2022; Luna et al., 2021; Neves et al., 2020), a exemplo do IFA denominado 5CN06, o qual mostrou-se eficaz *in vitro* em inibir o crescimento de espécies de *Cândida* e *Cryptococcus neoformans* (Mendonça-Junior et al., 2011; Pinto et al., 2008), apresentando atividade fungicida.

5CN06 é obtido sinteticamente em bom rendimento através de um procedimento sintético de duas etapas (Mendonça-Junior et al., 2011), fornecendo o IFA sob forma de um sólido cristalino amorfo, de cor amarelo pálido, com LogP = 5,98, sendo, portanto, um IFA com características lipofílicas, propriedade essa que parece estar relacionada a sua atividade biológica (da Cruz et al., 2021; Lopes et al., 2014).

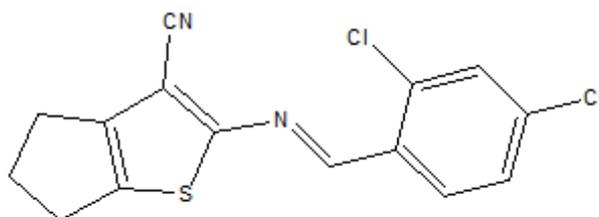
Sabendo que há uma demanda crescente por novos fármacos com atividade antifúngica, e que há poucos estudos que associem esse IFA lipofílico a um sistema farmacêutico. Somado a necessidade de entendimento da formação e encapsulamento de fármacos lipofílicos a partir de uma matriz polimérica hidrofílica, o objetivo desse estudo foi avaliar a formação de grânulos de alginato para veiculação de um novo composto tiofênico 5CN06, com atividade antifúngica, por técnica de gelificação ionotrópica.

2. Metodologia

2.1 Materiais

Todos os materiais utilizados foram: O IFA 5CN06, com nome químico 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, representado na Figura 1, foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB, Campina Grande, PB, Brasil) e cedido gentilmente para desenvolvimento das formulações. Foi utilizado Cloreto de cálcio (CaCl₂) Anidro P.A da Dinâmica Química Contemporânea LTDA. (Indaiatuba, SP, Brasil), Miristato de Isopropila FAGRON (Anápolis, GO, Brasil), Polissorbato 80 da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, SP, Brasil), Alginato de sódio (AlNa) PA da Cinética (Itapevi, SP, Brasil), Ácido Clorídrico (HCl) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Hidróxido de sódio (NaOH) PA da Neon (Suzano, SP, Brasil). Os sais utilizados foram Cloreto de Potássio (KCl) PA da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fosfato de sódio monobásico anidro 98% PA e fosfato de sódio bibásico PA, Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil), cloreto de sódio (NaCl) Labsynth (Diadema, SP, Brasil). Todos os materiais utilizados eram de grau analítico.

Figura 1. Estrutura química do 2-[(2,4-dicloro-benzilideno) -amino] -5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06).



Fonte: Autores (2022), utilizando o Software MarvinSketch® (2022).

2.2 Método

Esse trabalho consiste de um estudo experimental, cuja abordagem é quantitativa, de natureza aplicada (Sousa et al.,

2007) para explicar os fenômenos de formação de grânulos de alginato, associada ao fármaco 5CN06, a partir de um procedimento de gelificação ionotrópica, sendo realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), Campina Grande, PB, Brasil. O procedimento utilizado consiste na emulsificação/gelificação interna conforme descrito por Soeiro, et al. 2021 (Soeiro et al., 2021), onde a emulsão é a fase transportadora ou reservatório do fármaco hidrofóbico, para que a matriz do polímero, seja misturada a essa fase, e assim formem os grânulos por gelificação ionotrópica, a partir de uma solução de íons de cálcio (Saqib et al., 2022).

2.2.1 Preparação de emulsão de 5CN06 à 0,1%_(p/v)

Em um béquer foi adicionado 0,02g de 5CN06, 6g de miristato de isopropila como fase oleosa e 3 g de polissorbato 80, como tensoativo. Após, a mistura foi submetida a três ciclos de 1 min no sonicador (Unique, Desruptor de Célula Ultra-Sonic-DES500) a uma potência ultrassônica de 250 watts e em seguida submetida a banho de ultras-som (Unique, modelo USC-2800 A, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5 min, resultando em mistura A. À essa mistura A, foi adicionada 10,98 ml de água como fase aquosa, que foi submetida a um ciclo de 1 min no sonicador e 5 min no banho de ultra-som, até completa formação da emulsão do tipo (óleo em água) O/A (EO/A).

2.2.2 Preparação dos grânulos de alginato de cálcio por gelificação ionotrópica

Os grânulos foram preparados pelo método de gelificação ionotrópica da emulsão. Separadamente, uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 10%_(p/v) e uma solução de AlNa à 3% (SAS 3%), foi preparada, ambas por solubilização em água. A solução de AlNa e a emulsão de 5CN06 a 0,1%, foram misturadas, em cinco proporções de volume distintas, conforme descrito no Tabela 1. Em seguida, foram gotejadas, com bureta de vidro, contendo na saída uma agulha de 8 mm, que estava a 7,0 cm de distância da solução de CaCl₂, sob agitação magnética (IKA® RH Basic 1, Campinas, SP, Brasil). Os grânulos formados foram mantidos na solução de CaCl₂ por 30 min, em seguida foram separados por tamisação, lavados com água, e armazenados sob dessecação.

Tabela 1. Grânulos formados sob diferentes volumes de solução de AlNa 3% e emulsão de 5CN06 0,1%

Nomenclatura dos grânulos	SAS3% (mL)	EO/A (mL)
G5CN06A	5	5
G5CN06B	15	5
G5CN06C	15	15
G5CN06D	10	10
G5CN06E	5	15

Fonte: Autores (2022).

Nesta Tabela, é possível identificar a proporção de soluções de AlNa 3% e de emulsão EO/A de 5CN06 a 0,1%, adicionado para formação dos grânulos cujos nomes estão descritos. É válido ressaltar que destas apenas a formulação G5CN06E não demonstrou uniformidade entre os grânulos, formando aglomerados entre eles e perda da forma esférica física. Assim, esta formulação foi excluída e as outras passaram por uma avaliação mais criteriosa.

2.3 Determinação do rendimento, da eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento da 5CN06

Para se determinar o rendimento foi calculado a razão da massa seca obtida das partículas geradas e a quantidade total de componentes não voláteis utilizados na composição, sendo esses alginato de sódio, 5CN06, miristato de isopropila e polissorbato 80, sendo expressos em percentuais. Para determinar a eficiência de encapsulação (EE), seguiu-se metodologia proposta por Freitas, et al. (Freitas et al., 2021). As partículas dos grânulos de 0,25 g, foi submetida a dissolução completa em

10 mL de clorofórmio, sob sonicação. Em seguida essa suspensão foi filtrada em papel filtro qualitativo, para obtenção de uma concentração teórica de 10µg/mL. A concentração de 5CN06 foi determinada por espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV-1900, Japão) $\lambda=393$ nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e a equação (1) foi utilizada para EE.

$$EE(\%) = \frac{\text{conteúdo real de IFA nos grânulos}}{\text{conteúdo teórico de IFA nos grânulos}} \times 100 \quad (1)$$

Onde o teor real do IFA nos grânulos foi determinado por espectroscopia e o teor teórico do IFA nos grânulos foi medido considerando a quantidade do IFA inicialmente adicionado.

2.4 Determinação da capacidade de intumescimento e erosão

A capacidade de intumescimento e erosão dos grânulos foi avaliada pelo percentual de variação do peso quando estes foram incubados em dois meios aquosos, solução ácida (SG) (0,01 mol/L de ácido clorídrico com 2mg/mL de NaCl, pH 1,2) e solução tampão fosfato salina (TF) (10 mM, pH 7,4), para investigar a estabilidade das partículas. O método foi realizado baseado em Zheng, et al. (Zheng et al., 2022), com modificações, onde 100 esferas foram colocadas em cada meio, sob volume de 100 mL, e incubadas sob 25°C, 150 rpm e em intervalos de tempo de 30 min e 180 min, os grânulos foram retirados, secos e pesados. Para calcular o grau de inchamento, foi considerado a variação de peso das amostras medidos pela equação 2.

$$\text{Grau de inchaço (\%)} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde, P_f é o peso final dos grânulos após o processo de intumescimento, P_i é peso inicial dos grânulos antes do intumescimento

2.5 Caracterização Físico-Química dos grânulos

Para identificar a morfologia, a superfície e a distribuição de tamanho dos grânulos das formulações preparadas, foi realizado análise morfológica por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Hitachi, TM-1000, Krefeld, Alemanha) combinada com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (EDX). As amostras foram previamente preparadas para o processo de metalização através de um procedimento de limpeza padrão, por imersão da amostra em acetona pura. Em seguida, essa foi disposta no suporte de aço, para metalização, sendo revestida com uma fina camada de 10 nm de ouro e analisadas usando tensão de operação de 3,0 kV.

Para verificar a análise térmica das partículas e do IFA isolado, foi realizado a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), obtidas por um calorímetro DSC Q20 acoplado a um sistema de resfriamento RCS 90 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos) em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, sob razão de aquecimento de 10°C/min até 300°C. As amostras foram colocadas em células de alumínio hermeticamente fechada, calibrada com padrões de índio. Já as curvas termogravimétricas (TGA) foi obtida através de um analisador térmico simultâneo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos), sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min, na faixa de 25 a 600°C para grânulos e 25 a 900°C para fármaco isolado, utilizando razão de aquecimento de 10°C/min, em cadinho de alumina com massa de amostra em torno de 5mg.

2.6 Análise de Dados

Os resultados obtidos das amostras dos ensaios de rendimento, da eficiência de encapsulação e capacidade de carreamento do 5CN06 e da capacidade de intumescimento, foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido por

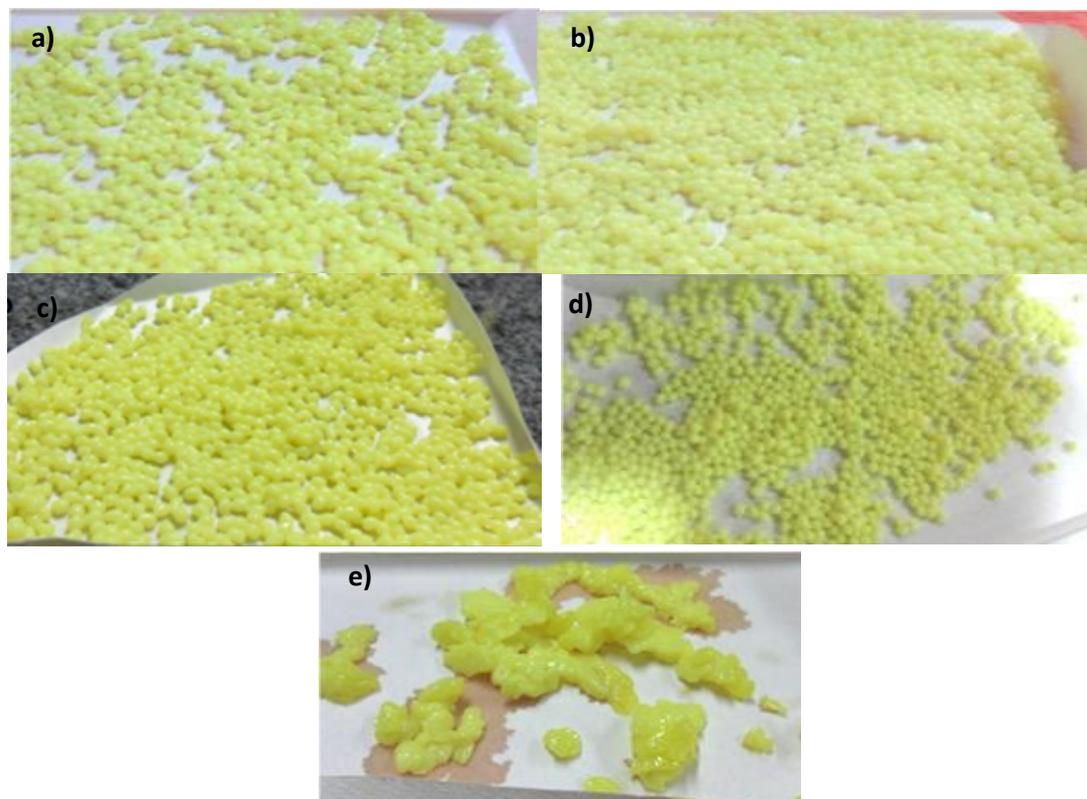
teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando p-valor < 0,05.

3. Resultados e Discussão

3.1 Produção dos grânulos com 5CN06

Os grânulos de alginato de cálcio formados a partir da gelificação ionotrópica externa, por gotejamento no íon reticulante, da mistura de SAS3%:EO/A, formaram partículas macroscopicamente homogêneas, amareladas devido a presença do fármaco, aproximadamente esféricas e sem agregados, como observado na Figura 2, para a maioria das formulações com proporções distintas de SAS3%:EO/A, exceto para G5CN06E, que apresentou-se totalmente disforme, com aglomerado, e perda da capacidade de formação esférico.

Figura 2. Análise macroscópica dos grânulos de alginato de cálcio produzidas por gelificação ionotrópica para as amostras com proporções distintas de alginato e emulsão sendo a) G5CN06A, b) G5CN06B, c) G5CN06C, d) G5CN06D e e) G5CN06E.



Fonte: Autores (2022).

A concentração da solução de SAS3%, interferiu na capacidade de gelificação, e conseqüente formação dos grânulos. Na proporção 25:75, não há polímero suficiente para enrijecimento da malha em contato com o agente reticulante, sendo essa formulação G5CN06E descartada das análises subsequentes. Com 50% e 75% de SAS3%, houve capacidade suficiente para se obter partículas macroscopicamente uniformes e rígidas. Ou seja, a proporção de SAS3%, em relação a emulsão, influenciou diretamente no processo de obtenção. É importante destacar que a formação dessas esferas acontece pela interação de um polímero iônico alginato de sódio, que na presença de carga oposta, como cátions polivalentes como o Ca^{2+} , presente na solução de CaCl_2 , ocorre reticulação que é o aumento da rigidez da malha polimérica, com a formação do gel, no momento do gotejamento sob a solução reticulante. Pois há formação de ligações intramoleculares com o Ca^{2+} que atua como uma ponte entre

as cadeias monoméricas do alginato, constituindo zonas de junção, entre essas (Ahirrao et al., 2014; Lobo et al., 2020; Soeiro et al., 2021).

3.2 Rendimento dos grânulos e eficiência de encapsulação do 5CN06

A análise do rendimento dos grânulos obtidos por proporções diferentes de SAS3%:EO/A, e concentrações do IFA em cada formulação, e eficiência de encapsulação do IFA, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento obtido a partir da massa seca e dos componentes não voláteis e eficiência de encapsulação do IFA na formação dos grânulos de alginato.

Grânulos	Rendimento (%) (n=3 ±DP)	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL) Média ± DP (n=3)	EE (%)
G5CN06A	79,50 ± 0,03 ^a	10	5,44 ± 0,76	54,42 ^a
G5CN06B	108 ± 0,014 ^b	10	5,73 ± 0,10	57,26 ^a
G5CN06C	99,50 ± 0,035 ^b	10	5,81 ± 0,09	58,07 ^a
G5CN06D	84,50 ± 0,021 ^a	10	6,57 ± 0,04	65,7 ^b

p<0,05 – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. ^{a,b} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si. Fonte: Autores (2022).

Assim, pela análise dos resultados evidenciados pelo Tabela 2 é possível destacar que a maioria das amostras apresentou rendimento acima de 80%, a análise de variância (ANOVA), demonstrou uma diferença estatística significativa entre os rendimentos das diferentes formulações de grânulos, com p-valor = 0,00125 e o teste de Tukey apresentou rendimentos das formulações G5CN06A e G5CN06D, assim como G5CN06B e G5CN06C, que são estatisticamente iguais. Sendo essas últimas, diferentes proporções de SAS3%:EO/A, a quantidade de SAS3% é a mesma, o que sugere que este componente quando alterado pode exercer maior influência no rendimento, como observado também, na formação dos sistemas. O tempo de secagem, igual para todas as amostras pode ter sido insuficiente para G5CN06B e G5CN06C, provavelmente por maior retenção de umidade, causando maiores rendimentos de 108 ± 0,014 e 99,50 ± 0,035, respectivamente.

Já a EE representa a retenção das gotículas da emulsão dentro dos grânulos, embutidos numa matriz sólida. Em todos os grânulos formados, se manteve, acima de 50%. A ANOVA revelou diferença estatística significativa para a taxa de encapsulação dos grânulos, com p-valor = 0,03663. No entanto, foi observado, pelo teste de Tukey, que apenas os grânulos G5CN06D, difere dos demais, uma vez que essa amostra apresenta o dobro da razão de SAS3%:EO/A, em relação a formulação G5CN06A, sendo a condição obtida para G5CN06D a que obteve melhor porcentagem de EE= 65,7%. É importante destacar que o aumento da razão SAS3%:EO/A, não interfere na condição de melhoramento do encapsulamento, uma vez que G5CN06C possui o triplo desta razão e mesmo assim, apresentou-se estatisticamente igual a G5CN06A. Dessa forma, a concentração ideal para obtenção do melhor encapsulamento é utilizando volumes de 10 mL para SAS3% e EO/A, sendo qualquer valor acima ou abaixo sem influência para o parâmetro analisado. Segundo Yang, et al., 2021 (D. Yang et al., 2021) fármacos com menor solubilidade apresenta-se com menor capacidade de ser incorporado ao sistema, sabendo que o 5CN06 apresenta um logP de 5,98, sofreu influência na eficiência de encapsulação, assim como o tamanho molecular, segundo o mesmo autor.

3.3 Teste de intumescimento e erosão

O comportamento de inchaço ou intumescimento é um parâmetro que afeta as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes. As mudanças dos perfis de liberação do fármaco durante o processo de dissolução dependerão das características de inchaço do filme (Hadi et al., 2022).

A razão de intumescimento das formulações preparadas foi determinada medindo-se o aumento de peso das amostras após a imersão nos meios simulados pH 1,2 e pH 7,4 e estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Grau de intumescimento dos grânulos de alginato em meios simulados ácidos (pH1,2) e tampão fosfato salino (pH7,4) por dois tempos de estudo 30 e 180 min.

Grânulos	Grau de inchaço (%) Meio ácido pH 1,2 (n=3; Média±DP)		Grau de inchaço (%) Meio básico pH 7,4 (n=3; Média±DP)		
	Tempo de exposição	30 min	180 min	30 min	180 min
		G5CN06A	35,5±0,01 ^a	30,2±0,06 ^a	101,83±0,18 ^a
G5CN06B	28,9±0,04 ^b	25,4±0,08 ^a	204,67±0,25 ^b	Desintegração	
G5CN06C	42,57±0,02 ^c	41,3±0,02 ^b	125,0±0,17 ^c	Desintegração	
G5CN06D	35,82±0,02 ^a	27,92±0,01 ^a	91±0,06 ^d	Desintegração	

p<0,05 – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. ^{a,b,c} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si. Fonte: Autores (2022).

É interessante observar nesta Tabela 3, que após 30 min em contato com o meio SG, os grânulos sofrem intumescimento com capacidade de inchaço, causado pela penetração da água nos espaços vazios da rede polimérica desidratada. Os resultados revelaram que os grânulos das formulações de alginato absorveu 35,5±0,01, 28,9±0,04, 42,57±0,02 e 35,82±0,02 %, respectivamente para G5CN06A, G5CN06B, G5CN06C e G5CN06D, em comparação com seu peso seco. Após 180 min, observou-se que os mesmos tiveram uma pequena redução do intumescimento, não sendo estatisticamente significativo, para a maioria das formulações, exceto para G5CN06C com p-valor= 0,00028.

A formulação G5CN06C com maior razão da mistura SAS3%:EO/A influenciou para aumento do intumescimento e estabilização, após 180 min. Essa capacidade aumentada pode ter ocorrido devido aos espaços vazios aumentados durante o processo de mistura, uma vez que a baixa solubilização do alginato em pH <5, ocorre pela desprotonação dos grupos carboxílicos (-COO⁻). Isso ocasiona diminuição na repulsão eletrostática entre as cadeias, impedindo a entrada de moléculas de água, pela formação de ligações de hidrogênio (Zhang et al., 2021). E isso pode permitir com que nesse meio, os grânulos modifiquem a liberação do fármaco, por mecanismo variados, uma vez que o processo de inchaço do carreador prolonga o tempo de contato do meio com o fármaco (Szekalska et al., 2018).

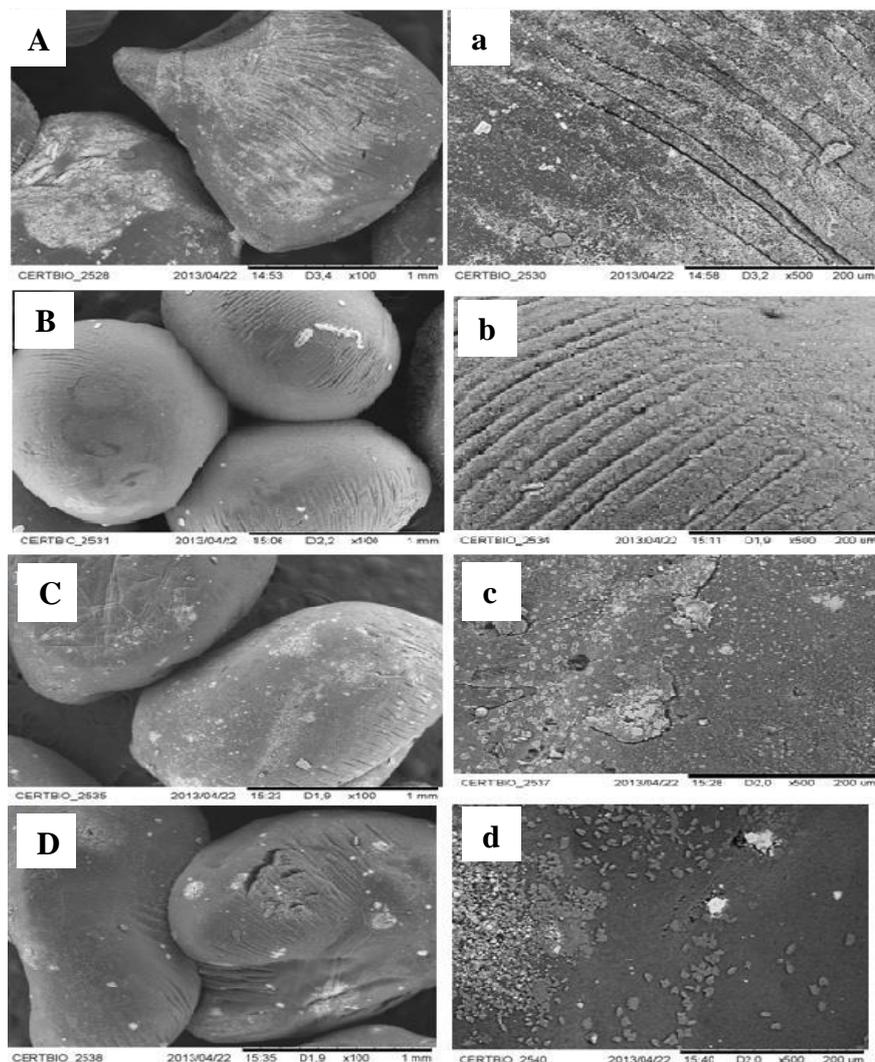
Por outro lado, para o meio TF realizado em pH 7,4, esse comportamento foi modificado, pelo aumento da capacidade de intumescimento, nos primeiros 30 min, e desintegração após esse período. Ou seja, o polímero é influenciado pelo pH e pela força iônica do meio, além de que o aumento de concentrações de íons não-gelificantes como o Na⁺, presentes, pelo tampão fosfato, contribui para essa instabilidade e perda da rigidez. Ainda, é importante destacar, que a formulação G5CN06D que possui a maior fração de SAS3%, intumesceu mais rapidamente. Outro aspecto importante é que a desintegração também está envolvida no tipo de reticulação (Reddy, 2022; Yu et al., 2019) uma vez que a solução do agente reticulante, utilizando 10% de CaCl₂, não foi capaz de aumentar a rigidez dos grânulos nesse meio, dado esse, importante para entender a velocidade que esses grânulos liberariam o fármaco nesse meio.

3.4 Caracterização Físico-Química dos grânulos

A morfologia da superfície das amostras secas, exibidas na Figura 3, foram examinadas utilizando o MEV, sob ampliação de 1 mm e 200 µm. Estruturas similares, ovais, com superfície lisa e fissuras foram encontradas para as amostras dos grânulos em todas as formulações. O tamanho médio para as partículas analisadas, produzida nas condições descritas, foram 1,28, 1,12, 1,43 e 1,38 µm, respectivamente, para G5CN06A, G5CN06B, G5CN06C e G5CN06D. Não se visualizou

cristais do fármaco na superfície dessas esferas, indicando que esse estava disperso, a partir da emulsão, na matriz polimérica do alginato, sendo os cristais presentes na superfície, resíduos da solução de CaCl_2 .

Figura 3. Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato contendo 5CN06 nas formulações A) G5CN06A 1mm e a) 200 μm , B) G5CN06B 1 mm e b) 200 μm , C) G5CN06C 1mm e c) 200 μm , D) G5CN06D 1mm e d) 200 μm . Análise macroscópica dos grânulos i) G5CN06B.



Fonte: Autores (2022).

A análise de EDX, em percentual de massa dos elementos presentes na superfície das formulações analisadas, estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual em massa dos elementos encontrados na superfície das formulações de grânulos, por EDX

Grânulos	% C	% O	% Ca	% Cl	% Na
G5CN06A	49,6	28,7	14,1	7,5	0
G5CN06B	60,5	25,4	5,5	8,6	0
G5CN06C	55,1	21,8	8,5	12,9	1,7
G5CN06D	63,9	26,2	5,5	4,4	0

C: Carbono; O: oxigênio; Ca: Cálcio; Cl: Cloro; Na: Sódio. Fonte: Autores (2022).

É possível apontar a presença de massa de cálcio e cloro, para todas as formulações analisadas. Além disso, a formulação G5CN06D foi a única que apresentou percentual de 1,7% de sódio em sua estrutura. Demonstrando que nem todos os íons presentes no alginato de sódio, foram substituídos pelos íons de cálcio, visto que essa amostra, apresentava maior razão proporcional de alginato de sódio, e a solução 10% de cloreto de cálcio não foi suficiente para realizar completamente a reação de troca de íons, no processo de reticulação, para essas proporções.

Na avaliação das propriedades térmicas, a Figura 4 exibe as curvas TG/DTG (variação de massa com a temperatura) para o IFA isolado 5CN06 (Figura 3a) e a Tabela 5 resume todas as perdas de massa que ocorreram com a variação da temperatura, demonstrando alguns eventos para todas as amostras analisadas.

Tabela 5. Dados da análise termogravimétrica dos grânulos formados por razões distintas de componentes da formulação.

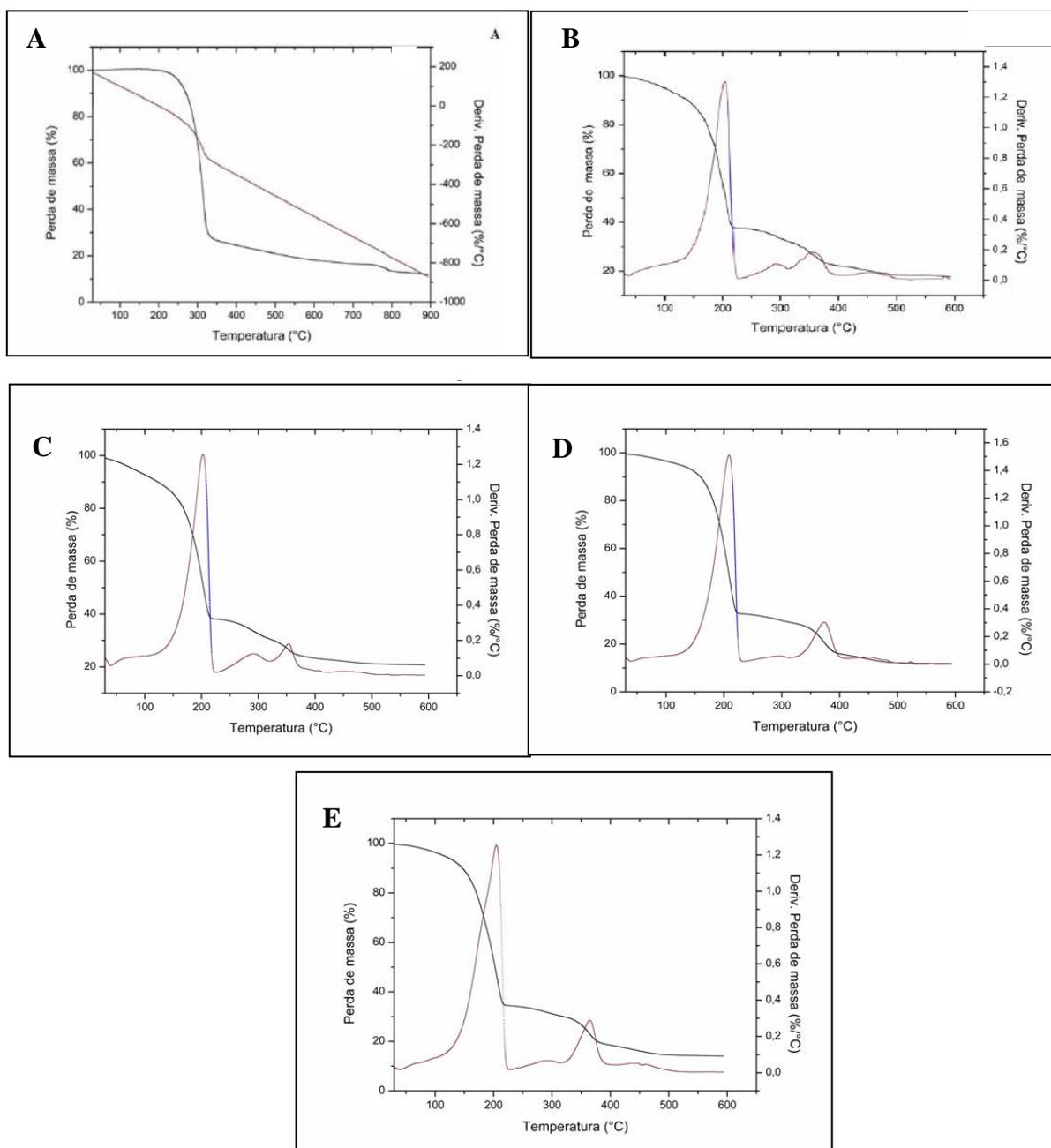
Amostras	Eventos	Varição da temperatura (ΔT°/C)	Perda de massa % (mg)	Resíduo %(mg)
G5CN06A	1ª etapa	30- 217	61,53 (3.47)	17,65
	2ª etapa	233-399	15,22 (1.048)	(0.9552mg)
G5CN06B	1ª etapa	30-217	60,87 (3.426)	20,76
	2ª etapa	225-399	14,87% (1.191)	(1.191mg)
G5CN06C	1ª etapa	30-221	66,18 (3.330)	11,82
	2ª etapa	231-405	16,97 (1.107)	(0.6383 mg)
G5CN06D	1ª etapa	32 - 209.93	64,45 (3.616)	14,03
	2ª etapa	230-394	20,00 (1.120)	(0.7859 mg)
5CN06	1ª etapa	218,13 - 307,13	72,51 (3.635)	12,03
	2ª etapa	-		(0.6030 mg)

Fonte: Autores (2022).

É importante ressaltar pela análise dos dados apresentados na Tabela 5 que o IFA isolado (5CN06) demonstra um único evento de perda de massa relacionado a degradação do fármaco com variação de temperatura $\Delta T^\circ = 278,13 - 307,13^\circ\text{C}$, com perda de massa de 72,51%. Já para os grânulos (Figura 3 b-e), todas as perdas de massas ocorreram em temperaturas próximas, uma das outras.

O primeiro evento dos grânulos com a média de $\Delta T^\circ = 30-221^\circ\text{C}$, corresponde a dessorção vinculada, uma vez que os grânulos são formados por uma emulsão com fase O/A, associada, ou seja sobreposta a descarboxilação e liberação de CO e CO₂ da malha polimérica do alginato (Wang et al., 2022), com um segundo evento com média $\Delta T^\circ = 225 - 405^\circ\text{C}$, corresponde a degradação do polissacarídeo e degradação dos produtos intermediários (Hadi et al., 2022; Lutfi et al., 2021; Wang et al., 2022). As temperaturas iniciais da etapa de degradação dos grânulos, iniciou após a temperatura inicial de degradação do fármaco, sugerindo interação entre os componentes, que pode ser favorável visto que retarda a degradação do fármaco, indicando melhora em sua estabilidade.

Figura 4. Curvas TGA/DTG do a) fármaco isolado 5CN06 e dos grânulos b) G5CN06A c) G5CN06B d) G5CN06C e) G5CN06D.

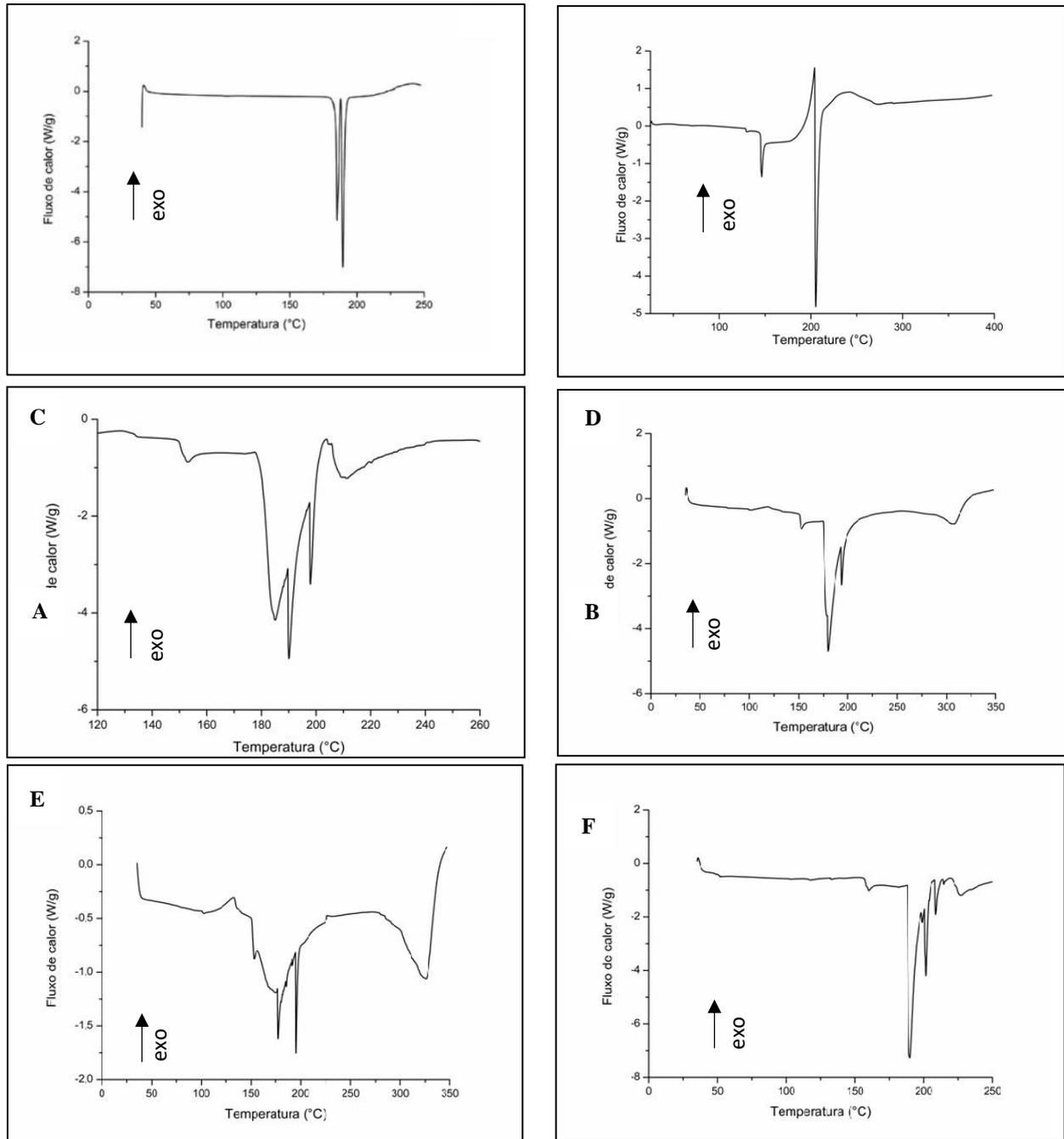


Fonte: Autores (2022).

Já as curvas DSC das amostras do IFA isolado 5CN06, polímero isolado e grânulos, estão representadas na Figura 5. É possível observar que o 5CN06 (Figura 5a) apresenta dois eventos referentes a fusão do IFA, em 186°C e 191°C, respectivamente. Já para o alginato isolado (Figura 4b), apresentou um evento endotérmico em torno de 152°C que, corresponde a transição vítrea (tg) do polímero, pelo relaxamento da malha devido a gelatinização e evaporação da água vinculada (Cáceres et al., 2022) e um segundo evento endotérmico em torno de 210°C (Khoshdouni Farahani et al., 2022) que corresponde as entalpias de clivagem, como quebra de ligações dentro do complexo. Essa banda endotérmica nítida indica um arranjo molecular altamente ordenado (cristalita) formando a chamada estrutura de alginato de cálcio (Flores-Hernández et al., 2021).

Dessa forma, é importante destacar que para G5CN06A, G5CN06B, G5CN06C e G5CN06D (Figura 4 c) os eventos endotérmicos observados estão nas mesmas temperaturas dos componentes isolados, com tg, ponto de fusão e decomposição do fármaco. A variação da constituição de volume interferiu apenas na capacidade de demonstrar maior ou menor energia para o acontecimento dos eventos. Para G5CN06C, por conter uma maior razão polimérica, interferiu na remodelação dos estados de transição da malha polimérica, quando em razão do calor. Segundo Nyamweya, et al. (Nyamweya, 2021) a tg dos polímeros hidrofílicos é influenciado por vários fatores, como a presença de líquidos plastificantes, ou ainda do sistema polímero-água. As moléculas dos líquidos, são, normalmente, de dimensões reduzidas e ficam retidas entre as cadeias poliméricas, afastando-as uma das outras, o que reduz as forças de atração intermoleculares polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias e conseqüente alterando o estado térmico.

Figura 5. Curvas DSC para (a) 5CN06 para o polímero isolado (b) AlNa (c) G5CN06A (b) G5CN06B (c) G5CN06C (d) G5CN06D.



Fonte: Autores (2022).

4. Considerações Finais

Portanto, preparamos grânulos biodegradáveis formados a partir do polímero alginato, que por gelificação ionotrópica asseguramos a formação com extensões distintas de razão polimérica, a partir de metodologia reprodutível, simples e de baixo custo. A redução da razão da solução de SAS3%, na mistura SAS3%:EO/A, com fator 25:75 não é ideal para formação dos grânulos, porém para valores acima dessa razão, forma-se grânulos com formatos esféricos. Nessa formação o rendimento foi de no mínimo $79,50\% \pm 0,03$ para G5CN06A e máximo de $108\% \pm 0,014$ para G5CN06B, sabendo que a alteração da proporção de polímero interfere nesse rendimento. Além disso a solubilidade do polímero, por enrijecimento da malha polimérica, permite

com haja pouco intumescimento após 3 horas de avaliação o que pode prolongar a permanência do fármaco nesse meio. A proporção de melhor eficiência de encapsulamento deu-se utilizando 10 mL das misturas de emulsão que contém o fármaco e 10 mL de solução de alginato de sódio a 3%, com 65,7%. A maior razão da mistura interferiu na capacidade de intumescimento e na estabilização térmica do fármaco, uma vez que essa variabilidade de proporção e constituição interfere na organização estrutural do grânulo. Dessa forma, o estudo desse sistema foi promissor, a partir das condições experimentais, para o entendimento da formação dos grânulos para liberação do composto derivado tiofênico 5CN06, com ação antifúngica.

Diante disso, uma perspectiva para trabalhos futuros seria a realização de um planejamento de superfície de resposta para definição das configurações ideais de trabalho de acordo com viáveis específicas que influenciam na obtenção do produto final, por exemplo: proporção de polímero, concentração de fármaco e verificação das alterações na solubilidade desta formulação no meio em diferentes tempos de contato. É fundamental que seja realizado após a execução desta etapa a efetuação do teste de liberação *in vitro* e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e posteriormente *in vivo* frente a diferentes cepas fúngicas com a finalidade de proporcionar um produto farmacêutico robusto, possibilitando a prospecção de futuras parcerias entre o setor industrial a universidade para produção e comercialização destes grânulos.

Referências

- Ahirrao, S. P., Gide, P. S., Shrivastav, B., & Sharma, P. (2014). Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology*, 2(1).
- Cáceres, D., Giménez, B., Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., Vergara, C., Romero-Hasler, P., Soto-Bustamante, E., & Robert, P. (2022). Incorporation of hydroxytyrosol alkyl esters of different chain length as antioxidant strategy in walnut oil spray-dried microparticles with a sodium alginate outer layer. *Food Chemistry*, 395, 133595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133595>
- Cruz, R. M. D., Mendonça-Junior, F. J. B., de Mélo, N. B., Scotti, L., de Araújo, R. S. A., de Almeida, R. N., & de Moura, R. O. (2021). Thiophene-based compounds with potential anti-inflammatory activity. *Pharmaceuticals*, 14(7), 692.
- Flores-Hernández, C. G., Cornejo-Villegas, M. L. A., Moreno-Martell, A., & Real, A. del. (2021). Synthesis of a biodegradable polymer of poly (Sodium alginate/ethyl acrylate). *Polymers*, 13(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/polym13040504>
- Freitas, E. D., Freitas, V. M. S., Rosa, P. C. P., da Silva, M. G. C., & Vieira, M. G. A. (2021). Development and evaluation of naproxen-loaded sericin/alginate beads for delayed and extended drug release using different covalent crosslinking agents. *Materials Science and Engineering C*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111412>
- Gonçalves, V. S. S., Gurikov, P., Poejo, J., Matias, A. A., Heinrich, S., Duarte, C. M. M., & Smirnova, I. (2016). Alginate-based hybrid aerogel microparticles for mucosal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.003>
- Hadi, A., Nawab, A., Alam, F., & Zehra, K. (2022). Alginate/aloë vera films reinforced with tragacanth gum. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100105>
- Jana, P., Shyam, M., Singh, S., Jayaprakash, V., & Dev, A. (2021). Biodegradable polymers in drug delivery and oral vaccination. In *European Polymer Journal* (Vol. 142). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110155>
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science* (Vol. 19, Issue 5, pp. 417–427). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>
- Kalidason, A., & Kuroiwa, T. (2022). Synthesis of chitosan–magnetite gel microparticles with improved stability and magnetic properties: A study on their adsorption, recoverability, and reusability in the removal of monovalent and multivalent azo dyes. *Reactive and Functional Polymers*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105220>
- Kazemi-Andalib, F., Mohammadikish, M., Divsalar, A., & Sahebi, U. (2022). Hollow microcapsule with pH-sensitive chitosan/polymer shell for in vitro delivery of curcumin and gemcitabine. *European Polymer Journal*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110887>
- Khoshdouni Farahani, Z., Mousavi, M., Seyedain Ardebili, S. M., & Bakhoda, H. (2022). Modification of sodium alginate by octenyl succinic anhydride to fabricate beads for encapsulating jujube extract. *Current Research in Food Science*, 5, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.11.014>
- Kim, E. S., Lee, J. S., & Lee, H. G. (2016). Calcium-alginate microparticles for sustained release of catechin prepared via an emulsion gelation technique. *Food Science and Biotechnology*, 25(5), 1337–1343. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0210-8>
- Kost, B., Kunicka-Styczyńska, A., Plucińska, A., Rajkowska, K., Basko, M., & Brzeziński, M. (2022). Microfluidic preparation of antimicrobial microparticles composed of l-lactide/1,3-dioxolane (co)polymers loaded with quercetin. *Food Chemistry*, 396, 133639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133639>
- Li, W., Chen, J., Zhao, S., Huang, T., Ying, H., Trujillo, C., Molinaro, G., Zhou, Z., Jiang, T., Liu, W., Li, L., Bai, Y., Quan, P., Ding, Y., Hirvonen, J., Yin, G., Santos, H. A., Fan, J., & Liu, D. (2022). High drug-loaded microspheres enabled by controlled in-droplet precipitation promote functional recovery after spinal cord injury. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28787-7>

- Lobo, C., Castellari, J., Colman Lerner, J., Bertola, N., & Zaritzky, N. (2020). Functional iron chitosan microspheres synthesized by ionotropic gelation for the removal of arsenic (V) from water. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1575–1583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.253>
- Lopes, A. M., Santos-Ebinuma, V. D. C., Apolinário, A. C., Mendonça, F. J. B., Damasceno, B. P. G. D. L., Pessoa, A., & da Silva, J. A. (2014). 5CN05 partitioning in an aqueous two-phase system: A new approach to the solubilization of hydrophobic drugs. *Process Biochemistry*, 49(9), 1555–1561. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.017>
- Luna, I., Neves, W. W., De Lima-Neto, R.G., Albuquerque, A. P. B., Pitta, M. G. R.; Rêgo, M. J. B. M., Neves, R. P., Scotti, M. T., Mendonça-Junior, F. J. B. (2021). Design, Synthesis and Antifungal Activity of New Schiff Bases Bearing 2-Aminothiophene Derivatives Obtained by Molecular Simplification. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 32 (5), 1017-1029. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210004>
- Lutfi, Z., Kalim, Q., Shahid, A., & Nawab, A. (2021). Water chestnut, rice, corn starches and sodium alginate. A comparative study on the physicochemical, thermal and morphological characteristics of starches after dry heating. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.128>
- Mendonça-Junior, F. J. B., Lima-Neto, R. G., Oliveira, T. B., Lima, M. C. A., Pitta, I. R., Galdino, S. L., Cruz, R. M. D., Araújo, R. S. A., & Neves, R. P. (2011). Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives Antileishmanial Activity of new Thiophene-indole Hybrids View project. <https://www.researchgate.net/publication/265725723>
- Moreira, A. I., Campos, J. B. L. M., & Miranda, J. M. (2022). Characterization of gelatin microparticle production in a flow focusing microfluidic system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 647. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129079>
- Neves, W. W., Neves, R. P., Macêdo, D. P. C., Eleamne, G. R. A., Kretzchmar, E. A. M., Oliveira, E. E., Medonça-Junior, F. J. B., Lima-Neto, R. G. (2020). Incorporation of 2-amino-thiophene derivative in nanoparticles: enhancement of antifungal activity. *Brazilian Journal do Microbiology*, 20, 647-655. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00248-7>
- Nyamweya, N. N. (2021). Applications of polymer blends in drug delivery. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00167-2>
- Oliveira, V. S., Cruz, M. M., Bezerra, G. S., Silva, N. E. S., Nogueira, F. H. A., Chaves, G. M.; Sobrinho, J. L. S., Mendonça-Júnior, F. J. B., Damasceno, B. P. G. L., Converti, A., Lima, A. A. N. (2022). Chitosan-Based Films with 2-Aminothiophene Derivative: Formulation, Characterization and Potential Antifungal Activity. *Marine Drugs*, 20, 103. <https://doi.org/10.3390/md20020103>
- Pinto, E., Queiroz, M. J. R. P., Vale-Silva, L. A., Oliveira, J. F., Begouin, A., Begouin, J. M., & Kirsch, G. (2008). Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(17), 8172–8177. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.042>
- Reddy, S. G. (2022). Alginates-A Seaweed Product: Its Properties and Applications. In I. Deniz & E. Imamoglu (Eds.), *Properties and Applications of Alginates* (1st ed., Vol. 1, pp. 0–174). <https://doi.org/10.5772/intechopen.94635>
- Roy, H., Nayak, B. S., Maddiboyina, B., & Nandi, S. (2022). Chitosan based urapidil microparticle development in approach to improve mechanical strength by cold hyperosmotic dextrose solution technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 103745. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103745>
- Saqib, Md. N., Khaled, B. M., Liu, F., Zhong, F. (2022) Hydrogel beads for designing future foods: Structures, mechanisms, applications, and challenges. *Food Hydrocolloids for Health* 2, 100073. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100073>
- Shaikh, M. A. J., Gilhotra, R., Pathak, S., Mathur, M., Iqbal, H. M. N., Joshi, N., & Gupta, G. (2021). Current update on psyllium and alginate incorporate for interpenetrating polymer network (IPN) and their biomedical applications. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 191, pp. 432–444). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.115>
- Soeiro, V. S., Tundisi, L. L., Novaes, L. C. L., Mazzola, P. G., Aranha, N., Grotto, D., Júnior, J. M. O., Komatsu, D., Gama, F. M. P., Chaud, M. v., & Jozala, A. F. (2021). Production of bacterial cellulose nanocrystals via enzymatic hydrolysis and evaluation of their coating on alginate particles formed by ionotropic gelation. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100155>
- Sousa, V.D., Driessanack, M., Mendes, I. A. C. (2007) An overview of research designs relevant to nursing: part 1: quantitativ research designs. *Rev Latino-am Enfermagem*, 15(3) 502-7. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692007000300022>
- Szabó, T., Mihály, J., Sajó, I., Telegdi, J., & Nyikos, L. (2014). One-pot synthesis of gelatin-based, slow-release polymer microparticles containing silver nanoparticles and their application in anti-fouling paint. *Progress in Organic Coatings*, 77(7), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2014.02.007>
- Szekalska, M., Sosnowska, K., Czajkowska-Kósnik, A., & Winnicka, K. (2018). Calcium chloride modified alginate microparticles formulated by the spray drying process: A strategy to prolong the release of freely soluble drugs. *Materials*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/ma11091522>
- Trinh, K. T. L., Le, N. X. T., & Lee, N. Y. (2021). Microfluidic-based fabrication of alginate microparticles for protein delivery and its application in the in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102735>
- Upadhyay, M., Vardhan, H., & Mishra, B. (2020). Natural polymers composed mucoadhesive interpenetrating buoyant hydrogel beads of capecitabine: Development, characterization and in vivo scintigraphy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101480>
- Wang, X., Hou, X., Zou, P., Huang, A., Zhang, M., & Ma, L. (2022). Cationic starch modified bentonite-alginate nanocomposites for highly controlled diffusion release of pesticides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.148>
- Winnicka, K. (2021). Special issue: Advanced materials in drug release and drug delivery systems. In *Materials* (Vol. 14, Issue 4, pp. 1–4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14041042>

Yang, D., Gao, K., Bai, Y., Lei, L., Jia, T., Yang, K., & Xue, C. (2021). Microfluidic synthesis of chitosan-coated magnetic alginate microparticles for controlled and sustained drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.057>

Yang, N., Liu, S., & Yang, X. (2015). Molecular simulation of preferential adsorption of CO₂ over CH₄ in Na-montmorillonite clay material. *Applied Surface Science*, 356, 1262–1271. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.08.101>

Yu, L., Sun, Q., Hui, Y., Seth, A., Petrovsky, N., & Zhao, C. X. (2019). Microfluidic formation of core-shell alginate microparticles for protein encapsulation and controlled release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 539, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.12.075>

Zhang, C., Grossier, R., Candoni, N., & Veessler, S. (2021). Preparation of alginate hydrogel microparticles by gelation introducing cross-linkers using droplet-based microfluidics: a review of methods. In *Biomaterials Research* (Vol. 25, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40824-021-00243-5>

Zheng, W., Zhang, H., Wang, J., Wang, J., Yan, L., Liu, C., & Zheng, L. (2022). Pickering emulsion hydrogel based on alginate-gellan gum with carboxymethyl chitosan as a pH-responsive controlled release delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 216, 850–859. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.223>