

Luis Felipe Costa Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS LIPÍDICAS
CONTENDO QUERCETINA PARA A ADMINISTRAÇÃO
PULMONAR VISANDO O TRATAMENTO DE ASMA.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia
Orientador: Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos-
Senna

Florianópolis

2011

Dedico à minha mãe, Isabel, minha avó, Irma, ao Abreu, e à minha namorada, Ana, pelo apoio, carinho e suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^a. Elenara Lemos-Senna pela orientação, dedicação, paciência, e pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, à Marli Soldi, ao Prof. Dr. Fálvio H. Reginatto, à Prof.^a Dr.^a Claudia Sayer e seu aluno Paulo Feuser, à Prof^ª. Dr^a. Cláudia M. O. Simões, à Prof^ª. Dr^a. Angela Machado de Campos, e ao Luigi Marins Barretta pelas colaborações, atenção, e disponibilidade para realização deste trabalho.

Em especial ao Prof. Dr. Adilson Luiz Chinelatto por ter me recebido tão bem em Ponta Grossa para realização do ensaio de porosimetria de mercúrio. Ao LCME/UFSC, especificamente ao Luciano, pelas várias análises no MEV. E ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos pelas colaborações, pela disponibilidade e pela prontidão em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento: Sandra, Nilson e Solange pelo auxílio ao longo deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório Bianca, Clarissa, Cristian, Cristiana, Gecioni Georgia, Letícia, Luiza, Luigi, Mariana, e Talitha pelos momentos compartilhados, de descontração, pelas conversas, e troca de ideias. Mas um agradecimento especial à Cris, por toda a paciência, incentivo, e ensinamentos desde a época de IC. E à Georgia, que sempre esteve presente, disponível, e por ter sido, às vezes, meus dois braços ao longo deste trabalho, além da amizade e dedicação.

Aos meus amigos, em especial ao Zé, por todo apoio, amizade, e companheirismo. À Tati, ao Gui e ao Du, pela amizade, e aos meus tios, por todo o apoio.

À minha mãe, Isabel, ao Abreu, à minha avó Irma, pelo apoio incondicional, incentivo, e pelo sacrifício ao longo de todos estes anos. Agradeço por me ensinarem o significado de caráter e pelo exemplo de luta e dedicação. À Ana, pela cumplicidade, carinho, apoio, paciência, e tolerância nestes anos, às discussões sobre o rumo do trabalho e às ideias dadas. Ao Seu Henrique e à Dona Tânia. E à Zoe, por estar sempre ao meu lado.

E a todos, que mesmo não citados, colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

**“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem
perder entusiasmo”**

Winston Churchill

RESUMO

Esse trabalho teve com objetivo desenvolver micropartículas lipídicas contendo quercetina com vistas à sua liberação pulmonar, para o tratamento da asma. As micropartículas foram obtidas a partir de uma mistura de trimiristato de glicerila e lecitina de soja (MTL), pela técnica de difusão do solvente a quente, ou a partir do behenato de glicerila, na presença (MBL) ou ausência de lecitina (MB) de soja, pelo método de homogeneização a quente. A quercetina foi adicionada nas formulações na proporção de 1:25 e 1:50 em relação à massa de lipídio. Valores de EE e teor de fármaco (mg/100mg) variaram de 29,35 a 99,80% e 0,52 a 3,84% (m/m), respectivamente. Partículas esféricas e de superfície rugosas foram obtidas, conforme mostrado nas micrografias obtidas por MEV. As micropartículas apresentaram porosidade entre 68,83 e 85,94%, baixos valores de densidade bruta e de compactação e propriedades de fluidez variáveis entre boa e favorável a tolerável, conforme valor calculado de Índice de Carr. As micropartículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro geométrico (MMGD) pela técnica de difração a laser. Os valores de diâmetro médio equivalente em volume variaram de 6,67 a 8,43 μm , 18,16 a 26,71 μm e 23,11 a 34,30 μm para MTL, MB e MBL, respectivamente. Entretanto, valores de $d_{50\%}$ (diâmetro correspondente a 50% da distribuição acumulada) foram menores variando de 5,59 a 6,84 μm , 6,23 a 9,04 μm e 17,53 a 25,62 μm para MTL, MB e MBL, respectivamente. A partir dos dados de porosidade, densidade esquelética, MMGD, e $d_{50\%}$, os valores de diâmetro aerodinâmico (MMAD) foram calculados e variaram entre 3 a 12,5 μm , respectivamente. Com base nesses resultados, as micropartículas de trimiristato de glicerila mostraram características mais aceitáveis para a administração pulmonar, enquanto aquelas preparadas com behenato de glicerila contendo lecitina de soja apresentaram valores de $\text{MMAD}_{50\%}$ adequados, indicando que somente uma fração fina respirável das partículas é capaz de se depositar nas regiões mais profundas do pulmão. As análises por calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X das matérias-primas e das micropartículas de trimiristato de glicerila e behenato de glicerila evidenciaram a presença dos polimorfos β e β' , respectivamente, indicando que a técnica de preparação não conduziu a alterações polimórficas. Por espectroscopia Raman ainda foi possível visualizar a existência de interação entre o behenato de glicerila e a lecitina de soja,

uma vez que houve grande interferência na intensidade Raman devido fluorescência da lecitina, fator não observado nas amostras com trimiristato de glicerila contendo lecitina de soja. A quercetina foi avaliada ainda quanto a sua estabilidade química frente ao processo de preparação das micropartículas por espectroscopia no UV sendo observado que este não interfere na integridade química do polifenol. O perfil de liberação da quercetina a partir das micropartículas lipídicas foi afetado pela composição das formulações, conforme evidenciado pela análise da ANOVA dos valores de eficiência de dissolução. O conjunto dos resultados mostrou que as micropartículas lipídicas apresentam grande potencial para carrear a quercetina para os pulmões.

Palavras-chave: Micropartículas lipídicas; Administração pulmonar; Quercetina; Trimiristato de glicerila; e Behenato de glicerila.

ABSTRACT

Title: Development and characterization of quercetin-loaded lipid microparticles for pulmonary drug delivery to treat asthma.

The aim of this study was to develop quercetin-loaded lipid-based microparticles for pulmonary delivery. The microparticles were prepared from a mixture of glyceryl trimyristate and soy lecithin (MTL), by the hot solvent diffusion method, or from glyceryl behenate, in the presence (MBL) or absence of soy lecithin (MB), by hot homogenization method. Quercetin was added to the formulations in a ratio of 1:25 or 1:50 (w/w), regarding the total lipid weight. Encapsulation efficiency and drug content varied from 29.35 e 99.80%, and from 0.52 e 3.84 % (w/w), respectively. Particles displaying spherical shape and rough surface were obtained as it was visualized by SEM. The microparticles displayed porosity values varying from 68.83 to 85.94%, low bulk and tapped densities, and good to favorable to tolerable flowability, according to Carr's index. The mean geometric diameters (MMGD) of the particle and size distribution were evaluated by laser diffraction. The mean equivalent volume diameter varied from 6.67 to 8.43 μm , 18.16 to 26.71 μm , and 23.11 to 34.30 μm for MTL, MB e MBL, respectively. On the other hand, $d_{50\%}$ values were lower than $d_{[4,3]}$, and they varied from 5.59 to 6.84 μm , from 6.23 to 9.04 μm , and 17.53 to 25.62 μm for MTL, MB e MBL, respectively. The aerodynamic diameter (MMAD) were estimated from the porosity, skeletal density, MMGD, and $d_{50\%}$ values and they varied from 3 to 12.5 μm , respectively. Considering the particle size results, microparticles prepared from glyceryl trimyristate exhibited acceptable properties for pulmonary administration. However, those prepared from glyceryl behenate and soy lecithin displayed only MMAD_{50%} acceptable values, indicating that barely a powder fraction is able to reach the deeper lung regions. The analyses of the lipid-based microparticles and the raw materials evidenced the presence of the β e β' polymorphs for glyceryl trimyristate and glyceryl behenate, respectively, indicating that no polymorphic transition occurred by using both microparticle preparation techniques. By Raman spectroscopy was still possible to observe the existence of interactions between the glyceryl behenato and soy lecithin, since there was a significant interference in Raman intensity due to fluorescence of the lecithin, a characteristic that was not

observed in samples prepared from glyceryl trimyristate and soy lecithin. The chemical stability of quercetin during the preparation of the microparticles was examined by UV spectroscopy, and it was demonstrated the preparation method did not affect the chemical integrity of this polyphenol. The quercetin release rate was affected by the composition of the formulations, as indicated by the ANOVA carried out using the dissolution efficiency values obtained from the release profile. The results taken together demonstrated that lipid-based microparticles displayed a great potential to carry quercetin into the pulmonary tract.

Keywords: Lipid-based microparticles; Pulmonary drug delivery; Quercetin; Glyceryl trimyristate; and Glyceryl behenate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa mundial da prevalência de asma	35
Figura 2 - Diagrama esquemático de um corte transversal de bronquíolo, evidenciando as alterações que ocorrem na asma crônica	37
Figura 3 – Estrutura química da quercetina	38
Figura 4 – Principais metabólitos da quercetina	41
Figura 5 – Fatores que determinam a deposição de partículas inaladas	48
Figura 6 – Relação entre o tamanho de partícula e a porcentagem de deposição no trato respiratório	49
Figura 7 – Variedade de interações partícula-superfície	50
Figura 8 – Espectro de absorção no UV/Vis das amostras: (A) MT; (B) MB; (C) MBF; e de uma solução padrão de quercetina 5,0 µg/mL	80
Figura 9 – Curva de calibração da quercetina em metanol	81
Figura 10 – Espectros de varredura no UV/Vis das amostras: (A) Solução padrão de quercetina em metanol:água (40:60, v/v) X mg/mL; (B) Solução de quercetina induzida à hidrólise alcalina pH 9,0 após 6 horas a 80° C; (C) Solução de quercetina induzida à oxidação na presença de peróxido de hidrogênio após 6 horas; (D) Solução de quercetina induzida à degradação térmica a 150° C após 60 horas; (E) Solução obtida após extração da quercetina a partir de MTL _{Q1:25} ; (F) Solução obtida após extração da quercetina a partir de MBL _{Q1:25}	88
Figura 11 – Micrografias de: (A) MTL; (B) MTL _{Q1:25} ; e (C) MTL _{Q1:50}	90
Figura 12 – Micrografia de: (A) MB; (B) MB _{Q1:25} ; (C) MB _{Q1:50} ; (D) MBL; (E) MBL _{Q1:25} ; (F) MBL _{Q1:50}	91
Figura 13 – Curva de intrusão acumulativa de mercúrio pelo log da pressão das micropartículas lipídicas preparadas a partir do (I) trimiristato de glicerila e do (II) behenato de glicerila. (IA) MTL; (IB) MTL _{Q1:25} ; (IC) MTL _{Q1:50} ; (IIA) MB; (IIB) MB _{Q1:25} ; (IIC) MBL; (IID) MBL _{Q1:25}	94
Figura 14 – Curvas de intrusão porosimétrica obtidas a partir das micropartículas lipídicas preparadas com (I) trimiristato de glicerila e (II) behenato de glicerila: (IA) MTL; (IB) MTL _{Q1:25} ; (IC) MTL _{Q1:50} ; (IIA) MB; (IIB) MB _{Q1:25} ; (IIC) MBL; (IID) MBL _{Q1:25}	94

Figura 15 – Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila: (A) MTL; (B) MTL _{Q1:25} ; e (C) MT _{Q1:50}	96
Figura 16 – Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas lipídicas preparadas a partir do behenato de glicerila: (A) MB; (B) MB _{Q1:25} ; e (C) MB _{Q1:50} , (D) MBL; (E) MBL _{Q1:25} ; e (F) MBL _{Q1:50}	96
Figura 17 – Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Trimiristato de glicerila; (B) Quercetina; (C) Lecitina de soja; (D) MTL; (E) MTL _{Q1:25} ; e (F) MTL _{Q1:50} .	101
Figura 18 – Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MB; (D) MB _{Q1:25} ; e (E) MB _{Q1:50} .	102
Figura 19 – Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) Lecitina de soja; (D) MBL; (E) MBL _{Q1:25} ; e (F) MBL _{Q1:50} .	102
Figura 20 – Espectro Raman das amostras; (A) Trimiristato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MTL; (D) MTL _{Q1:25} ; (E) MTL _{Q1:50} .	106
Figura 21 – Espectro Raman das amostras; (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MB; (D) MB _{Q1:25} ; (E) MB _{Q1:50}	106
Figura 22 - Espectro Raman do (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MBL; (D) MBL _{Q1:25} ; (E) MBL _{Q1:50}	107
Figura 23 – Curvas de DSC do (A) Trimiristato de glicerila; (B) Behenato de glicerila; (C) Quercetina dihidratada	110
Figura 24 – Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de trimiristato de glicerila: (A) Lecitina de soja; (B) Trimiristato de glicerila; (C) MTL; (D) MTL _{Q1:25} ; (E) MTL _{Q1:50}	111
Figura 25 – Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja: (A) Behenato de glicerila; (B) MB; (C) MB _{Q1:25} ; (D) MB _{Q1:50} .	112
Figura 26 – Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de behenato de glicerila na presença de lecitina de soja: (A) Lecitina de soja; (B) Behenato de glicerila; (C) MBL; (D) MBL _{Q1:25} ; (E) MBL _{Q1:50} .	113

- Figura 27 – Espectro no UV/Vis da quercetina (A) antes e (B) depois de 24 horas de agitação magnéticos nos meios de dissolução: (I) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4; (II) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) pH 7,4; (III) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μ M com pH 7,4; (IV) solução de PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μ M e ácido ascórbico 0,05% (m/V) em pH 7,4; (V) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μ M e ácido ascórbico 0,1% (m/V) em pH 7,4; (VI) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μ M e metabissulfito de sódio 0,5% (m/V) em pH 7,4; (VII) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 25 μ M e metabissulfito de sódio 1% (m/V) em pH 7,4; (VIII) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 25 μ M e metabissulfito de sódio 1% (m/V) em pH 7,4; (IX) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 50 μ M e metabissulfito de sódio 1% (m/V) em pH 7,4; (X) PEG 400:Água 2:8 (V/V) com pH 4,0; (XI) PEG 400:Água 3:7 (V/V) com pH 4,0; e (XII) PEG 400:Água 4:6 (V/V) com pH 4,0 116
- Figura 28 – Curva de calibração da quercetina em PEG 400:água pH 4,0 (4:6, V/V) 118
- Figura 29 – Perfil de liberação da quercetina: (Δ) MTL_{Q1:25}; (\blacktriangle) MTL_{Q1:50}; e (\square) Quercetina livre 119
- Figura 30 – Perfil de liberação *in vitro* da quercetina: (Δ) MB_{Q1:25}; (\blacktriangle) MB_{Q1:50}; e (\square) Quercetina livre 119
- Figura 31 – Perfil de liberação *in vitro* da quercetina: (Δ) MBL_{Q1:25}; (\blacktriangle) MBL_{Q1:50}; e (\square) Quercetina livre 120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas lipídicas de trimiristato de glicerila (MTL)	61
Tabela 2 - Composição das formulações de micropartículas lipídicas de behenato de glicerila (MB)	62
Tabela 3 – Composição das formulações de micropartículas lipídicas de behenato de glicerila contendo lecitina de soja (MBL)	62
Tabela 4 – Relação fluidez e índice de Carr	71
Tabela 5 – Concentração de quercetina na solução metanólica após extração a partir das micropartículas lipídicas	79
Tabela 6 – Dados obtidos pela análise da variância (ANOVA) da curva de extração de quercetina a partir da amostra MTL _{Q1:25} ($\alpha = 0,05$)	79
Tabela 7 – Análise da variância (ANOVA) da curva de extração de quercetina a partir da amostra MB _{Q1:25} ($\alpha = 0,05$)	80
Tabela 8 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método UV para determinação da quercetina	82
Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método UV para determinação da quercetina	82
Tabela 10 – Recuperação da quercetina após contaminação das amostras de MLT e MB com uma solução padrão	83
Tabela 11 – Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da quercetina por UV	84
Tabela 12 – Análise da variância (ANOVA) da robustez realizada a partir da amostra MTL _{Q1:25} ($\alpha = 0,05$)	84
Tabela 13 – Análise da variância (ANOVA) da robustez realizada a partir da amostra MB _{Q1:25} ($\alpha = 0,05$)	85
Tabela 14 – Eficiência de encapsulação (EE%) e teor de quercetina nas micropartículas lipídicas (n = 3)	86
Tabela 15 – Análise da variância (ANOVA) do teor de quercetina das micropartículas	86
Tabela 16 – Análise da variância (ANOVA) da eficiência de encapsulação da quercetina nas micropartículas	86
Tabela 17 – Densidade bruta e de compactação das micropartículas lipídicas	93
Tabela 18 – Características porosimétricas das micropartículas lipídicas	95
Tabela 19 – Diâmetros geométricos médios das micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila	97

Tabela 20 – Diâmetro aerodinâmico médio das micropartículas lipídicas e diâmetro aerodinâmico correspondente a 50% da distribuição acumulada	99
Tabela 21 – Índice de Carr e classificação da fluidez das micropartículas lipídicas	100
Tabela 22 – Distâncias interplanares, segundo a Lei de Bragg, e forma polimórfica do trimiristato de glicerila e das micropartículas lipídicas preparadas a partir deste triacilglicerol	103
Tabela 23 – Distâncias interplanares, segundo a Lei de Bragg, e forma polimórfica do behenato de glicerila e das micropartículas lipídicas preparadas a partir desta mistura de acilgliceróis.	103
Tabela 24 – Posição (2θ) dos principais picos de difração de raios-X da quercetina apresentada neste estudo e de cinco amostras de quercetina encontradas na literatura.	104
Tabela 25 – Número de onda (cm^{-1}) das matérias-primas obtidos experimentalmente e descritos na literatura	107
Tabela 26 – Parâmetros termoanalíticos obtidos a partir das curvas de DSC das matérias-primas e das micropartículas lipídicas	113
Tabela 27 – Avaliação da solubilidade da quercetina em misturas apresentando proporções de PEG e água	117
Tabela 28 – Resultados de eficiência de dissolução das micropartículas	121
Tabela 29 – Análise da variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$) obtida a partir da eficiência de dissolução da quercetina a partir das micropartículas lipídicas obtidos após 24 horas de ensaio	121

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Limite de detecção	64
Equação 2	Limite de quantificação	64
Equação 3	Recuperação	65
Equação 4	Teor	66
Equação 5	Eficiência de encapsulação	66
Equação 6	Densidade bruta	68
Equação 7	Densidade de compactação	68
Equação 8	Span	69
Equação 9	Diâmetro aerodinâmico médio (MMAD)	70
Equação 10	Valor de r para cálculo do MMAD	70
Equação 11	Densidade aparente esquelética	70
Equação 12	Diâmetro aerodinâmico médio de 50% do volume da curva acumulada (MMAD _{50%})	70
Equação 13	Índice de Carr	71
Equação 14	Lei de Bragg	72
Equação 15	Cristalinidade relativa	73
Equação 1	Limite de detecção	74
Equação 2	Limite de quantificação	74
Equação 16	Eficiência de dissolução	75
Equação 17	Diferença mínima significativa	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise da Variância
ASC – Área Sob a Curva
BALF – Fluido do Lavado Broncoalveolar (do inglês, Bronchoalveolar Lavage Fluid)
BSA – Albumina Sérica Bovina (do inglês, Bovine Serum Albumine)
CCL11 – Quimiocina ligante 11
COMT – Catecol-*O*-metil transferase
 $d_{10\%}$, $d_{50\%}$, e $d_{90\%}$ – Diâmetro Correspondente a 10%, 50%, ou 90% da Distribuição Acumulada, respectivamente
 d_b – Densidade bruta
 d_c – Densidade de Compactação
d.m.s. – Diferença Mínima Significativa
DPPC – 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina
DPR – Desvio Padrão Relativo
 d_s – Densidade Aparente Esquelética
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
ED – Eficiência de Dissolução
EE – Eficiência de Encapsulação
 $F_{\text{calculado}}$ – Valor de F calculado
 $F_{\text{crítico}}$ – Valor de F tabelado ao nível de significância de 5%
GL – Grau de Liberdade
HCM-1 – Linhagem de mastócitos humanos
ICH – Conferência Internacional de Harmonização (do inglês, International Conference on Harmonisation)
IFN- γ – Interferon- γ
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
MB – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja sem adição de quercetina
MBL – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na presença de lecitina de soja sem adição de quercetina
MBL_{Q1:25} – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na presença de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:25 (m/m) à massa do behenato de glicerila

MBL_{Q1:50} – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na presença de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:50 (m/m) à massa do behenato de glicerila

MB_{Q1:25} – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:25 (m/m) à massa do behenato de glicerila

MB_{Q1:50} – Micropartículas preparadas com behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:50 (m/m) à massa do behenato de glicerila

MMAD – Diâmetro Aerodinâmico Médio Mássico

MMAD_{50%} – Diâmetro Aerodinâmico Médio Mássico Correspondente a 50% da Distribuição Acumulada

MMGD – Diâmetro Geométrico Médio

MMP-9 – Metil metaloproteína 9

MQ – Média dos Quadrados

MTL – Micropartículas preparadas com trimiristato de glicerila na presença de lecitina de soja sem adição de quercetina

MTL_{Q1:25} – Micropartículas preparadas com trimiristato de glicerila na presença de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:25 (m/m) à massa do trimiristato de glicerila

MTL_{Q1:50} – Micropartículas preparadas com trimiristato de glicerila na presença de lecitina de soja com adição de quercetina na proporção 1:50 (m/m) à massa do trimiristato de glicerila

NF-κB – Fator de necrose κB

o/a – Óleo em água

PEG – Polietilenoglicol

PLGA – Poli(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)

PMACI - 12-miristato, 13-acetato forbol e ionoforo de cálcico

QMR – Quadrado Médio do Resíduo

r² – Coeficiente de Regressão Linear

RPM – Rotações por Minuto

SpA – Proteína surfactante A

SQ – Soma dos Quadrados

ST – Sulfotransferase

SUS – Sistema Único de Saúde

Th – Linfócitos T *helper*

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral α

UGT - Uridina-difosfato glicoronosil trasferase

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO	29
	BIBLIOGRÁFICA	
1.1	INTRODUÇÃO	31
1.2	OBJETIVOS	33
1.2.1	Objetivos gerais	33
1.2.2	Objetivos específicos	33
1.3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
1.3.1	A asma	35
1.3.1.1	Dados epidemiológicos	35
1.3.1.2	Patogênese da asma	36
1.3.2	Quercetina	38
1.3.2.1	Propriedades químicas e físico-químicas	38
1.3.2.2	Propriedades farmacocinéticas	39
1.3.2.3	Quercetina como perspectiva no tratamento da asma	42
1.3.3	Via de administração pulmonar	44
1.3.3.1	Anatomia e fisiologia do trato respiratório	44
1.3.3.2	Fatores que afetam a eficácia de pós inaláveis	46
<i>1.3.3.2.1</i>	<i>Deposição de partículas no trato respiratório</i>	<i>46</i>
<i>1.3.3.2.2</i>	<i>Propriedades físicas das partículas</i>	<i>49</i>
<i>1.3.3.2.3</i>	<i>Fatores fisiológicos e patológicos que afetam a eficácia dos pós inaláveis</i>	<i>51</i>
1.3.4	Carreadores de fármacos para administração pulmonar	52
1.3.4.1	Micropartículas poliméricas	53
1.3.4.2	Micropartículas preparadas a partir de carboidratos	53
1.3.4.3	Micropartículas lipídicas	54
2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1	MATERIAIS	59
2.1.1	Matérias-primas	59
2.1.2	Reagentes e outros materiais	59
2.1.3	Equipamentos	59
2.2	MÉTODOS	61
2.2.1	Preparação das micropartículas lipídicas	61
2.2.1.1	Preparação das micropartículas lipídicas de trimiristato de glicerila (MTL)	61
2.2.1.2	Preparação das micropartículas lipídicas de behenato de glicerila (MB e MBL)	62
2.2.2	Determinação do teor e da eficiência de	

	encapsulação da quercetina por espectroscopia de absorção no ultravioleta	63
2.2.2.1	Determinação do tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas	63
2.2.2.2	Validação da técnica de quantificação da quercetina nas micropartículas	62
2.2.2.2.1	<i>Especificidade</i>	63
2.2.2.2.2	<i>Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)</i>	64
2.2.2.2.3	<i>Precisão</i>	64
2.2.2.2.4	<i>Exatidão</i>	65
2.2.2.2.5	<i>Robustez</i>	65
2.2.2.3	Determinação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas	65
2.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA QUERCETINA FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	66
2.3.1	Degradação por hidrólise	66
2.3.2	Degradação por oxidação	67
2.3.3	Degradação térmica da quercetina no estado sólido	67
2.3.4	Análise por espectroscopia de absorção no UV/Vis	67
2.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	68
2.4.1	Avaliação da morfologia das micropartículas lipídicas	68
2.4.2	Determinação da densidade bruta e de compactação	68
2.4.3	Determinação da porosidade das micropartículas lipídicas por porosimetria de mercúrio	69
2.4.4	Avaliação do tamanho médio e distribuição granulométrica das micropartículas lipídicas	69
2.4.4.1	Tamanho e distribuição granulométrica das partículas	69
2.4.4.2	Determinação do diâmetro aerodinâmico médio (MMAD)	70
2.4.5	Avaliação das propriedades de fluxo das micropartículas	71
2.4.6	Difração de Raios-X	71
2.4.7	Espectroscopia de Raman	72
2.4.8	Análise por espectroscopia de absorção no UV/Vis	72
2.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO IN	

	VITRO DA QUERCETINA A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	73
2.5.1	Seleção do meio de dissolução	73
2.5.1.1	Avaliação da estabilidade da quercetina nos diferentes meios de dissolução	73
2.5.1.2	Avaliação da solubilidade da quercetina no meio de dissolução	73
2.5.2	Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	74
2.5.3	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da quercetina a partir das micropartículas lipídicas	75
2.6	Análise estatística	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
3.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR E DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA QUERCETINA	79
3.1.1	Determinação do tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas	79
3.1.2	Validação da técnica de quantificação da quercetina nas micropartículas	80
3.1.2.1	Especificidade	80
3.1.2.2	Linearidade	81
3.1.2.3	Precisão intra- e interdia	81
3.1.2.4	Exatidão	82
3.1.2.5	Robustez	83
3.1.3	Determinação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas	85
3.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA QUERCETINA FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	87
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	89
3.3.1	Avaliação da morfologia das micropartículas lipídicas	89
3.3.2	Determinação da densidade bruta e de compactação	92
3.3.3	Determinação da porosidade das micropartículas lipídicas	93
3.3.4	Avaliação do tamanho médio e distribuição granulométrica das micropartículas lipídicas	95
3.3.4.1	Tamanho e distribuição granulométrica das partículas (MMGD)	95

3.3.4.2	Determinação do diâmetro aerodinâmico médio (MMAD)	98
3.3.5	Avaliação das propriedades de fluxo das micropartículas	100
3.3.6	Difração de Raios-X	101
3.3.7	Espectroscopia Raman	105
3.3.8	Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	109
3.4	ENSAIO <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA NAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS	114
3.4.1	Seleção do meio de dissolução	114
3.4.1.1	Avaliação da estabilidade da quercetina nos diferentes meios de dissolução	114
3.4.1.2	Avaliação da solubilidade da quercetina nos meios de dissolução selecionados	117
3.4.2	Linearidade e limites de detecção e de quantificação	118
3.4.3	Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da quercetina a partir das micropartículas lipídica	118
4	CONCLUSÕES	123
	BIBLIOGRAFIAS	129

***1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO
BIBLIGRÁFICA***

1.1 INTRODUÇÃO

Torna-se cada vez mais evidente que somente o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para atender as necessidades terapêuticas. As limitações inerentes às substâncias ativas, como o alcance de concentrações plasmáticas insuficientes, altos índices de flutuação plasmática do fármaco, elevado metabolismo, rápida eliminação pelos fluidos corporais, distribuição inadequada, elevada toxicidade, baixa solubilidade aquosa (reduzindo a absorção intestinal ou dificultando a preparação de formas farmacêuticas líquidas), entre outras, têm restringido a introdução de novos medicamentos no mercado farmacêutico mundial (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Os sistemas de pós inaláveis são uma modalidade atrativa para o tratamento de várias desordens pulmonares, entre elas, a asma. Para estas doenças, a vetorização do fármaco no pulmão é altamente desejável devido ao aprimoramento das concentrações efetivas no sítio da patologia, bem com mínima absorção sistêmica e efeitos adversos. Este sistema deve prover liberação sustentada, a fim de reduzir a frequência de administração, elevando sua aceitabilidade e a adesão do paciente ao tratamento (YANG et al., 2009). A microencapsulação de fármacos tem sido considerada uma importante estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada. As micropartículas lipídicas combinam várias vantagens como a possibilidade de controlar a liberação de fármacos, bem como carreadores, e promover a proteção das moléculas encapsuladas contra degradação (SANNA et al., 2004). Neste contexto, o uso das micropartículas lipídicas para carrear moléculas com potencial atividade antiasmática, e proporcionar sua liberação de forma prolongada, tem se mostrado uma estratégia promissora para o tratamento desta doença.

Compostos naturais têm sido estudados no tratamento de várias doenças, incluindo processos inflamatórios de várias causas, fornecendo alívio dos sintomas comparáveis aqueles produzidos por fármacos obtidos por rotas sintéticas. Vários flavonoides demonstraram potente ação anti-inflamatória e antialérgica em modelos murinos de asma (DAS, RAM & GHOSH, 2003; KO et al., 2004; WU et al., 2006). A quercetina é o composto polifenólico mais abundante na subclasse dos flavonóis, encontrado em frutas, vegetais, plantas ou produtos relacionados a estes. Apresenta a propriedade de formar quelatos sendo, portanto, um potente agente antioxidante, combatendo espécies reativas

de oxigênio. Este composto tem sido extensivamente estudado quanto aos seus efeitos farmacológicos, tais como hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante e antiasmático (COMALADA et. al., 2005; INAL; KAHRAMAN, 2000; LEE et. al., 2003; ROGÉRIO et al., 2009).

A biodisponibilidade e o metabolismo de flavonoides como a quercetina é complexa. Quando ingerida por via oral, somente 36-53% da quercetina é absorvida intestinalmente (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001). Durante a passagem da quercetina pelo epitélio intestinal e pelo fígado, esta é submetida a reações de metilação, glicuronização e sulfatação. A baixa solubilidade da quercetina em água é um dos principais fatores responsáveis pela redução da biodisponibilidade oral deste flavonoide. O polifenol não absorvido e seus metabólitos conjugados foram encontrados no ceco e no intestino grosso de ratos tratados com esta molécula. A quercetina sofre elevada metabolização intestinal, extenso e rápido metabolismo de primeira passagem, e é rapidamente eliminada. Isto tem explicado a razão pela qual esta tem demonstrado resposta inexpressiva *in vivo*, quando comparado com os resultados verificados *in vitro* (BOERSMA et al., 2002; CHEN et. al., 1997; GRAEFE; DERENDORF; VEIT, 1999 *apud* GRAEFE et al., 2001; MANACH et. al., 1997; MANACH et. al., 1999; RATNAM et al., 2006).

Estudos têm testado diferentes estratégias farmacotécnicas, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade oral da quercetina e aproveitar o seu potencial terapêutico (DORA et al., 2011; ROGÉRIO et al., 2010; LI et al., 2009). Recentemente, carreadores nanoestruturados lipídicos, apresentando diferentes características de tamanho, morfologia e composição, contendo quercetina foram desenvolvidos por Dora e colaboradores (2011). Em especial, Rogério e colaboradores (2010) demonstraram que a quercetina quando incorporada em um sistema lipídico de microemulsão exibiu significativo efeito farmacológico em modelo de asma murino induzida pela ovoalbumina em camundongos. Os camundongos foram tratados com quercetina livre, quercetina microemulsionada nas concentrações de 3 mg/kg e 10 mg/kg, e 1 mg/kg de dexametasona por via oral. A quercetina microemulsionada apresentou um efeito dose dependente, onde a dose de 10 mg/kg assim como a dexametasona reduziram significativamente o recrutamento dos eosinófilos ($68 \pm 4\%$ e $84 \pm 3\%$, respectivamente) no BALF. A quercetina microemulsionada com dose de 10 mg/kg apresentou redução nos níveis de IL-5 e IL-4 em $62 \pm 2\%$ e $71 \pm 8\%$, respectivamente, entretanto não foi observada variação na expressão da CCL11, do leucotrieno B₄ e do IFN- γ . A quercetina microemulsionada foi capaz de

reduzir a produção de muco em $62 \pm 21\%$, inibir completamente a ativação do p65 NF- κ B e a superexpressão da P-selectina. Através da análise do plasma de ratos tratados com quercetina microemulsionada e quercetina livre observou-se a presença de metabólitos da quercetina provenientes do plasma dos ratos tratados com a forma microemulsionada. Aqueles tratados com o polifenol livre, por sua vez, não apresentaram concentração detectável do flavonoide no plasma. Os resultados evidenciam que o carreador microemulsionado foi capaz de aumentar a biodisponibilidade oral da quercetina, e que esta apresenta um pronunciado efeito anti-inflamatório, e capacidade de reduzir a produção de muco.

Logo, em função da baixa absorção intestinal da quercetina e de seu rápido metabolismo sistêmico, pode ser viável sua administração por um via alternativa à via oral. De acordo com as vantagens apresentadas pela via de administração pulmonar, e a possibilidade da otimização dos efeitos anti-inflamatórios da quercetina pela administração desta no sítio de ação, a incorporação de quercetina em micropartículas para administração pulmonar visando o tratamento da asma parece ser uma estratégia plausível, promissora e inédita.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Desenvolver microesferas lipídicas contendo quercetina destinadas à administração pulmonar.

1.2.2 Objetivos específicos

- Preparar micropartículas lipídicas de quercetina, a partir do trimiristato de glicerila, utilizando a técnica de difusão de solvente a quente, com as características desejáveis de uma formulação destinada à administração pulmonar.

- Preparar micropartículas lipídicas de quercetina, a partir do behenato de glicerila, utilizando a técnica de homogeneização a quente,

com as características desejáveis de uma formulação destinada à administração pulmonar.

- Caracterizar as micropartículas quanto ao tamanho, morfologia, porosidade, eficiência de encapsulação e teor de quercetina.
- Avaliar o efeito dos parâmetros de formulação sobre o diâmetro geométrico e diâmetro aerodinâmico das micropartículas.
- Caracterizar as micropartículas preparadas com e sem a adição de quercetina quanto às propriedades cristalinas por difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial.
- Avaliar os perfis de liberação de quercetina *in vitro* a partir das micropartículas, assim como a velocidade de liberação do polifenol.
- Comparar estatisticamente os resultados obtidos com as diferentes formulações quanto ao teor, à eficiência de encapsulação e à velocidade de liberação da quercetina.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 A asma

1.3.1.1 Dados epidemiológicos

A asma é uma doença muito prevalente no mundo, e é a única doença crônica tratável que teve seus índices aumentados a partir da segunda metade do século XX no ocidente, sendo que isso é observado em todas as classes sociais. A prevalência mundial varia entre 0,7% e 18,4% em Macau e na Escócia, respectivamente. Os países com os maiores índices de prevalência da asma são os constituintes do Reino Unido, a Nova Zelândia, a Austrália, o Canadá e o Perú. O Brasil é o 14° país no mundo com maior prevalência com 11,4% da população afetada, sendo a segunda maior da América Latina (GLOBAL INITIATIVE OF ASTHMA, 2004).

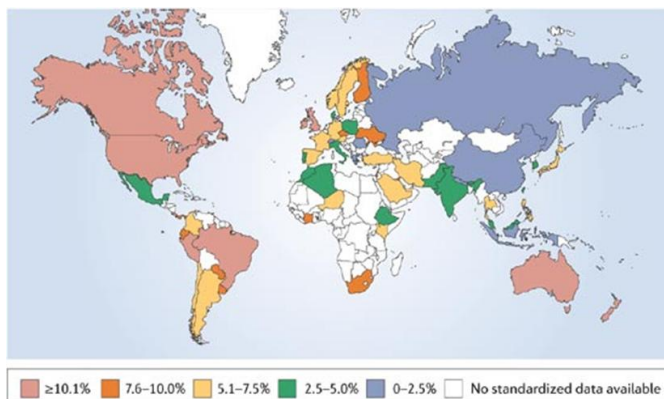


Figura 1. Mapa mundial da prevalência de asma.

(Fonte: DEVEREUX, 2006).

Segundo o DATASUS, em 2004, a asma representou a terceira causa de hospitalização pelo SUS em 2004 (excluídas aquelas relacionadas à gravidez, puerpério e parto), sendo responsável por 396.505 internações em todo o país, o que equivale a um gasto de R\$ 120 milhões de reais. A ocorrência de óbitos por asma no Brasil é em média de 2050 por ano (BRASIL, 2005).

A taxa de asma aumenta quando as comunidades passam a adotar um estilo de vida ocidentalizado e se tornam urbanizadas. Com o aumento projetado da proporção da população urbana de 45-59% em 2025, é previsto que ocorrerá um aumento substancial do número de pacientes com asma no mundo, estimando-se um incremento em mais de 100 milhões de asmáticos (TELLES FILHO, 2009).

1.3.1.2 Patogênese da asma

A asma é caracterizada por sintomas temporários e obstrução variável das vias respiratórias, podendo ocorrer espontaneamente ou em resposta à exposição a um determinado agente (WARK; GIBSON, 2006). A asma brônquica pode ser definida como uma síndrome caracterizada por obstrução “reversível” recorrente do fluxo de ar nas vias aéreas em resposta a estímulos que, por si só, não são nocivos e não afetam os indivíduos não-asmáticos. Em geral a reversão da obstrução necessita de acompanhamento terapêutico. A asma pode ser aguda ou crônica. Na forma crônica o indivíduo apresenta crises intermitentes de dispnéia, sibilos e tosse. A dispnéia é causada pela retenção de ar nos alvéolos e bronquíolos, levando à dilatação dos mesmos. E a asma aguda, por sua vez, não é facilmente revertida, pode ser fatal e exige tratamento imediato e enérgico (RANG et al., 2004).

Inflamação persistente das vias aéreas, infiltração de células inflamatórias (particularmente eosinófilos), hipertrofia das células musculares lisas e espessamento da lâmina reticular são características da asma (Figura 2). A hiperplasia das células caliciformes e hipertrofia epitelial acompanhada frequentemente de perda das células, contribuem para o estreitamento do lúmen das vias aéreas. O aumento do volume das células musculares acentua o estreitamento desta via ao passo que promove a contração da árvore respiratória. A produção de muco, as proteínas séricas, as células inflamatórias e as células mortas podem obstruir o lúmen, mas este evento é tipicamente observado em casos de exacerbação severa da asma (SINGH; BUSSE, 2006). Este processo complexo é acompanhado pela elevação dos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE), assim como produção intrapulmonar de interleucinas (IL), IL-4 e IL-13, produzidas por células T-*helper* 2 (Th2) específicas. A ativação de eosinófilos maduros dá-se por intermédio da IL-5, envolvida na diferenciação terminal e proliferação dos precursores dos eosinófilos (ROGERIO et al., 2007).

A fase imediata da asma alérgica ocorre de forma abrupta, sendo causada principalmente por espasmos do músculo liso brônquico. A interação do alérgeno com a IgE fixada aos mastócitos induz a liberação de vários mediadores como a histamina, os leucotrienos C₄ e D₄ e a prostaglandina D₂. Outros mediadores liberados incluem IL-4, IL-5, IL-13, proteína inflamatória dos macrófagos 1 α e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (RANG et al., 2004).

A fase tardia ocorre dentro de um período de tempo variável após a exposição ao estímulo desencadeante. Constitui-se de uma reação inflamatória progressiva, iniciada durante a fase imediata, sendo o influxo de linfócitos Th2 de particular importância, pois não há penetração somente das células inflamatórias habituais, mas também de linfócitos e eosinófilos ativados, liberando leucotrienos, citocinas IL-3 e IL-5, quimiocina IL-8, proteínas catiônicas dos eosinófilos, proteínas básicas principais e neurotoxina derivada dos eosinófilos (essas últimas provocaram a lesão e perda do epitélio), podendo ainda ser liberados adenosina (atuante sobre o receptor A₁), o óxido nítrico induzido e neuropeptídeos. Os fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias atuam sobre as células musculares lisas, causando hipertrofia e hiperplasia, sendo que o próprio músculo liso pode iniciar a liberação de substância pró-inflamatórias e fatores de crescimento autócrinos. A perda do epitélio significa que os receptores de irritação e as fibras C estão mais acessíveis a estímulos irritantes; acredita-se que isso constitua a principal base da hiperreatividade (RANG et al., 2004).

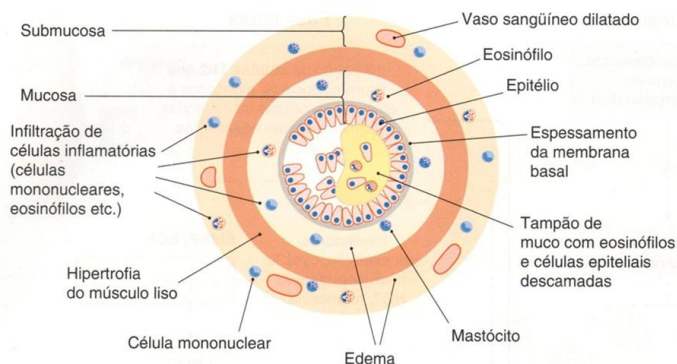


Figura 2. Diagrama esquemático de um corte transversal de bronquíolo, evidenciando as alterações que ocorrem na asma crônica. (Fonte: RANG et al., 2004).

1.3.2 Quercetina

1.3.2.1 Propriedades químicas e físico-químicas

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) (Figura 3) é um flavonol (subclasse dos flavonoides) encontrada em uma ampla variedade de plantas, alimentos e produtos derivados destes como sucos, chás e vinhos. Este flavonoide apresenta várias atividades biológicas, tais como; antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antiplaquetária, antimicrobiana, antineurodegenerativa, antitumoral e antiviral. (BISCHOFF, 2008; HARWOOD et al., 2007; INAL; KAHRAMAN, 2000).

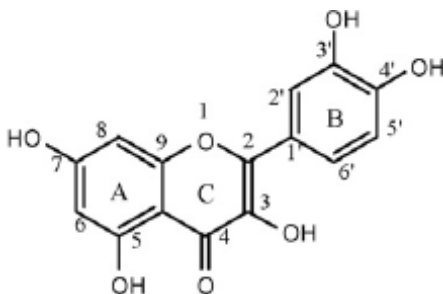


Figura 3. Estrutura química da quercetina.

As atividades farmacológicas dos flavonoides, como a quercetina, estão relacionadas ao elevado efeito antioxidante, o qual pode ser atribuído à redução do ânion superóxido e de radicais gerados durante a peroxidação lipídica. Esta capacidade antioxidante está, por sua vez, relacionada com a estrutura química desses compostos. A porção *o*-dihidroxi, também conhecida como estrutura catecol, situada no anel B é responsável pela doação de prótons e também pela quelatação de íons metálicos. A dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 combinada com a função cetona em C4 e hidroxila em C3, localizados no anel C, é responsável pela formação de uma estrutura *p*-quinóica, tornando possível o deslocamento de elétrons e a estabilização do radical formado (BUCHNER et al., 2006).

A quercetina solubilizada em meio aquoso apresenta capacidade antioxidante aproximadamente 8 vezes maior do que quando solubilizada em uma fase oleosa (USAMI et al., 2004), porém sua

solubilidade aquosa a 20 °C é inferior a 0,01 g/L (CHEBIL et al., 2007). Estudos indicam que a quercetina apresenta um comportamento anfífilo devido à presença de uma porção hidrofóbica, formada pelos anéis fenólicos, e por outra porção polar, constituída pelos grupos hidroxila (CODORNIU-HERNANDEZ et al., 2003).

Em virtude de sua estrutura química, a quercetina demonstra uma pronunciada instabilidade química. A quercetina sofre auto-oxidação em soluções orgânicas e aquosas apresentando pH superior a 8,0. O fenômeno de auto-oxidação é altamente dependente do pH e do meio, assim como da presença de oxidantes. Em pH inferior a 5,0 a quercetina encontra-se na forma neutra ou com carga elétrica positiva. Acima de pH 4,0, ao menos duas espécies iônicas estão presentes na solução aquosa, uma vez que ocorre a dissociação dos grupos hidroxila. A dissociação promove a auto-oxidação da quercetina. A ordem preferencial da desprotonação dos grupos hidroxila é: 5-OH, 3-OH, 3'-OH, 7-OH e 4'-OH. Sendo assim, as hidroxilas encontradas nos carbonos 5 e 3 são desprotonadas em pH abaixo dos encontrados fisiologicamente, indicando que somente as hidroxilas de outras posições podem ser desprotonadas em pH fisiológico (MOMIĆ et al., 2007).

As propriedades físico-químicas da quercetina podem variar entre diferentes lotes do polifenol, uma vez que este pode ser encontrado em formas polimórficas diversas. Borghetti e colaboradores (2006) observaram a presença de três formas polimórficas ao analisar quatro amostras distintas de quercetina disponíveis comercialmente, apresentando formas distintas de cristais, e diferentes perfis de difração de raios-X, evidenciando divergência na forma cristalina entre as amostras deste flavonoide, que se reflete na variação da solubilidade em água das amostras de quercetina. A transformação polimórfica pode ser mediada por solventes, por estresse mecânico, ou pela temperatura, e afeta grandemente as características de morfologia, solubilidade, estabilidade, e conseqüentemente, a biodisponibilidade (CESUR; GOKBEL, 2008; SRINIVAS et al., 2010).

1.3.2.2 Propriedades farmacocinéticas

A maior limitação do uso da quercetina por via oral reside na baixa biodisponibilidade deste flavonoide. Majoritariamente a quercetina está presente nas plantas na forma glicosídica, ou seja, ligada covalente a uma molécula de açúcar (tal como a glicose, rarnnose ou

rutinose) por meio de uma ligação β -glicosídica. A característica que distingue uma forma glicosídica da outra é o tipo de grupamento glicosil, por exemplo, a isoquercetina tem uma molécula de glicose ligada na posição 3-OH, enquanto a rutina, encontrada em elevadas concentrações em frutas cítricas, possui uma molécula de rutinose ligada à posição 4 (GRAEFE; DARENDORF; VEIT, 1999; GRAEFE et al., 2001; HOLLMAN et al., 1995). A ligação da quercetina com uma molécula de açúcar afeta a sua solubilidade e absorção. Geralmente, a presença do grupamento glicosil resulta em um aumento da sua solubilidade aquosa quando comparado à forma aglicona. Entretanto, a ligação β -glicosídica é resistente à hidrólise pelas enzimas pancreáticas, oferecendo uma barreira no processo de absorção intestinal (HOLLMAN et al., 1997).

Os primeiros estudos da quercetina em humanos sugeriram uma biodisponibilidade muito baixa após uma única dose oral (aproximadamente 2%) (GUGLER; LESCHIK; DENGLER, 1975). Em ratos, a aglicona da quercetina é parcialmente absorvida no estômago; enquanto, os glicosídeos da quercetina, isoquercetrina e rutina, não são (CRESPY et al., 2002). A quercetina é considerada lipofílica, então, presumidamente, deveria atravessar as membranas dos enterócitos via difusão simples. Na teoria, esta deveria resultar em uma melhor absorção que as formas glicosídicas que alcançam o intestino (NEMETH; PISKULA, 2007).

A ligação glicosídica é hidrolisada pela enzima β -glicosidase, encontrada no fígado, nos rins, e no intestino. Esta enzima possui alta afinidade por glicosídeos de flavonoides e isoflavonoides quando a glicose está ligada às posições 7 ou 4' (DAY et al., 1998). No entanto, várias bactérias da flora intestinal são capazes de hidrolisar os glicosídeos de quercetina e clivá-la em ácidos fenólicos (BOKKENHEUSER et al., 1987 *apud* GRAEFE et al., 2001; KIM et al., 1998; SCHNEIDER et al., 1999; SCHNEIDER; BLAUT, 2000).

A quercetina e suas formas glicosiladas são extensivamente metabolizadas por hidrólise enzimática, ação microbiana e reações de conjugação. A quercetina é metabolizada na forma de glicoronídeo e sulfato no intestino delgado, biotransformada em quercetina *O*-metilada e quercetina glicoronizada *O*-metilada no fígado e, ainda, outros produtos de degradação são formados, como o hidroxifenilacetato, no intestino grosso, por ação da microflora colônica (SPENCER et al., 2003). Boersma e colaboradores (2002) demonstraram que o microsoma do intestino delgado humano pode glicoronizar a quercetina nas posições -3-, -7-, -4'- e -3'-, indicando que a quercetina pode ser

completamente conjugada nas células do intestino delgado. Em doses elevadas a quercetina pode saturar as enzimas de conjugação, alcançando a circulação porta hepática na forma não conjugada, livre.

A glicoronização hepática caracteriza o processo de inativação para excreção do xenobionte. A quercetina glicoronizada pode ser posteriormente excretada diretamente pelos rins ou ser metabolizada no fígado. O metabolismo hepático é altamente dependente de enzimas como a catecol-*O*-metil transferase (COMT), a uridina-difosfato glicoronosil transferase (UGT), e a sulfotransferase (ST) (AKSOY; KLENER; WEINSHILBOUM, 1993; COUGHTRIE et al., 1998; KING et al., 2000). A excreção biliar dos componentes glicoronizados ocorre com frequência, e as bactérias presentes no cólon são capazes de hidrolisar estes conjugados, habilitando a reabsorção do fármaco na forma de aglicona, caracterizando ciclo entero-hepático (DONAVAN et al., 2001). A estrutura química dos principais metabólitos da quercetina pode ser visualizada na figura 4.

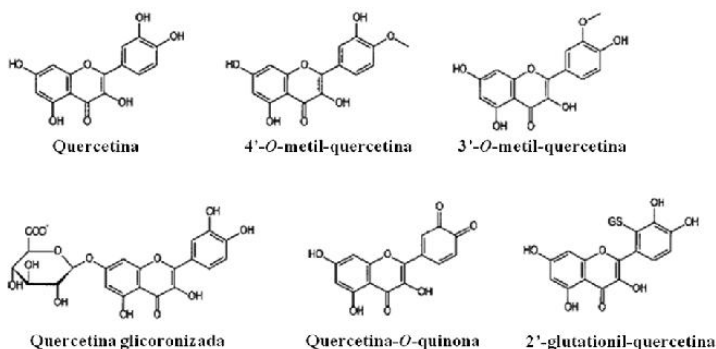


Figura 4. Principais metabólitos da quercetina.
(Fonte: DONAVAN et al., 2001).

Poucos estudos têm sido conduzidos quanto à distribuição tecidual da quercetina após administração oral, e nenhum estudo avaliou a distribuição em humanos. Em ratos, a quercetina e seus metabólitos são amplamente distribuídos nos tecidos, com maior concentração nos pulmões, e menores no cérebro, tecido adiposo e no baço (de BOER et al., 2005). Em porcos, os fígado, os rins, e o intestino delgado contêm maiores concentrações deste polifenol, porém o cérebro, o coração, e o baço possuem menores concentrações (BIEGER et al., 2008; de BOER et al., 2005). Existem, também, evidências de que a quercetina pode se

acumular no sistema nervoso central, com maiores níveis alcançados com repetidas doses durante oito dias (PAULKE et al., 2008).

A administração oral da quercetina, aglicona, marcada com ^{14}C na posição 4, em pacientes saudáveis demonstrou taxa de absorção entre 36 e 53%, tempo de meia-vida de 20 a 72 horas. A principal rota de eliminação da quercetina (23-81%) foi com a exalação de dióxido de carbono, uma vez que a eliminação urinária e fecal, juntas, foi inferior a 10% (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001).

1.3.2.3 Quercetina como perspectiva no tratamento da asma

A asma alérgica é uma desordem inflamatória complexa caracterizada pela hiperresponsividade das vias aéreas, inflamação eosinofílica e hipersecreção de muco pelas células caliciformes. Esta é acompanhada por altos níveis de IgE, assim como pela produção intrapulmonar de IL-4, IL-5, e IL-13 pelas células alérgeno específicas Th2 (ROGÉRIO et al., 2007). Compostos capazes de inibir a infiltração de eosinófilos são de grande interesse no tratamento de pacientes com desordens atópicas alérgicas, síndromes hipereosinofílicas e outras desordens relacionadas aos eosinófilos. Entre eles, vários metabólitos secundários de plantas demonstram interferir diretamente com moléculas e mecanismos, tais como mediadores da resposta inflamatória e da produção/atividade de mensageiros secundários, bem como a expressão de fatores de transcrição e de moléculas pró-inflamatórias-chaves. Vários flavonoides têm exibido potente ação anti-inflamatória e antialérgica em modelos murinos de asma. Particularmente, a quercetina tem demonstrado capacidade de induzir significativa expressão gênica e produção de interferon γ (IFN- γ), derivada de células Th1, bem como regulação da produção de IL-4 derivada de Th2 por células mononucleares sanguíneas periféricas (NAIR et al., 2002). Em modelo de cobaia a quercetina também preveniu a obstrução bronquial induzida pelo fator de ativação de plaquetas e por alérgenos (DORSCH et al., 1992). Possui ação anti-histamínica, diminui a relação entre triptase, proteína quiostática de monócitos 1 e IL-6, além de regular os níveis de histidina RNAm descarboxilase dos mastócitos humanos. Esta ainda apresenta potente fator inibitório na formação de leucotrieno B₄ em leucócitos, supressão da produção de TNF α e óxido nítrico nos macrófagos e mastócitos. Sendo assim, a quercetina tem a capacidade de reduzir processos inflamatórios agudos, crônicos e sub-clínicos (MIN et al., 2007; ROGÉRIO et al., 2007; BISCHOFF, 2008).

Inflamações alérgicas mediadas por mastócitos estão envolvidas em muitas doenças como a asma, sinusite e artrite reumatoide. Os mastócitos induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiostáticas, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , as interleucinas 1β , IL-6, IL-8, IL-4, IL-13 e fator de crescimento β . A ativação dos mastócitos por citocinas pró-inflamatórias é um evento significativo no processo inflamatório, pois estas células contêm potentes mediadores como a histamina, heparina, proteinases, leucotrienos e citocinas multifuncionais. Em linhagem de mastócitos humanos HCM-1 estimulados pelo 12-miristato, 13-acetato de forbol e ionoforo cálcico (PMACI), a quercetina provocou a redução da expressão gênica e a produção do fator de necrose tumoral TNF- α , das IL- 1β , IL-6 e IL-8, além de proporcionar a ativação do NF- κ B e da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38 MAPK), induzida pelo PMACI (MIN et al., 2007).

Rogério e colaboradores (2007) investigaram o efeito anti-inflamatório da quercetina e da quercetrina em um modelo de asma murino, após imunização e desafio dos animais com ovoalbumina. Neste estudo, os autores evidenciaram a redução do número de eosinófilos no fluido broncoalveolar, sangue e parênquima pulmonar, após a administração oral de quercetina e isoquercetrina, na dose de 10 e 15 mg/kg, respectivamente. Entretanto, somente a isoquercetrina foi capaz de reduzir os níveis de IL-5 no homogenato dos pulmões, mas nenhum dos dois compostos reduziu os níveis de IL-5 no lavado do fluido broncoalveolar (BALF, do inglês *bronchoalveolar lavage fluid*). Este efeito foi então atribuído à propriedade inibitória de outros mediadores inflamatórios, visto que a quercetina regula a rota do NF- κ B.

Em um estudo mais recente, Rogério e colaboradores (2010) mostraram que a quercetina administrada na forma de uma microemulsão, por via oral, na dose de 10 mg/kg diminuiu não somente o recrutamento de eosinófilos, mas também os níveis de IL-4 e IL-5 no BALF dos animais imunizados com ovoalbumina de modo comparável à dexametasona, administrada oralmente na dose de 1 mg/kg. A quercetina microemulsionada também provocou a redução significativa da produção de muco, a redução da ativação da subunidade p65 do NF- κ B e da expressão de P-selectina. Esses resultados foram associados ao aumento da biodisponibilidade oral da quercetina após incorporação em um nanocarreador lipídico microemulsionado.

Para avaliar o efeito antialérgico da quercetina na resposta imune Th1/Th2, Park e colaboradores (2009) determinaram como a quercetina regula a produção de citocinas das células Th1/Th2 através da expressão

gênica do T-bet e GATA-3, em modelo murino de asma induzida por ovoalbumina. O recrutamento dos linfócitos para o sítio inflamatório é tido como um evento crítico no desenvolvimento e persistência da inflamação nas vias aéreas. As células inflamatórias devem atravessar a membrana basal e se deslocar pelo tecido conectivo até que finalmente alcancem os sítios inflamatórios, e necessite do envolvimento de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, e enzimas como as metaloproteinases. Neste estudo os autores mostraram que a quercetina reduziu a infiltração eosinofílica, a atividade da eosinófilo-peroxidase, o espessamento da parede brônquica e da área do músculo liso nos animais imunizados com ovoalbumina através da redução dos níveis de MMP-9. A quercetina ainda reduziu os níveis GATA-3 no tecido pulmonar, e aumentou a transcrição do fator T-bet, reduzindo a diferenciação dos linfócitos imaturos em Th2 e induzindo a diferenciação em Th1, respectivamente. Portanto, Park e colaboradores (2009) concluíram que a quercetina reduz a inflamação alérgica nas vias respiratórias e a hiperresponsividade devido alteração da polarização Th1/Th2 e do controle do espessamento da musculatura lisa brônquica.

1.3.3 Via de administração pulmonar

1.3.3.1 Anatomia e fisiologia do trato respiratório

A liberação pulmonar é principalmente utilizada para tratar localmente condições patológicas das vias respiratórias, liberando o fármaco diretamente no sítio de ação. A liberação de broncodilatadores, anti-inflamatórios e outros fármacos que agem nos pulmões reduz a dose necessária para produzir efeito farmacológico, ao mesmo tempo que reduz a concentração sistêmica dos mesmos, e consequentemente, os efeitos colaterais indesejáveis. O trato respiratório inicia no nariz e termina na região mais profunda dos pulmões, o saco alveolar (TAYLOR; KELLAWAY, 2001). As principais funções do sistema respiratório são a realização da troca gasosa, captação de oxigênio para posterior distribuição às células e eliminação do dióxido de carbono produzido pelas mesmas, além de auxiliar na regulação do pH sanguíneo e, através da cavidade nasal filtrar, aquecer e umedecer o ar inspirado (TORTORA; GRABOWSKI, 2006).

O trato respiratório abrange a região de condução e a região respiratória. A região de condução inclui o nariz, a nasofaringe, a laringe, a traqueia, os brônquios, os bronquíolos, e estas estruturas

conduzem o ar para o interior e exterior da região respiratória, bronquíolos terminais, bronquíolos respiratórios e, ductos e sacos alveolares, para a troca de gases. A arquitetura básica da região traqueobronquial é predominantemente uma série simétrica de ramos dicotômicos. Cada ramificação da árvore traqueobronquial leva a uma nova “geração” da via aérea, por exemplo, a traqueia (geração 0) se bifurca em dois brônquios principais (geração 1), e então seguindo a ramificação seqüencial, no brônquio lobar (geração 2), e assim sucessivamente. Os bronquíolos terminais marcam o limite da região traqueobronquial, onde se encontra a região alveolar (geração 17 à 23). A progressão da traqueia até as extremidades da árvore traqueobronquial é caracterizada pela redução do diâmetro e do comprimento dos túbulos de cada ramificação, mas o aumento geométrico do número da via aérea resulta no aumento dramático da área superficial (TAYLOR; KELLAWAY, 2001). A área superficial dos pulmões humanos é estimada em aproximadamente 75 – 140 m² em adultos. O epitélio pseudoestratificado que constitui a barreira de absorção da corrente sanguínea é muito diferente na via aérea e nos alvéolos do pulmão. As vias aéreas são compostas de epitélio colunar que gradualmente se torna mais delgado, com um epitélio brônquico de 3 – 5 mm e epitélio bronquiolar de 0,5 – 1 mm de espessura. Na região traqueobronquial o epitélio é protegido por uma camada de muco. Quaisquer partículas depositadas nesta área são transportadas para fora dos pulmões pela eliminação mucociliar, ou difusão pela camada de muco até atingir as células epiteliais. Em contraste, os alvéolos possuem uma fina e única camada celular (YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008).

A região respiratória inclui estruturas que participam da troca de gases e, portanto, incluem os bronquíolos respiratórios e os sacos alveolares. Os bronquíolos respiratórios se conectam aos ductos alveolares que conduzem o ar até os sacos alveolares. Estes contêm aproximadamente de 2 a 6 x10⁸ alvéolos, apresentando uma área superficial elevada. Os sacos alveolares se encontram em uma região abundante de capilares, e a distância do ar no lúmen do alvéolo e o fluxo sanguíneo dos capilares é menor que 400 nm. Devido à grande quantidade de capilares presentes e à extensa área superficial, a via respiratória apresenta propriedades interessantes para a administração sistêmica de fármacos (AULTON, 2005; GREENE; HARRIS, 2008; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008).

1.3.3.2 Fatores que afetam a eficácia de pós inaláveis

Uma vez que o pulmão possui uma menor capacidade de tolerância de excipientes que outras vias de administração, limita-se a possibilidade de excipiente possíveis de aprimorar a administração. Uma variável adicional, única à via pulmonar, é o paciente, tanto quanto ao modo de inalação, anatomia do trato respiratório e fisiologia. Existem várias formas de se administrar um aerossol, e a variabilidade na dose liberada em um indivíduo ou a uma população de pacientes pode ser substancial. Consequentemente, efeitos terapêuticos reproduzíveis são difíceis de assegurar. O tratamento de doenças respiratórias com inaladores requer a liberação de fármaco suficiente nos pulmões para efetuar uma resposta terapêutica. Para eficácia ótima, a administração de fármacos deve ser precisa, reproduzível e conveniente. Este objetivo pode ser alcançado pela combinação de formulação, dosagem e estratégias de inalação. Aspectos clínicos e técnicos da seleção do sistema de liberação devem ser extensivamente avaliados (TELKO; HICKEY, 2005). Logo, a deposição de um fármaco ou aerossol nas vias respiratórias depende de quatro fatores: as propriedades físico-químicas do fármaco, a formulação, o dispositivo de liberação ou de deposição, e o paciente (padrões de respiração e estado clínico) (AULTON et al., 2005).

1.3.3.2.1 Deposição de partículas no trato respiratório

Aerossóis inaláveis são comumente utilizados para a administração de fármacos nos pulmões. A via de administração pulmonar apresenta múltiplas vantagens: é uma via não invasiva, de elevada área superficial e fármacos podem ser administrados para exercer efeito local ou sistêmico. Adicionalmente, as enzimas metabolizadoras de fármacos estão em concentração muito inferior nos pulmões que no trato gastrointestinal e no fígado, então moléculas inaladas que alcançam a circulação sistêmica são menos susceptíveis à degradação que se tivessem sido liberadas oralmente. Fármacos com baixa biodisponibilidade oral ou efeitos pós-prandiais sobre a biodisponibilidade podem, potencialmente, ser administrados com maior estabilidade e eficiência pela via pulmonar (PATTON; BYRON, 2007).

O sítio, a extensão e a eficácia de deposição da partícula após inalação é influenciada primeiramente por três fatores: (a) tamanho de

partícula (diâmetro), densidade, propriedades de superfície, e forma das partículas; (b) anatomia da via aérea superior e inferior e a estrutura alveolar; (c) parâmetros de ventilação como o impacto sobre a deposição das partículas são o padrão de respiração (incluindo modo de prender a respiração, e presença de limitação no fluxo de expiração), taxa de fluxo, e volume tidal, determinando a velocidade de fluxo do ar e o tempo de residência no trato respiratório (YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008).

Uma das propriedades físico-químicas fundamentais de um aerossol para inalação é o tamanho de partícula. Esse tamanho é padronizado para o cálculo de seu diâmetro aerodinâmico médio mássico, o qual é o diâmetro físico de uma esfera de densidade unitária, que sedimenta no ar com uma velocidade igual à partícula sob análise (AULTON et al., 2005). Sendo assim, depende fortemente da forma, densidade e diâmetro geométrico da partícula (YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008). O diâmetro aerodinâmico é a medida mais apropriada para tamanho de partícula de aerossol, pois relata o comportamento dinâmico da partícula e descreve o principal mecanismo de deposição (TELKO; HICKEY, 2005).

Existem três principais mecanismos de deposição das partículas no trato respiratório, os quais são dependentes do tamanho das partículas inaladas (Figura 5). A impactação ocorre principalmente nas regiões de bifurcação, ou próximo a estas, onde a velocidade de fluxo é maior e onde existe uma rápida alteração na direção do fluxo de ar, gerando forças inerciais consideráveis. Este mecanismo de deposição ocorre com partículas que possuem diâmetro aerodinâmico médio mássico (MMAD) maior que 5 μm , durante a passagem das mesmas através da orofaringe e vias condutoras mais largas. A probabilidade de ocorrência da impactação é dependente, também, do aumento da velocidade do ar, da taxa de respiração, e da densidade das partículas. A sedimentação pela ação da gravidade é outro importante mecanismo de deposição, e ocorre com partícula de diâmetro aerodinâmico entre 0,5 e 5 μm , nas vias aéreas de menor condução, onde a velocidade do ar é menor. A sedimentação gravitacional aumenta com o aumento do tamanho da partícula e com o prolongamento do tempo de residência da partícula, mas é reduzida com o aumento da frequência respiratória. Partículas submicrométricas, especialmente aquelas menores de 0,5 μm , adquirem um movimento randômico causado pelo impacto das moléculas de ar próximas à partícula. Este movimento Browniano pode resultar na deposição da partícula por difusão, especialmente, nas vias aéreas inferiores e nos alvéolos, onde o fluxo de ar é muito baixo, logo estas

estas podem não se depositar completamente ou se depositar muito lentamente. (PILCER; AMIGHI, 2010; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008). Portanto para administração efetiva algumas propriedades físicas das partículas são cruciais.

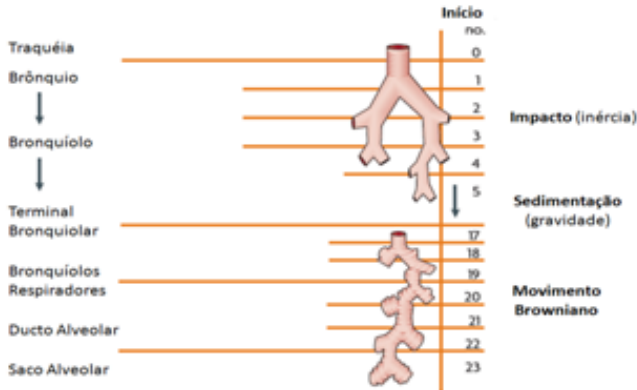


Figura 5. Fatores que determinam a deposição de partículas inaladas. (Fonte: adaptado de PATTON; BYRON, 2007).

De modo geral, partículas devem apresentar diâmetro aerodinâmico médio mássico entre 1 e 5 μm para que as partículas apresentem efeito local, e ainda se faz necessário evitar a fagocitose pelos macrófagos alveolares, assim o tamanho de 1 – 5 μm é também desejável para esta finalidade (TABATA; IKADA, 1988; COATES; O'CALAGHAN, 2006)

A figura 6 demonstra a dependência do diâmetro aerodinâmico das partículas para com o local onde estas se depositarão, enquanto a figura 5 representa as divisões do trato respiratório e o tipo de deposição mais provável de ocorrer.

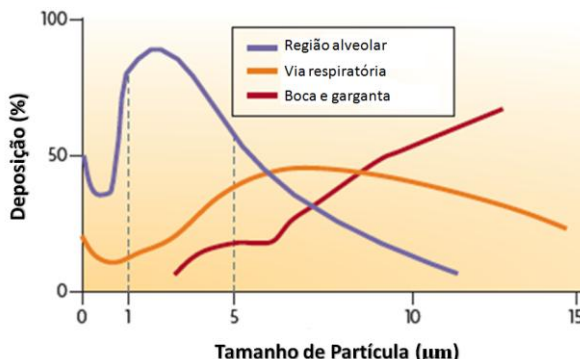


Figura 6. Relação entre o tamanho de partícula e a porcentagem de deposição no trato respiratório. (Fonte: adaptado de PATTON; BYRON, 2007).

1.3.3.2.2 Propriedades físicas das partículas

Os sistemas de liberação de fármacos pulmonares tendem a alta coesão e adesão entre as moléculas, resultando em uma diminuição da performance de aerossolização devido deposição no trato respiratório (SMITH; PARRY-BILLINGS, 2003). Cerca de dois terços da adesão entre partículas decorre de forças de fricção (relacionadas à área total da superfície) e um terço é proporcional ao formato do pó (decorrente da área projetada) (TANG; CHAN; RAPER, 2004). A força necessária para a aerossolização de carreadores aderidos será diretamente proporcional à soma da energia da superfície contígua, e inversamente proporcional à área de contato projetada. Devido pequeno tamanho, aumento da área de superfície, e outras características físico-químicas como grau de cristalinidade, presença de umidade e carga elétrica, as partículas geralmente apresentam efeitos coesivos que diminuem significativamente a capacidade de fluxo e dispersão no meio pulmonar (BEGAT et al., 2005; CHEW et al., 2005).

A superfície das partículas é um importante elemento nas interações das partículas, estabilidade, e capacidade de dispersão. Uma vez que as partículas são pequenas, a área superficial total do pó é muito grande. Uma elevada área superficial proporciona às partículas um alto potencial para apresentação de cargas e captura de umidade, além de o tamanho das partículas torná-las mais susceptível à influência das forças de van der Waals (TELKO; HICKEY, 2008).

As partículas estão sujeitas a forças que aumentam a interação partícula-partícula e a interação partícula-superfície. Existem quatro forças majoritárias de interação entre partículas: impedimento mecânico devido às propriedades superficiais; forças capilares da presença de água; interação eletrostática devido à natureza do material; e forças de van der Waals de natureza eletromagnética do material (Figura 7) (TELKO; HICKEY, 2005; HICKEY et al., 2007).

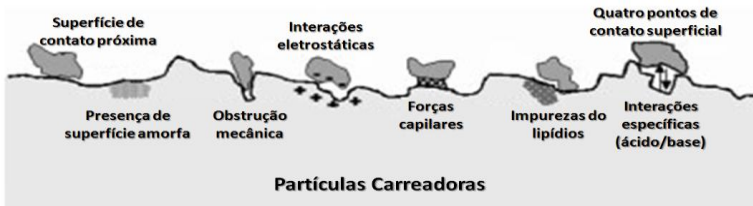


Figura 7. Variedade de interações partícula-superfície (Fonte: adaptado de HICKEY et al., 2007).

O impedimento mecânico devido às características superficiais ou à rugosidade é um mecanismo predominante que previne a dispersão das partículas. Esta força é relacionada ao diâmetro dos poros entre partículas e à tensão interfacial devido às pontes de hidrogênio da água. As forças capilares provem da condensação de moléculas de água na superfície da partícula. Se a quantidade de água for suficiente, pode ser formado um menisco entre os pontos de contato de superfícies adjacentes. De fato, com o aumento da umidade relativa, uma monocamada de moléculas de água se forma sobre a superfície de partículas sólidas cristalinas. Tem sido reconhecido que a condensação de água na superfície de fármacos e/ou carreadores aumente acentuadamente a magnitude das forças coesivas (entre partículas) e adesivas (entre fármaco e partícula carreadora). Fármacos higroscópicos apresentam um grande risco de instabilidade física e química. A incorporação ou perda de água devido a variações de umidade relativa podem resultar na dissolução local e recristalização, levando à aglomeração irreversível formando pontes sólidas, que podem afetar a deposição das partículas no pulmão (PRICE et al., 2002; HICKEY et al., 2007; PILCER; AMIGHI, 2010). A área superficial de uma partícula pode ser afetada pelo tamanho desta, pelo formato e também pela morfologia da superfície. A rugosidade de uma partícula pode alterar a área de contato entre as superfícies contíguas, e, portanto, pode alterar a

força total de van der Waals e a tendência para carga superficial ou ao grau de condensação de água (PILCER; AMIGHI, 2010).

A área superficial não é a unicamente determinada pelo tamanho e forma da partícula, a morfologia da superfície também contribui para a área superficial. Partículas rugosas possuem maior área de superfície que partículas lisas que ocupam o mesmo volume (TELKO; HICKEY, 2008). Chew e colaboradores (2005) demonstraram uma relação quantitativa entre o grau de rugosidade da superfície das partículas e a fração fina dos pós, e observaram que a rugosidade aprimora a dispersibilidade dos pós até certo ponto, quando inicia a indução à coesão entre as partículas. A rugosidade superficial pode diminuir a interação partícula-partícula uma vez que a textura áspera da superfície proporciona menor contato entre as partículas, aumentando efetivamente a distância interparticular, e conseqüentemente, reduz a força de van der Waals. A real área de contato será determinada pela deformação elástica e/ou plástica que varia diferentemente, dependendo da rugosidade da superfície e do tamanho dos poros da partícula.

1.3.3.2.3 Fatores fisiológicos e patológicos que afetam a eficácia dos pós inaláveis

O pulmão, também, apresenta eficientes mecanismos para remoção das partículas depositadas, podendo ocorrer em questão de minutos à horas. No trato respiratório superior, o epitélio ciliado é responsável pelo movimento mucociliar, pelo qual partículas são removidas das vias aéreas em direção à boca. Nas áreas mais profundas do pulmão, os macrófagos alveolares são capazes de fagocitar partículas logo após sua deposição. Uma terapia com liberação retardada eficaz, portanto, requer uma estratégia que evite ou iniba este mecanismo de eliminação pulmonar (EDWARDS et al., 1997). O grau de captura por macrófagos está diretamente relacionado com as condições patológicas, ou seja, o estado de ativação dos macrófagos. Um aumento da fagocitose de partículas tem sido observado com pacientes com asma branda. As características das micropartículas podem modificar a captura destas. Como a fagocitose necessita resistência física, partículas rígidas são mais facilmente fagocitadas que aquelas mais maleáveis. Foi demonstrado que a fagocitose depende do tamanho da partícula. A captura de partículas foi reduzida quando o diâmetro geométrico das partículas é inferior a 1 μm (TABATA; IKADA, 1988) ou superior a 5 μm (EDWARDS et al., 1997).

Edwards e colaboradores (1997) demonstraram em estudos *in vivo*, a significativa redução da fagocitose de partículas poliméricas porosas de diâmetro geométrico próximo a 8 μm e diâmetro aerodinâmico de 2 a 3 μm , quando comparadas com partículas poliméricas não-porosas inaladas com diâmetro geométrico inferior a 5 μm e diâmetro aerodinâmico de 2 a 3 μm , evidenciando que a fagocitose tem relação com o diâmetro geométrico das partículas e não com o diâmetro aerodinâmicos destas (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2006). Ainda, estudos *in vitro* demonstram que o recobrimento das partículas pelo surfactante 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) reduz a captura das partículas por macrófagos murinos em mais de 50% (EVORA et al., 1998). Porém o recobrimento com a proteína surfactante A (SpA) demonstrou um moderado aumento no grau de fagocitose, uma vez que algumas destas proteínas são membros da família das colectinas (colágeno-lectinas), que agem como opsoninas (GEISER, 2010).

Por outro lado, doenças como a asma modificam a arquitetura do trato respiratório devido à broncoconstrição e aos processos decorrentes da inflamação, provocando alterações nos ângulos de bifurcação e obstrução das vias aéreas em função do acúmulo de muco, modificando, assim, o perfil de deposição e distribuição dos aerossóis. Uma redução da luz do pulmão causada pela obstrução aumenta a velocidade do ar e a turbulência nas regiões onde o fluxo normalmente é laminar. A obstrução das vias aéreas desvia o ar inspirado para áreas não obstruídas, fazendo com que pouco fármaco seja depositado nas áreas obstruídas, reduzindo a eficiência terapêutica do medicamento. Em um pulmão obstruído, o fármaco aerossolizado tende a se depositar mais centralmente no sistema respiratório por impactação inercial (LABIRIS; DOLOVICH, 2003).

1.3.4 Carreadores de fármacos para administração pulmonar

A administração de fármacos pela via pulmonar apresenta várias vantagens no tratamento de doenças respiratórias quando comparada a outras vias de administração. A região de deposição no trato respiratório e a eficiência dos aerossóis inalados sofrem grandes influências do diâmetro aerodinâmico, distribuição granulométrica, forma e densidade das partículas. Como partículas micronizadas são geralmente muito coesivas e caracterizadas por uma fraca propriedade de fluxo, carreadores são normalmente utilizados em pós inaláveis, a fim de

aprimorar as características de aerossolização do fármaco, e propiciar adequada deposição nas vias aéreas (SEBTI; AMIGHI, 2006).

Atualmente, vários estudos avaliam as propriedades de aerossolização de carreadores como nanopartículas ou micropartículas, preparadas a partir de materiais poliméricos (TOMODA et al., 2005; UNGARO et al., 2009), polissacarídeos (LARHRIB et al., 1999), lipídio (SEBTI; AMIGHI, 2006).

1.3.4.1 Micropartículas poliméricas

Muitos estudos têm explorado a possibilidade do uso de variados polímeros, sintéticos ou naturais, para a administração de diversos fármacos e proteínas, pela via pulmonar, sendo estes carreadores tanto micro- quanto nanoparticulados.

Tomoda e colaboradores (2005) prepararam micropartículas poliméricas de poli(ácido lático)-co-(ácido glicólico) (PLGA) contendo rifampicina para avaliar o efeito dos surfactantes pulmonares sobre a liberação do fármaco a degradação do PLGA. Estes observaram que o surfactante pulmonar não alterou o perfil de liberação do fármaco, enquanto afetou pouco a degradação por hidrólise do polímero.

Em outro estudo, Ungaro e colaboradores (2009) avaliaram a potencial liberação pulmonar *in vivo* da insulina a partir de micropartículas porosas de PLGA/ β -ciclodextrina em ratos. Ainda avaliaram o perfil de deposição *in vivo* e a atividade hipoglicêmica. Os autores ressaltam a viabilidade do uso deste sistema microestruturado, evidenciando que este foi capaz de alcançar os alvéolos, onde a insulina foi liberada, rapidamente absorvida e, de forma bioativa, capaz de reduzir os níveis de glicose em doses muito baixas.

1.3.4.2 Micropartículas preparadas a partir de carboidratos

Larhrib e colaboradores (1999) prepararam carreadores a partir de lactose contendo sulfato de salbutamol para estabelecer uma relação entre a deposição *in vitro* do fármaco e das propriedades físicas de diferentes graus de lactose. Diferentes graus de lactose demonstraram variações nas propriedades físicas, onde a lactose anidra, que por conter maior concentração de lactose fina, produziu o sistema de liberação mais eficiente. A lactose de grau médio, devido seu diâmetro relativamente pequeno e superfície lisa, induziu a uma melhor dispersão

de salbutamol que os cristais de lactose. Logo pode-se observar que diferentes graus de lactose são capazes de produzir perfis de liberação variáveis, o controle da distribuição de tamanho dos carreadores e da morfologia das partículas pode ser crucial na determinação da reprodutibilidade e eficácia de sistemas de liberação de fármacos pela via pulmonar.

1.3.4.3 Micropartículas lipídicas

Recentemente os lipídios representam um material alternativo ao uso dos polímeros na formulação de sistemas micro- e nanoparticulados. Micro e nanopartículas apresentam a vantagem de ser menos tóxicos, e mais biocompatíveis, uma vez que geralmente são preparadas a partir de lipídios fisiológicos como fosfolipídios, triacilgliceróis, óleos vegetais, entre outros (DEL CURTO et al., 2003; ERNI et al., 2002; HU et al., 2006; LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2001; REITHMEIER; HERMANN; GOPFERICH, 2001; SANNA et al., 2004). A capacidade desses sistemas de incorporar fármacos depende das características de solubilidade destes, da sua miscibilidade no lipídio fundido, estrutura química do lipídio e das propriedades cristalinas lipídicas (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). A fração de fármaco carregado pode variar de 1% a 5% para fármacos hidrofílicos e mais de 80% da massa de fármaco adicionada para preparo das micropartículas, quando esta molécula for hidrofóbica (HU et al., 2005; MUHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998).

Jaspart e colaboradores (2007) prepararam micropartículas lipídicas de behenato de glicerila contendo o broncodilatador salbutamol para tratamento da asma por administração pulmonar. Os autores observaram a formação de um sistema de liberação sustentada microparticulado capaz de ser administrado pela via pulmonar.

Após administração pulmonar o lipídio pode ser eliminado pelo mecanismo de transporte mucociliar, fagocitose ou por absorção sistêmica (NIVEN, 1992).

Sanna e colaboradores (2004) investigaram o potencial toxicológico de micropartículas lipídicas administradas intratraquealmente através do lavado dos fluidos broncoalveolar. Os autores observaram que não houve diferença macroscopicamente detectável entre os pulmões dos cobaias tratados com as micropartículas e aqueles pertencentes ao grupo controle. O peso corporal dos animais também permaneceu inalterado durante os tratamentos. Nos estudos

citológicos não houve diferenças significativas entre os grupos, porém foi observado um aumento da população de macrófagos, indicando que ocorreu o estímulo e influxo destas células, além de um pequeno aumento na resposta neutrofílica e um menor e insignificante aumento das células polimorfonucleares. Estes dados demonstram que as micropartículas lipídicas não induzem significativa inflamação nas vias aéreas dos animais e são toleradas pelo sistema respiratório inferior. Porém não existem muitos estudos que reportem a administração repetida de micropartículas lipídicas a fim de traçar um perfil toxicológico.

Por outro lado, os lipídios comumente utilizados na preparação dos carreadores lipídicos apresentam alto grau de cristalinidade, limitando a capacidade de incorporação de fármacos. Estas partículas são constituídas por uma rede cristalina, em que as moléculas dos lipídios encontram-se altamente organizadas. Desta forma, a incorporação de fármacos ocorre, de forma geral, apenas nos espaços situados entre as cadeias dos lipídios. Em função do limitado espaço na formação das cadeias lipídicas em forma cristalina, o fármaco pode ser expulso durante o processo de recristalização da matriz (FREITAS; MÜLLER, 1999). Além disso, os triacilgliceróis apresentam diferentes formas arquitetônicas dos cristais de lipídio devido às várias possibilidades de empacotamento da cadeia de ácido graxo. A forma polimórfica do lipídio depende da composição dos ácidos graxos, grau de saturação, tamanho da cadeia, número de carbonos, ramificação, entre outros. As formas polimórficas mais comuns nos lipídios são designadas como α , β' , ou β , em ordem crescente de estabilidade termodinâmica. Alguns lipídios ainda podem apresentar as formas sub α (menor estabilidade que a forma α), γ (estabilidade intermediária entre a forma α e a forma β') e formas variadas do polimorfo β , expressas como β_1 e β_2 , cada qual correspondendo a uma organização particular das cadeias de ácidos graxos laterais. Para triacilgliceróis preparados a partir do mesmo ácido graxo, o polimorfo β é o mais estável, enquanto para mistura de ácidos graxos a forma mais estável observada é a do polimorfo β' . O polimorfismo dos lipídios pode afetar significativamente a estabilidade das micropartículas durante o armazenamento, e a capacidade de encapsulação de fármacos, bem como o perfil de liberação desta molécula a partir da matriz lipídica, uma vez que a alteração do estado de empacotamento do lipídio tende a se comportar de forma diferente frente ao fármaco ou no processo de cristalinização do lipídio para formação da micropartícula (BRUBACH et al., 2007;

WINDBERGS; STRACHAN; KLEINEBUDDÉ, 2009; YANO; SATO, 1999).

Até o presente momento, as micropartículas lipídicas tem sido pouco exploradas para a administração de fármacos pela via pulmonar. Dada à boa tolerabilidade e biodegradabilidade do material e às vantagens apresentadas para a via pulmonar, é de extremo interesse o carreamento de fármacos pela via pulmonar através de sistemas de liberação lipídicos contendo substâncias com atividade antiasmática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Matérias-primas

Behenato de glicerila (Compritol[®] 888 ATO, Gatefossé, França)

Lecitina de Soja, 100% de fosfatidilcolina (Lipoid S100, Lipoid GmbH, Alemanha)

Macrogol 15-hidroxiestearato, mono- e diésteres poliglicóis do ácido 12-hidroxiesteárico com cerca de 30% de polietilenoglicol livre (Solulot HS-15[®], Basf, Alemanha)

Polietilenoglicol 400 (Isifar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Poloxamer 188, Copolímero tribloco polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Lutrol F-68 NF[®], BASF, Alemanha).

Quercetina (Sigma-Aldrich, EUA)

Trimiristato de glicerina (Dynasan 114[®], Sasol Germany GmbH, Alemanha)

2.1.2 Reagentes e outros materiais

Ácido Clorídrico (Biotec Reagentes Analíticos, LabMaster, Brasil)

Ácido Fosfórico P.A. (Cromato Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Etanol P.A. (F. Maia Indústria e Comércio LTDA, Brasil)

Hidróxido de Sódio (Cromoline Química Fina Ltda, Brasil)

Metanol P.A (Vetec Indústria Química, Brasil)

Metanol grau HPLC (Panreac, EUA)

Tween 80(Isifar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brasil)

Sacos de diálise (Spectra/Por[®] CE MWCO 10000, EUA)

2.1.3 Equipamentos

Agitador magnético DI-06 (Dist, Brasil)

Agitador magnético com aquecimento ARE (Velp Scientifica, Itália)

Agitador magnético com aquecimento Schott SLR (Schott Instruments, Alemanha)

Agitador tipo vortex KMC-1300V (Vision Scientific CO Ltda, EUA)

Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA)
Banho de ultrassom USC 700 (Unique Indústria e comércio de produtos eletrônicos Ltda, Brasil)
Banho termostaticado Dubnoff CT 232 (Cientec, Brasil)
Calorímetro exploratório diferencial DSC-50 (Shimadzu, Japão)
Centrífuga 4K15 Sigma (Sigma, EUA)
Dissolutor Dissolutor modelo 299 (Nova Ética, Brasil)
Difratômetro à laser Mastersizer 2000 (Malvern, Inglaterra)
Difratômetro de raios-X X'Pert PRO (PANalytical, EUA) equipado com detector X'Celerator.
Espectrofotômetro de absorção de luz na região do UV/Visível UV-1800 (Shimadzu, Japão)
Espectrômetro Raman PeakSeeker 785 RAM-PRO-785 (OceanOptics, Holanda)
Homogeneizador ultrassônico UP 200S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha)
Homogeneizador ultrassônico Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific, EUA)
Liofilizador LD1500 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda, Brasil)
Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV (Jeol Ltd., EUA)
pHmetro Oakton WD-35613-00 (Oakton, EUA)
Porosímetro de mercúrio AutoPore IV 9500 (Micromeritics, EUA)
Recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica Microsystems, EUA)

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparação das micropartículas lipídicas

2.2.1.1 Preparação das micropartículas lipídicas de trimiristato de glicerila (MTL)

As micropartículas lipídicas foram preparadas pelo método de difusão do solvente a quente, conforme descrito por Dora e colaboradores (2011). Brevemente, o trimiristato de glicerila e a lecitina de soja foram adicionados ao etanol e a mistura foi aquecida até 70 °C para completa fusão do lipídio. A mistura foi vertida, sob agitação magnética, em uma solução aquosa de PEG600 estearato 1% (m/V) (Solutol HS15), previamente aquecida a uma temperatura cerca de 30° C acima da temperatura de fusão do lipídio (85° C). A emulsão óleo em água (o/a) formada foi submetida à agitação em um homogeneizador ultrassônico UP200S (Hielscher, Alemanha) com amplitude de 25%, ciclo de 1,0 e tempo de 30 segundos e, em seguida, foi mantida sob agitação magnética até resfriamento à temperatura ambiente. Após repouso de 24 horas, as micropartículas formadas foram centrifugadas, lavadas três vezes com água destilada, e, então, liofilizadas.

Para preparação das micropartículas contendo quercetina (MTL-Q), o polifenol foi adicionado à fase orgânica nas proporções 1:25 e 1:50 (m/m), em relação à massa de lipídio. As formulações de micropartículas de trimiristato de glicerila encontram-se mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Composição das formulações de micropartículas lipídicas de trimiristato de glicerila (MTL)

Constituintes	MTL	MTL _{Q1:25}	MTL _{Q1:50}
Trimiristato de glicerila (g)	5,0	5,0	5,0
Lecitina de soja (g)	0,5	0,5	0,5
Quercetina (g)	-	0,2	0,1
Etanol (mL)	25,0	25,0	25,0
Solução de PEG600 estearato 1% (m/V) (mL)	250,0	250,0	250,0

2.2.1.2 Preparação das micropartículas lipídicas de behenato de glicerila (MB e MBL)

As micropartículas lipídicas foram preparadas pelo método de emulsão a quente (Jaspart et al., 2007). O behenato de glicerila, ou uma mistura deste lipídio com a lecitina de soja, foram primeiramente aquecidos a 80 °C para completa fusão. Uma solução aquosa de Poloxamer 188 0,5% (m/V) (Lutrol F68), previamente aquecida a uma temperatura de 90° C foi vertida sobre o lipídio fundido. A emulsão óleo em água (o/a) formada foi, então, submetida à agitação em homogeneizador ultrassônico Sonic Dismembrator Model 500 (Fisher Scientific, EUA) com amplitude de 10%, e tempo de 30 segundos, e posteriormente mantida sob agitação magnética até resfriamento à temperatura ambiente. Após repouso por 24 horas, as micropartículas formadas foram centrifugadas, lavadas três vezes com água destilada e, então, liofilizadas.

Para preparação das micropartículas contendo quercetina (MB-Q e MBL-Q), o polifenol foi adicionado no estado sólido no lipídio fundido nas proporções 1:25 e 1:50 (m/m), em relação à massa de lipídio. As formulações de micropartículas de behenato de glicerila sem e com lecitina encontram-se nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Composição das formulações de micropartículas lipídicas de behenato de glicerila (MB)

Constituintes	MB	MB _{Q1:25}	MB _{Q1:50}
Behenato de glicerila (g)	5,0	5,0	5,0
Lecitina de soja (g)	-	-	-
Quercetina (g)	-	0,2	0,1
Solução de Poloxamer 188 0,5% (m/V) (mL)	250,0	250,0	250,0

Tabela 3. Composição das formulações de micropartículas lipídicas de behenato de glicerila contendo lecitina de soja (MBL)

Constituintes	MBL	MBL _{Q1:25}	MBL _{Q1:50}
Behenato de glicerila (g)	5,0	5,0	5,0
Lecitina de soja (g)	0,5	0,5	0,5
Quercetina (g)	-	0,2	0,1
Solução de Poloxamer 188 0,5% (m/V) (mL)	250,0	250,0	250,0

2.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da quercetina por espectroscopia de absorção no ultravioleta

2.2.2.1 Determinação do tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas

Cerca de 50 mg de micropartículas, exatamente pesadas, foram adicionadas em balões volumétricos de 10,0 mL e o volume completado com metanol. As amostras foram mantidas sob agitação magnética por períodos de 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas e, então, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído conforme necessidade e analisado por espectroscopia de absorção de luz na região do UV (Shimadzu, Japão) com comprimento de onda de 375 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os valores expressos em concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).

2.2.2.2 Validação da técnica de quantificação da quercetina nas micropartículas

O método espectrofotométrico foi validado de acordo com o ICH (2005) utilizando os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e determinação dos limites de detecção e quantificação.

2.2.2.2.1 Especificidade

Para avaliar a especificidade do método, 50 mg de micropartículas brancas (sem quercetina) foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com metanol. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética durante 2 horas e, em seguida, centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção UV/Vis na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm, contra o mesmo solvente. Os espectros resultantes foram comparados com o espectro de uma solução padrão de quercetina 5,0 $\mu\text{g/mL}$, analisada nas mesmas condições.

2.2.2.2.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração em três dias diferentes. Cerca de 50 mg de quercetina exatamente pesados foram dissolvidos em metanol e o volume foi completado até 10 mL em balão volumétrico. Esta solução foi diluída com metanol para obter soluções de quercetina nas concentrações de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; e 10,0 µg/mL. As soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível com comprimento de onda de 375 nm, contra o mesmo solvente. As soluções foram preparadas em triplicata e as médias das absorbâncias referentes a cada concentração foram utilizadas para a construção de uma curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram determinados pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

O limite de detecção foi determinado conforme a equação 1:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad \text{equação 1}$$

onde LD é o limite de detecção, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é a inclinação da reta.

O limite de quantificação foi determinado utilizando a equação 2:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad \text{equação 2}$$

onde LQ é o limite de quantificação, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é a inclinação da reta.

2.2.2.2.3 Precisão

Cerca de 50 mg de micropartículas lipídicas foram exatamente pesados, transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com metanol. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética durante 2 horas e então centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção no UV no comprimento de onda de 375 nm, contra o mesmo solvente. A repetibilidade foi avaliada pela análise de seis amostras no

mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada por meio da análise de seis amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa como porcentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

2.2.2.2.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, 50 mg de micropartículas brancas foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL. As amostras foram contaminadas com uma solução padrão de quercetina em três diferentes níveis (baixo, médio e alto), correspondendo a concentrações finais de 5,0, 10,0, ou 20,0 µg/mL, e o volume foi completado com metanol. Estas misturas foram mantidas sob agitação magnética durante 2 horas e, em seguida, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada uma das amostras foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção no UV com comprimento de onda de 375 nm, contra o mesmo solvente. As análises foram realizadas em triplicata, e a recuperação (R%) foi estimada utilizando a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{C_A}{C_t} \times 100 \quad \text{equação 3}$$

onde R% é a recuperação, e C_A e C_t a concentração de quercetina encontrada e teórica, respectivamente, expressa em µg/mL.

2.2.2.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método de extração da quercetina a partir das micropartículas lipídicas foram alteradas as condições de extração: massa de micropartículas (40, 50 e 60 mg), tempo de extração (1, 2 e 3 horas), e comprimento de onda de análise (373, 375 e 377 nm).

2.2.2.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas

Cerca de 50 mg de micropartículas foram exatamente pesados, transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL, e o volume foi completado com metanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética

durante 2 horas e, em seguida, foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção no ultravioleta com comprimento de onda de 375 nm. A concentração de quercetina foi estimada correlacionando a absorbância da amostra com aquela produzida por uma solução padrão do fármaco de concentração conhecida (5,0 µg/mL).

A eficiência de encapsulação (EE%) e o teor de fármaco (mg de quercetina/100 mg de micropartículas) foram calculados conforme as equações 5 e 4, respectivamente.

$$Teor = \left(\frac{C_{QU} \times 10}{M_M} \right) \times 100 \quad \text{equação 4}$$

$$EE\% = \left(\frac{Teor \times M_{MP}}{100 \times M_I} \right) \times 100 \quad \text{equação 5}$$

onde C_{QU} é a concentração de quercetina na solução obtida após extração do polifenol em metanol (mg/mL), M_M é a massa pesada de micropartículas lipídicas (mg), M_I é a massa inicialmente adicionada de quercetina na formulação (mg), M_{MP} é a massa das matérias-primas empregados na preparação das micropartículas lipídicas (mg).

2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA QUERCETINA FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

A formação de eventuais produtos de degradação da quercetina durante as etapas de preparação das micropartículas lipídicas foi avaliada por espectroscopia de absorção no UV/Vis por meio de comparação dos espectros dos produtos de degradação da quercetina obtidos após exposição da matéria-prima em diferentes condições de estresse.

2.3.1 Análise por espectroscopia de absorção no UV/Vis

As soluções obtidas após indução da quercetina à degradação (descrito em 2.3.2, 2.3.3, e 2.3.4) e aquelas obtidas após extração da quercetina a partir das microesferas lipídicas (conforme descrito em 2.2.2.3), foram diluídas em metanol:solução aquosa de ácido fosfórico

(75:25, pH 2,7) e analisadas em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão). Espectros varredura foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm. Os espectros resultantes foram comparados com aqueles obtidos a partir de uma solução padrão de quercetina 4 µg/mL, analisadas nas mesmas condições. As análises foram realizadas em triplicata.

2.3.2 Degradação por hidrólise

Soluções de quercetina 100 µg/mL em metanol:água (40:60, v/v) foram preparadas e o pH foi ajustado para valores de pH 3 e 5 (hidrólise ácida), pH 7 (hidrólise neutra), ou pH 9 e 11 (hidrólise alcalina). As soluções foram mantidas a 40 °C, 60 °C ou 80 °C em banho termostaticado. Após 6 horas, o pH das amostras foi ajustado mediante diluição na proporção 1:5 em solução metanol:solução aquosa de ácido fosfórico 1% (75:25, V/V, pH 2,7) e analisadas por espectroscopia de absorção no UV nas condições descritas em 3.2.1.

2.3.3 Degradação por oxidação

Uma solução de quercetina 100 µg/mL foi preparada utilizando uma mistura de metanol:peróxido de hidrogênio 30% 40:60 (V/V), como solvente, a fim de assegurar a solubilidade do flavonoide. Esta solução foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e, após 6 horas, as amostras foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV/Vis, conforme nas condições descritas em 2.3.1.

2.3.4 Degradação térmica da quercetina no estado sólido

Cerca de 100 mg de quercetina foram submetidos ao aquecimento em estufa a 100 °C durante 60 horas. Uma solução metanólica a 5,0 µg/mL foi então preparada a partir desta amostra e analisada por espectroscopia de absorção no UV/Vis nas condições descritas em 2.3.1.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

2.4.1 Avaliação da morfologia das micropartículas lipídicas

A avaliação da morfologia das micropartículas lipídicas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Jeol JSM-G390LV (Jeol, EUA) utilizando voltagem de 10 kV. As amostras foram fixadas com cola carbono em suportes e recobertas por uma fina camada de ouro de 30 nm em recobridora à vácuo Leica EM SCD500 (Leica, EUA). As micrografias foram obtidas com aumento de 400, 800 e 1200 vezes.

Este estudo foi realizado em parceria com o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.4.2 Determinação da densidade bruta e de compactação

Este ensaio foi realizado conforme descrito por British Pharmacopoeia VI (2007), onde amostras de 500 mg dos diferentes lotes de micropartículas lipídicas foram colocadas em provetas de 5,0 mL. Os pós foram então submetidos a 100 quedas, até que a redução do volume (V_2) não fosse mais observada. As densidades brutas e de compactação foram calculadas por meio das equações 6 e 7, respectivamente.

$$d_b = \frac{m}{V_1} \quad \text{equação 6}$$

$$d_c = \frac{m}{V_2} \quad \text{equação 7}$$

onde m é massa de micropartículas adicionadas à proveta, V_1 o volume ocupado pelas micropartículas na proveta sem compactação, e V_2 o volume ocupado pelas micropartículas após compactação.

2.4.3 Determinação da porosidade das micropartículas lipídicas por porosimetria de mercúrio

A porosimetria de intrusão de mercúrio foi realizada utilizando porosímetro AutoPore IV 9500 (Micromeritics, EUA). Cerca de 200 mg de amostra, exatamente pesados, foram inseridos no penetrômetro de

pós com 3cc, com constante de capacitância de 22285 $\mu\text{L/pF}$. As análises foram realizadas sob baixa e alta pressão. Curvas de volume de intrusão de mercúrio por pressão foram realizadas e a área superficial, assim como o volume, tamanho médio de poros, porcentagem de poros nas micropartículas e densidade aparente esquelética foram determinados utilizando o *software* AutoPore IV 9500 V1.05.

Este ensaio foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Adilson Luiz Chinelatto no Laboratório de Caracterização Físico-Química do Departamento de Engenharia de Materiais na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

2.4.4 Avaliação do tamanho médio e distribuição granulométrica das micropartículas lipídicas.

2.4.4.1 Tamanho e distribuição granulométrica das partículas

A distribuição granulométrica das micropartículas lipídicas foi determinada por difratometria à laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632,8 nm) de um laser de He Ne, com obscurecimento entre 10 e 13%. Para as análises, cerca de 50 mg de cada uma das amostras foram previamente dispersas em água, ou em solução aquosa de tween 80 0,15% (m/v), com auxílio de ultrassom (Dist, Brasil). As micropartículas foram analisadas em triplicata. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de Franhöffer e expressa em diâmetro por volume equivalente a 10 ($d_{10\%}$), 50 ($d_{50\%}$) e 90% ($d_{90\%}$) do volume acumulado, e diâmetro médio ($D[4,3]$). O span foi calculado segundo a equação 8 (PARLATI, 2008).

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad \text{equação 8}$$

2.4.4.2 Determinação do diâmetro aerodinâmico médio (MMAD)

O diâmetro aerodinâmico médio mássico foi determinado conforme descrito por Ungaro e colaboradores (2009), utilizando a equação 9.

$$MMAD = MMGD \times \sqrt{\frac{r}{(d_o \times X)}} \quad \text{equação 9}$$

onde $MMGD$ é o diâmetro geométrico médio; r é calculado pela equação 10; d_o é a densidade referência (1 g/mL); e X é o fator forma da partícula ($X = 1$ quando partículas esféricas).

$$r = d_s \times (1 - \varepsilon) \quad \text{equação 10}$$

sendo d_s a densidade aparente esquelética e ε é a porosidade das partículas.

A densidade aparente esquelética é determinada através do volume que uma determinada massa de pó apresenta, excluindo o volume ocupado pelos poros e pelos espaços entre as partículas.

$$d_s = \frac{m}{[V_A - (V_P + V_E)]} \quad \text{equação 11}$$

onde m é a massa dos pós, V_A é o volume ocupado pela amostra, V_P o volume ocupado pelos poros, e V_E o volume ocupado pelos espaços entre as partículas formadoras do pó.

Para avaliação do diâmetro aerodinâmico correspondente a 50% da distribuição acumulada foi utilizada a equação 12, utilizando o diâmetro de 50% do volume da curva acumulada ($d_{50\%}$).

$$MMAD_{50\%} = d_{50\%} \times \sqrt{\frac{r}{(r_o \times X)}} \quad \text{equação 12}$$

2.4.5 Avaliação das propriedades de fluxo das micropartículas

As propriedades de fluxo das micropartículas foram avaliadas empregando o índice de compressibilidade ou índice de Carr, conforme equação 13

$$\text{Índice de Carr} = \left(\frac{d_c - d_b}{d_c} \right) \times 100 \quad \text{equação 13}$$

onde: d_b e d_c são as densidades brutas e de compactação, respectivamente. Conforme os valores de índice de Carr obtidos, o fluxo dos pós foi determinado de acordo com a tabela 4 como: excelente, bom, favorável a tolerável, ruim/fluido, ruim/coesivo, muito ruim e extremamente ruim (AULTON et al., 2005).

Tabela 4. Relação fluidez e índice de Carr.

Tipo de fluxo	Índice de Carr (%)
Excelente	5 – 12
Bom	12 – 18
Favorável a tolerável	18 – 21
Ruim/Fluido	21 – 25
Ruim/Coesivo	25 – 32
Muito ruim	32 – 38
Extremamente ruim	> 38

2.4.6 Difração de Raios-X

As amostras e as matérias-primas foram adicionadas a um porta amostra e analisadas a temperatura ambiente nos ângulos (2θ) de 3° a 60° com passo de $0,03^\circ$ em tempo de 1 segundo utilizando um difratômetro de raios-X X'Pert PRO equipado com detector X'Celerator (PANanalytical, Holanda). Para emissão dos raios-X foi utilizado ânodo de cobre, que emite radiação $K\alpha$, com comprimento de onda de $1,5418 \text{ \AA}$, e fluxo definido pela voltagem de 45 kV e intensidade de corrente de 40 mA. A configuração utilizada foi formada por tubo de cobre, fenda soller de $0,04 \text{ rad}$, fenda divergente de $1/4^\circ$, máscara de 10 mm, fenda anti-espalhamento de $1/2^\circ$, porta amostra, fenda antiespalhamento 5 mm, fenda soller de $0,04 \text{ rad}$, filtro de níquel, e detector X'Celerator.

A distância interplanar dos cristais foi determinada a partir dos centroides dos picos de difração, segundo equação de Bragg, como descrito abaixo:

$$n\lambda = 2d \times \sin \theta \quad \text{equação 14}$$

onde n é um número inteiro, λ o comprimento de onda, d a distância interplanar, e θ o ângulo de Bragg.

Este estudo foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos, usando as instalações multiusuário do Laboratório de Difração de Raios-X, (LDRX) do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.4.7 Espectroscopia de Raman

Espectros Raman foram obtidos após análise das amostras e das matérias-primas em um espectrofotômetro Raman PeakSeeker 785 RAM-PRO-785 (Agiltron, EUA) com fonte de excitação laser em 785 nm. As análises foram realizadas com potência de saída de 300 mW, com tempo de integração de 15 segundos e resolução de 6 cm^{-1} . As análises foram realizadas no estado sólido e em temperatura ambiente.

Este estudo foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campo do Departamento de Física da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.4.8 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC-50 (Shimadzu, Japão). Para as análises, cerca de 5 a 15 mg das amostras ou das matérias-primas foram exatamente pesados em cápsulas de alumínio, as quais foram lacradas. As amostras foram então submetidas ao resfriamento com nitrogênio líquido até temperatura de $-10 \text{ }^\circ\text{C}$, e, em seguida, foram aquecidas até $220 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de aquecimento de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio. As temperaturas de fusão foram então obtidas a partir das curvas termoanalíticas, e a entalpia de fusão a partir da área do pico de fusão correspondente. A cristalinidade relativa do lipídio na matriz das micropartículas foi calculada utilizando a equação 15 (GUARINO et al., 2009).

$$CR\% = \frac{\Delta H_{fA}}{\Delta H_{fMP}} \times 100 \quad \text{equação 15}$$

onde CR% é a cristalinidade relativa do lipídio constituinte da matriz das micropartículas, ΔH_{fA} é a entalpia de fusão do lipídio constituinte da

matriz das micropartículas (J/g), e ΔH_{fMP} é a entalpia de fusão do lipídio como matéria-prima.

Este estudo foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Valdir Soldi no Laboratório de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT) do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DA QUERCETINA A PARTIR DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

2.5.1 Seleção do meio de dissolução

2.5.1.1 Avaliação da estabilidade da quercetina nos diferentes meios de dissolução

Exatamente cerca de 50,0 mg de quercetina foram pesados para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com metanol. Esta solução foi apropriadamente diluída para obter soluções de quercetina 5,0 $\mu\text{g/mL}$ nos seguintes meios de dissolução: tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V, pH 7,4), PEG 400:água 2:8 (V/V) pH 4,0, PEG 400:água 3:7 (V/V) pH 4,0; PEG 400:água 4:6 (V/V) pH 4,0. Quando tampão fosfato pH 7,4 foi usado sozinho ou em mistura com PEG, o efeito da adição de albumina sérica bovina 15 μM (BSA), ácido ascórbico (0,05 ou 0,1% , m/V) e do metabissulfito de sódio (0,5% ou 1 % , m/V), sobre a estabilidade da quercetina, foi avaliado. As soluções foram mantidas sob agitação magnética, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, as soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV entre 200 e 600 nm, contra o mesmo solvente.

2.5.1.2 Avaliação da solubilidade da quercetina no meio de dissolução

Em um balão volumétrico de 10,0 mL foi adicionada uma quantidade em excesso de quercetina e o volume completado com os meios de dissolução. As misturas foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e após 24 horas foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos, os sobrenadantes foram coletados e analisados por espectroscopia de absorção UV a 375 nm, contra o mesmo solvente. As absorbâncias das amostras foram

comparadas com uma solução padrão de quercetina 5,0 µg/mL preparada nas mesmas condições.

2.5.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração em três dias diferentes. Cerca de 50 mg de quercetina exatamente pesados foram dissolvidos em metanol e o volume foi completado até 10 mL em balão volumétrico. Esta solução foi diluída em mistura de PEG 400:Água 4:6 (V/V, pH 4,0) para obter soluções de quercetina nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; e 12,0 µg/mL. As soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível com comprimento de onda de 375 nm, contra a mesma mistura. As soluções foram preparadas em triplicata e as médias das absorbâncias referentes a cada concentração foram utilizadas para a construção de uma curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram determinados pela análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

O limite de detecção foi determinado utilizando a equação 1.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad \text{equação 1}$$

onde LD é o limite de detecção, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é a inclinação da reta. O limite de quantificação foi determinado utilizando a equação 2.

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad \text{equação 2}$$

onde LQ é o limite de quantificação, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é a inclinação da reta.

2.5.3 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da quercetina a partir das micropartículas lipídicas

Para realização do ensaio de dissolução cerca de 300 mg de micropartículas lipídicas foram exatamente pesados e transferidos para

sacos de diálise (Spectra/Por[®] CE MWCO 10000, EUA). Os sacos de diálise foram fechados e colocados em 300 mL de uma mistura de PEG 400:água (4:6 V/V, pH 4,0). O ensaio foi conduzido em aparelho de dissolução Dissolutor modelo 299 (Nova Ética, Brasil) sob agitação de 75 rpm utilizando o aparato pá, e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Alíquotas de 5 mL foram coletadas em intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 24 horas, e o volume foi repostado com meio de dissolução fresco. As alíquotas foram analisadas por espectroscopia de absorção no UV a 375 nm contra o meio de dissolução. A partir dos resultados, gráficos de porcentagem de quercetina liberada (%) em função do tempo foram construídos. Valores de eficiência de dissolução (ED%) foram obtidos por meio da seguinte equação:

$$ED\% = \frac{ASC}{A_r} \times 100 \quad \text{equação 16}$$

onde ASC é a área sob a curva do perfil de dissolução calculada através da integração da curva do perfil de liberação da quercetina a partir das micropartículas lipídicas e A_r é a área do retângulo definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a 24 horas).

Os valores de ED% foram comparados estatisticamente por meio da ANOVA, seguida do teste t para comparação entre as médias.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada a partir da Análise da Variância (ANOVA) utilizando $\alpha = 0,05$ para os resultados de determinação do tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas (2.2.2.1), teor e eficiência de encapsulação das micropartículas (2.2.2.3), e eficiência de dissolução (2.5.3). Os resultados foram expressos em média de três determinações e os valores analisados e comparados por meio da Análise da Variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$). Quando diferença significativa entre as médias foi detectada, a determinação de onde esta diferença ocorreu foi realizada pela aplicação do teste t, onde a diferença mínima significativa é calculada empregando-se a equação 17.

$$d. m. s. = t \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times QMR} \quad \text{equação 17}$$

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR E DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA QUERCETINA

3.1.1 Determinação do tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas

A fim de otimizar o tempo de extração da quercetina a partir das micropartículas lipídicas as amostras MTL_{Q1:25} e MB_{Q1:25} foram submetidas à extração conforme descrito em 2.2.2.1. Os resultados são mostrados na tabela 5. Conforme análise da variância, os valores de $F_{\text{calculado}}$ para MTL_{Q1:25} e MB_{Q1:25} foram 1,914 e 2,326, respectivamente ($F_{\text{crítico}} = 3,478$, $\alpha = 0,05$). A ANOVA revelou, portanto, ausência de diferença estatística entre os valores encontrados para ambas as amostras, indicando que concentração de quercetina não foi afetada pelo tempo de extração, nas condições utilizadas. Entretanto, a fim de estabelecer maior segurança no processo de extração, o tempo de 2 horas foi estabelecido para todas as análises posteriores.

Tabela 5. Concentração de quercetina na solução metanólica após extração a partir das micropartículas lipídicas (n = 3).

Tempo (horas)	MTL_{Q1:25} (µg/mL) ± σ	MB_{Q1:25} (µg/mL) ± σ
0,5	177,83 ± 3,91	184,76 ± 2,08
1,0	178,06 ± 1,35	186,14 ± 2,53
2,0	176,25 ± 6,14	188,66 ± 2,36
3,0	169,26 ± 2,03	189,86 ± 3,38
4,0	172,87 ± 7,18	188,46 ± 0,04

onde σ é o desvio padrão.

Tabela 6. Dados obtidos pela análise da variância (ANOVA) da curva de extração de quercetina a partir da amostra MTL_{Q1:25} ($\alpha = 0,05$).

Fonte da variação	SQ*	gl**	MQ***	F_{calculado}	Valor de P	F_{crítico}
Tratamento	169,109	4	42,277	1,914	0,185	3,478
Resíduo	220,934	10	22,093			
Total	390,043	14				

SQ* é a soma dos quadrados; gl** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados.

$\alpha = 0,05$

Tabela 7. Análise da variância (ANOVA) da curva de extração de quercetina a partir da amostra MB_{Q1:25} ($\alpha = 0,05$).

Fonte da variação	SQ*	gl**	MQ***	F _{calculado}	Valor de P	F _{crítico}
Tratamento	51,558	4	12,890	2,326	0,127	3,478
Resíduo	55,424	10	5,542			
Total	106,982	14				

SQ* é a soma dos quadrados; gl** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados.

$\alpha = 0,05$

3.1.2 Validação da técnica de quantificação da quercetina nas micropartículas

3.1.2.1 Especificidade

A figura 8 apresenta o espectro de absorção no UV/Vis das amostras brancas MTL, MB e MBL, e de uma solução de quercetina 5,0 $\mu\text{g/mL}$. O método é específico para a quantificação da quercetina, uma vez que as amostras brancas não apresentaram absorbância de luz no comprimento de onda de 375 nm.

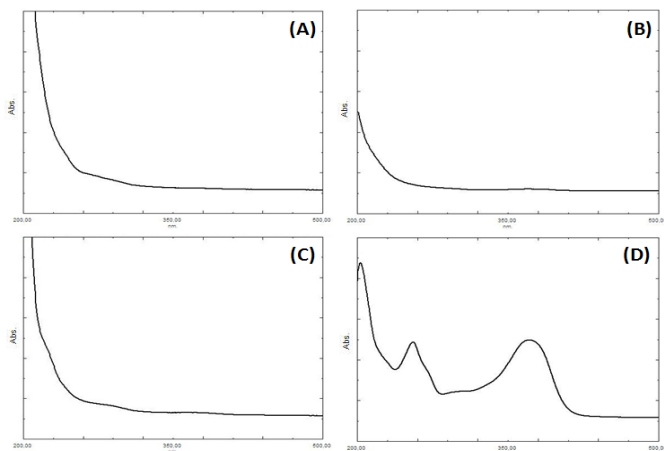


Figura 8. Espectro de absorção no UV/Vis das amostras: (A) MTL; (B) MB; (C) MBL; e de uma solução padrão de quercetina 5,0 $\mu\text{g/mL}$.

3.1.2.2 Linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A figura 9 exibe uma curva padrão representativa de quercetina em metanol. A curva de calibração da quercetina foi linear na faixa de concentração de 2,0 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de correlação de 0,9989 ($y = 0,0740x + 0,0010$). A análise da variância confirmou a linearidade do método ($F_{\text{calculado}} 6332,0130 > F_{\text{crítico}} 2,8477, \alpha = 0,05$). A ausência de erro sistemático constante também foi verificada, uma vez que os valores do intervalo de confiança do intercepto incluíram o valor zero ($\text{IC} = -0,006157 \text{ a } 0,008265, \alpha = 0,05$). O limite de detecção e de quantificação foram $0,18 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $0,56 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando que o método foi suficientemente sensível para determinar o teor de quercetina nas micropartículas lipídicas.

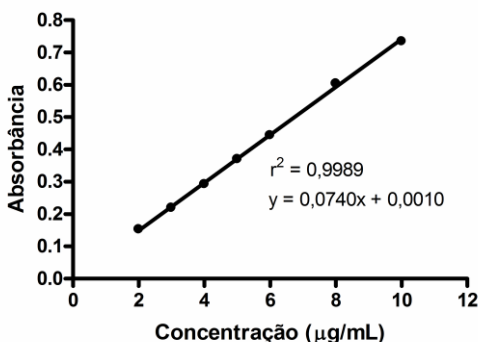


Figura 9. Curva de calibração da quercetina em metanol.

3.1.2.3 Precisão intra- e interdia

A repetibilidade do método (precisão intradia) foi avaliada após análise das soluções obtidas após extração das $\text{MTL}_{\text{Q1:25}}$ e $\text{MB}_{\text{Q1:25}}$ por espectroscopia de absorção no UV a 375 nm ($n = 6$) (Tabela 8). Para avaliação da precisão intermediária (interdia), três amostras de cada uma das formulações foram analisadas em três dias diferentes (Tabela 9). Os valores de DPR para todas as análises foram menores que 3%, indicando uma variabilidade aceitável na concentração de quercetina obtida após extração por metanol ($P < 0,05$).

Tabela 8. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade do método UV para determinação da quercetina.

Repetições	MTL _{Q1:25}			MBL _{Q1:25}		
	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)
1	177,31			186,34		
2	172,64			189,60		
3	176,70	175,64	2,14	189,30	187,95	1,18
4	170,26			186,03		
5	175,97			190,82		
6	180,99			185,60		

onde conc. é concentração.

Tabela 9. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método UV para determinação da quercetina.

Dia	MTL _{Q1:25}			MB _{Q1:25}		
	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)
1	176,54 ± 0,68			186,17 ± 3,52		
2	175,08 ± 2,34	176,55	1,05	186,98 ± 2,02	186,41	1,36
3	178,02 ± 1,19			185,91 ± 3,27		

onde conc. é concentração.

3.1.2.4 Exatidão

A tabela 10 apresenta os valores de recuperação da quercetina adicionada às amostras brancas de MTL e MB. Todos os valores permaneceram na faixa de 97 a 103%, evidenciando a exatidão do método.

Tabela 10. Recuperação da quercetina após contaminação das amostras de MLT e MB com uma solução padrão.

	Concentração teórica de quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental de quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
MLT	5,0	4,91	98,14	0,96
	10,0	10,07	100,67	0,38
	20,0	19,83	99,14	0,82
MB	5,0	4,95	99,07	0,99
	10,0	9,92	99,17	0,73
	20,0	20,03	100,15	0,55

3.1.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método analítico três parâmetros de análise foram variados: massa de amostra pesada, tempo de extração e comprimento de onda. Como observado nas tabelas 12 e 13, verifica-se que o método de quantificação da quercetina extraída a partir das micropartículas lipídicas por espectroscopia no UV é robusto quanto aos parâmetros avaliados, uma vez que os valores de $F_{\text{calculado}}$ são inferiores aos de $F_{\text{crítico}}$ para as micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila e behenato de glicerila ($F_{\text{calculado}} 0,429 < F_{\text{crítico}} 2,510$ e $F_{\text{calculado}} 0,836 < F_{\text{crítico}} 2,510$, respectivamente).

Tabela 11. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação da quercetina por UV.

Variação		MTL _{Q1:25}		MB _{Q1:25}	
		Conc. ($\mu\text{g/mL}$) ^a	DPR (%)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$) ^a	DPR (%)
Massa de amostra (mg)	40	176,14	1,44	186,45	2,20
	50	175,64	2,14	187,95	1,18
	60	177,64	2,34	189,34	1,80
Tempo de extração (h)	1	178,14	2,55	185,89	1,94
	2	175,64	2,14	187,95	1,18
	3	175,88	1,09	189,92	1,06
Comprimento de onda (nm)	373	178,64	1,71	187,67	2,19
	375	175,64	2,14	187,95	1,18
	377	178,32	1,42	191,12	1,67

onde conc. é concentração.

Tabela 12. Análise da variância (ANOVA) da curva da robustez realizada a partir da amostra MTL_{Q1:25} ($\alpha = 0,05$).

Fonte da variação	SQ*	gl**	MQ***	F _{calculado}	Valor de P	F _{crítico}
Tratamento	40,471	8	5,059	0,429	0,888	2,510
Resíduo	212,298	18	11,793			
Total	252,769	26				

SQ* é a soma dos quadrados; gl** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados. $\alpha = 0,05$

Tabela 13. Análise da variância (ANOVA) da curva da robustez realizada a partir da amostra MB_{Q1:25} ($\alpha = 0,05$).

Fonte da variação	SQ*	gl**	MQ***	F _{calculado}	Valor de P	F _{crítico}
Tratamento	64,890	8	8,111	0,836	0,584	2,510
Resíduo	174,667	18	9,703			
Total	239,557	26				

SQ* é a soma dos quadrados; gl** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados. $\alpha = 0,05$

3.1.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas

A tabela 14 apresenta os valores de eficiência de encapsulação e teor da quercetina nas micropartículas lipídicas preparadas com trimiristato de glicerila (MTL) e com behenato de glicerila na ausência ou presença de lecitina (MB e MBL), e nas duas proporções de quercetina/lipídio (1:25 ou 1:50, m/m). Como pode ser observado nessa tabela, os valores de EE% foram elevados quando o behenato de glicerila foi empregado como lipídio, independente da presença de lecitina e da proporção de quercetina/lipídio. Entretanto, quando o trimiristato de glicerila foi utilizado, a EE% diminuiu consideravelmente com a redução de quercetina adicionada à formulação. Os valores de teor de quercetina variaram de 0,52 a 3,84 (%), dependendo da formulação testada. Para verificar se esses valores foram estatisticamente diferentes, a análise da variância de duas vias foi realizada. A análise estatística evidenciou que o teor de fármaco diferiu significativamente, dependendo do tipo de lipídio e da proporção de quercetina/lipídio usada na formulação ($F_{\text{calculado}} 173,050 > F_{\text{crítico}} 3,885$ e $F_{\text{calculado}} 1391,740 > F_{\text{crítico}} 4,747$, respectivamente, $\alpha = 0,05$) (Tabela 15), assim como a eficiência de encapsulação ($F_{\text{calculado}} 279,973 > F_{\text{crítico}} 3,885$ e $F_{\text{calculado}} 224,885 > F_{\text{crítico}} 4,747$, respectivamente, $\alpha = 0,05$) (tabela 16).

Tabela 14. Eficiência de encapsulação (EE%) e teor de quercetina nas micropartículas lipídicas (n = 3).

Amostras	Teor (% , m/m)	EE%
MTL _{Q1:25}	3,36 ± 0,10	95,70 ± 2,82
MTL _{Q1:50}	0,52 ± 0,01	29,35 ± 0,61
MB _{Q1:25}	3,84 ± 0,06	99,80 ± 1,68
MB _{Q1:50}	1,95 ± 0,05	99,57 ± 2,50
MBL _{Q1:25}	3,10 ± 0,11	88,51 ± 3,19
MBL _{Q1:50}	1,69 ± 0,04	94,47 ± 2,26

Tabela 15. Análise da variância (ANOVA) do teor de quercetina das micropartículas.

Fonte da variação	SQ*	GL**	MQ***	F _{calculado}	F _{crítico}
Tipo de lipídio	2,719	2	1,359	173,050	3,885
Massa de quercetina	18,788	1	18,788	1391,740	4,747
Tipo de Lipídio + Massa de quercetina	1,560	2	0,780	99,320	3,885
Resíduo	0,094	12	0,008		
Total	23,162	17	1,362		

SQ* é a soma dos quadrados; GL** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados. $\alpha = 0,05$

Tabela 16. Análise da variância (ANOVA) da eficiência de encapsulação da quercetina nas micropartículas.

Fonte da variação	SQ*	GL**	MQ***	F _{calculado}	F _{crítico}
Tipo de lipídio	4572,944	2	2286,472	279,973	3,885
Massa de quercetina	1836,584	1	1836,584	224,885	4,747
Tipo de Lipídio + Massa de quercetina	4821,761	2	2410,880	295,206	3,885
Resíduo	98,001	12	8,167		
Total	11329,290	17	66,429		

SQ* é a soma dos quadrados; GL** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados. $\alpha = 0,05$

Através do pós-teste pode-se observar que nenhum dos teores foi estatisticamente semelhante. Quanto à eficiência de encapsulação, somente não existe diferença significativa entre as amostras MB_{Q1:25} e MB_{Q1:50}, indicando que a proporção de quercetina:lipídio (m/m) não interfere neste parâmetro, assim como nos casos das amostras MB_{Q1:25} e MTL_{Q1:25}, e nas amostras MB_{Q1:50} e MBL_{Q1:50}, sugerindo que nestas proporções de quercetina:lipídio não existe diferença entre o trimiristato de glicerila com lecitina de soja e o behenato de glicerila, e a adição ou ausência de lecitina de soja nas micropartículas preparadas a partir do behenato de glicerila, respectivamente.

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA QUERCETINA FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Com o objetivo de avaliar a estabilidade química da quercetina frente às condições de preparação, os espectros de absorção no UV/Vis das soluções obtidas após extração da quercetina das micropartículas com metanol foram comparados com aqueles obtidos a partir de soluções de quercetina submetidas a diferentes condições de estresse (Figuras 10).

O espectro no UV/Vis de flavonoides exibe duas principais bandas de absorção na região de 240 – 400 nm. A banda I (300 – 380 nm) é associada com absorção devido ao sistema cinamoil no anel B, e a banda II (240 – 280 nm) associada com absorção devido ao sistema benzoil no anel A. Para a quercetina, essas duas bandas exibem máximos de absorção a 373 e 257 nm, respectivamente (NASEEM et al., 2004; TIMBOLA et al., 2006) (Figura 10A).

As figuras 10B, 10C e 10D mostram os espectros de absorção da quercetina submetida à degradação por hidrólise alcalina, oxidação induzida por peróxido de hidrogênio e degradação induzida pela temperatura, respectivamente.

Zhou, Kikandi e Sadik (2007) sugerem que o mecanismo de degradação da quercetina envolva a oxidação da molécula levando à formação de uma estrutura fenol, semi-quinona, *o*-quinona e metano *p*-quinona. A instabilidade destas moléculas faz com que estas sejam induzidas a sucessivos processos de tautomerização ou rearranjo. A esterificação ou a produção de produtos ácidos, devido presença de solvente também foi observada pelos autores, que propõem a posterior

formação de dímeros de ácidos fenólicos. A produção destes produtos de degradação se reflete nos espectros no UV. Junto aos principais picos do espectro da quercetina, 373, 257 nm, e ombro em 272 nm, surge um novo pico em 335 nm com absorvância elevada, indicando a formação da estrutura quinona. A absorvância deste pico começa ser reduzida para o desaparecimento do ombro em 272 nm, surgindo outro pico em 293 nm. Então ocorre um deslocamento hipocrômico de 373 para 335 e depois para 293 nm, indicando que o sistema de conjugação da quercetina foi reduzido e subseqüentemente destruído. Finalmente, ambos picos em 293 e 255 nm aumentam.

Estes eventos descritos pelos autores foram confirmados através da hidrólise alcalina da quercetina em pH 9,0, a 80 °C nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas.

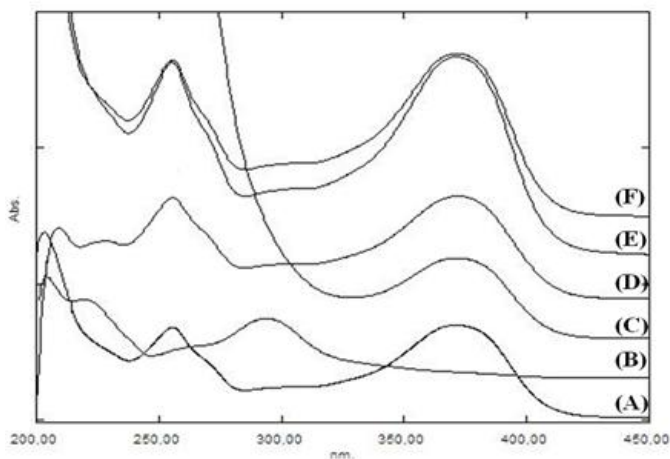


Figura 10. Espectros de varredura no UV/Vis das amostras: (A) Solução padrão de quercetina em metanol:água (40:60, v/v) 5,0 mg/mL; (B) Solução de quercetina induzida à hidrólise alcalina pH 9,0 após 6 horas a 80° C; (C) Solução de quercetina induzida à oxidação na presença de peróxido de hidrogênio após 6 horas; (D) Solução de quercetina induzida à degradação térmica a 100° C após 60 horas; (E) Solução obtida após extração da quercetina a partir de MTL_{Q1:25}; (F) Solução obtida após extração da quercetina a partir de MBL_{Q1:25}.

Através da figura 10 observa-se que a quercetina é fortemente induzida à degradação em meio alcalino (pH 9,0), implicando no

desaparecimento das bandas características da quercetina no espectro UV/Vis, com o surgimento de uma banda única em 292 nm. Quando induzida à oxidação na presença de peróxido de hidrogênio (figura 10C), a estrutura do sistema catecol parece não sofrer alteração, ao contrário dos anéis A e C, cuja banda característica não pode ser visualizada. Segundo Zhou e colaboradores (2007), a oxidação da porção catecol no anel B é uma reação reversível, enquanto a formação de pontes de hidrogênio intermoleculares entre o grupo hidroxila e o oxigênio no anel B ou C, referente à banda II, corresponde a oxidação irreversível do grupo hidroxila na posição 3 do anel C.

Os espectros das soluções de quercetina obtidas após extração do fármaco a partir das micropartículas lipídicas não apresentaram alterações nos máximos de absorção (Figura 10E e 10F), indicando que o método de preparo das micropartículas lipídicas não induziu à degradação da quercetina, e que esta se apresenta quimicamente estável, independentemente da técnica utilizada ou da composição das micropartículas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

3.3.1 Avaliação da morfologia das micropartículas lipídicas

As fotomicrografias obtidas por MEV a partir das micropartículas lipídicas preparadas com trimiristato de glicerila (MTL) exibem partículas esféricas, com tamanhos menores que 20 μm , superfície rugosa e tendência a formar aglomerados (Figura 11). A amostra MTL_{Q1:25} demonstra também a deposição de cristais de quercetina no exterior da partícula, indicando um excesso desta substância foi adicionado à formulação (Figura 11B). A presença de cristais de quercetina não foi observada quando a menor quantidade de quercetina foi empregada (Figura 11C).

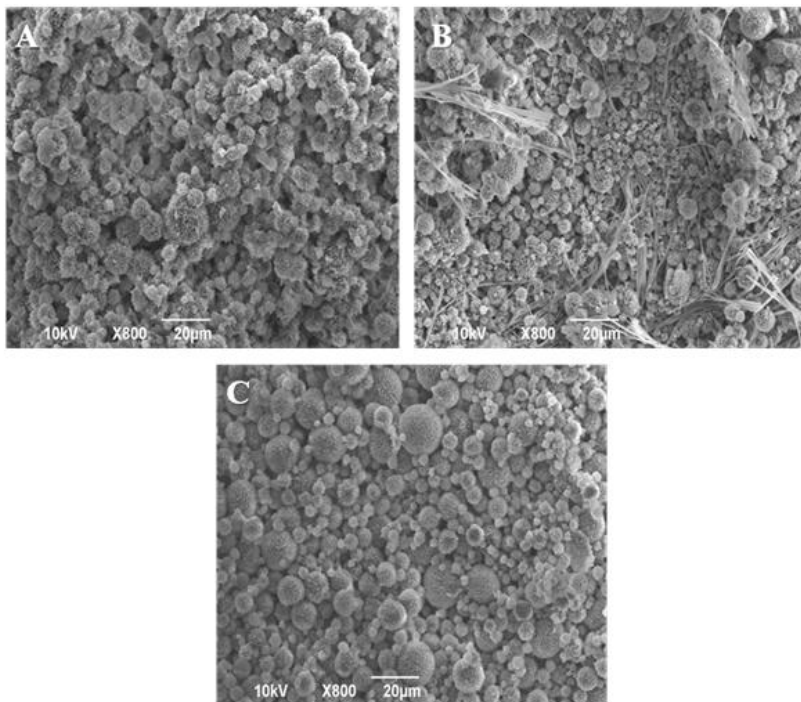


Figura 11. Micrografias de: (A) MTL; (B) MTL_{Q1:25}; e (C) MTL_{Q1:50}.

As fotomicrografias obtidas a partir das micropartículas lipídicas preparadas a partir do behenato de glicerila apresentam partículas de formato esférico a irregular, de cerca de 70 µm, e superfície bastante porosa e rugosa. A morfologia não pareceu ser afetada pela adição de lecitina de soja na formulação. Nas amostras MB_{Q1:25} e MBL_{Q1:25} (Figura 12B e 12E, respectivamente) fica evidente a presença de cristais de quercetina no exterior das micropartículas, porém em quantidade muito menor que na amostra MTL_{Q1:25} (figura 11B). Cristais de quercetina não foram visualizados nas amostras preparadas com a proporção de fármaco de 1:50 (Figura 12C e 12F). O alto diâmetro geométrico observado estar associado à sensibilidade as micropartículas ao feixe de luz do microscópio. As micropartículas menores tendem a serem facilmente corrompidas no processo de análise, restando somente as micropartículas maiores.

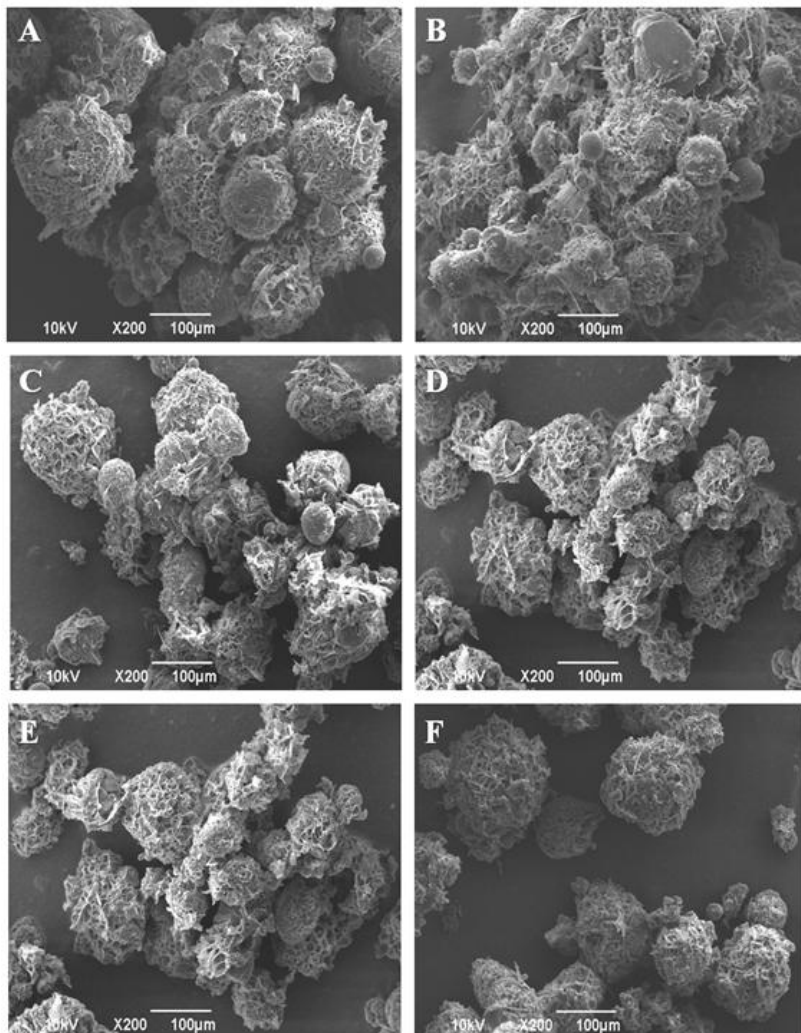


Figura 12. Micrografia de: (A) MB; (B) MB_{Q1:25}; (C) MB_{Q1:50}; (D) MBL; (E) MBL_{Q1:25}; (F) MBL_{Q1:50}.

Vários estudos relatam a baixa capacidade de micropartículas constituídas de ésteres de glicerila em encapsular fármacos, em especial quando lipídios puros, como a triestearina ou tripalmitina, são utilizados. Nesses casos, partículas apresentando uma ordem cristalina maior são geradas e, desde que os fármacos são incorporados entre as cadeias de

ácido graxo, um cristal altamente ordenado não pode acomodar grandes quantidades dos mesmos (WISSING; KAYSER. MÜLLER, 2004). Isso pode explicar a presença de uma grande quantidade de cristais de quercetina na amostra MTL_{Q1:25}, conforme observado por MEV, assim como a razão pela qual a adição de maior quantidade de quercetina conduziu à obtenção de uma elevada eficiência de encapsulação (ver Tabela 14). Por sua vez, a baixa eficiência de encapsulação da quercetina na amostra MTL_{Q1:50} pode estar associada à cristalinidade do lipídio, mas também à solubilização deste polifenol na solução aquosa de PEG 600 estearato 1% (m/V) e à sua eliminação durante a etapa de lavagem das partículas.

O behenato de glicerila (Compritol 888 ATO), por outro lado, é constituído por uma mistura de mono-, di e tri-ésteres de glicerídeos e, portanto, a alta organização da matriz lipídica não é esperada. Isso explica a menor quantidade de cristais de quercetina presente nas formulações, mesmo quando a maior quantidade de fármaco foi adicionada.

3.3.2 Determinação da densidade bruta e de compactação

Um dos fatores mais importantes para avaliação das propriedades de aerossolização dos pós é a densidade bruta e de compactação. Segundo Bosquillon e colaboradores (2001), a redução da densidade dos pós, sem qualquer alteração no diâmetro geométrico das partículas, tende a aumentar sua fração respirável deste, elevando a deposição *in vitro* dos pós. A tabela 17 mostra os valores de densidade bruta e de compactação das micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila e do behenato de glicerila, obtidos conforme descrito em 2.4.2.

Tabela 17. Densidade bruta e de compactação das micropartículas lipídicas.

Amostras	Densidade bruta $\pm \sigma$ (g/mL)	Densidade de compactação $\pm \sigma$ (g/mL)
MTL	0,2045 \pm 0,0026	0,2404 \pm 0,0019
MTL_{Q1:25}	0,2394 \pm 0,0010	0,2937 \pm 0,0033
MTL_{Q1:50}	0,1856 \pm 0,0027	0,2204 \pm 0,0026
MB	0,1885 \pm 0,0027	0,2268 \pm 0,0066
MB_{Q1:25}	0,1973 \pm 0,0055	0,2450 \pm 0,0017
MB_{Q1:50}	0,1913 \pm 0,0030	0,2356 \pm 0,0030
MBL	0,1740 \pm 0,0048	0,2175 \pm 0,0055
MBL_{Q1:25}	0,2145 \pm 0,0013	0,2715 \pm 0,0085
MBL_{Q1:50}	0,2232 \pm 0,0050	0,2653 \pm 0,0210

onde σ é o desvio padrão.

As micropartículas apresentam densidades brutas e de compactação em torno de 0,2 g/mL. Ungaro e colaboradores (2009) sugerem um melhoramento das propriedades de aerossolização de micropartículas polimérica preparadas com PLGA podem ser alcançadas com a redução da densidade ($< 0,4$ g/mL). Entretanto, poucos estudos enfatizam a influência da densidade para micropartículas lipídicas. Jaspert e colaboradores (2005) prepararam micropartículas lipídicas de behenato de glicerila com densidade próxima a 0,7 g/mL, resultado superior à densidade obtida neste experimento, porém sem afetar as características de aerossolização do pó.

3.3.3 Determinação da porosidade das micropartículas lipídicas

A porosimetria por intrusão de mercúrio tem sido extensivamente utilizada na caracterização de materiais. A técnica se baseia no fato de que o mercúrio se comporta como um fluido não-molhante em relação à maior parte das substâncias. Por consequência, não penetra espontaneamente nos poros de materiais a menos que se aplique uma pressão sobre ele. Assim, durante o ensaio é medida a pressão realizada sobre o mercúrio, que por sua vez pressiona a amostra, e o volume de mercúrio que penetra a amostra. Como via de regra, quanto menor é o tamanho dos poros, maior será a pressão necessária para que o mercúrio penetre no poro (WRIGHT et al., 2010).

Nas figuras 13 e 14 podem-se observar as curvas de intrusão de mercúrio por pressão e intrusão de mercúrio por diâmetro dos poros,

respectivamente. As características porosimétricas das micropartículas lipídicas encontram-se sumarizadas na Tabela 18.

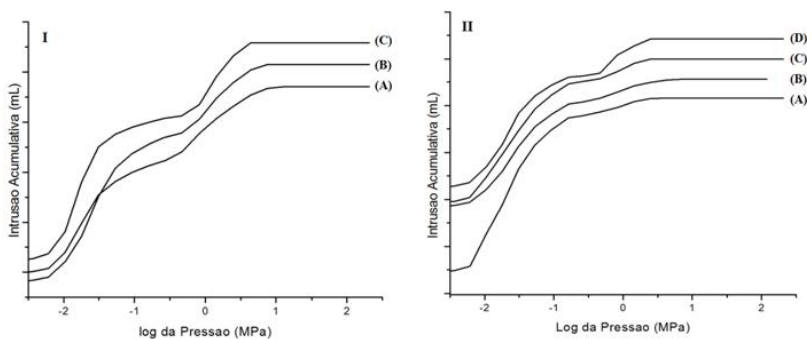


Figura 13. Curva de intrusão acumulativa de mercúrio pelo log da pressão das micropartículas lipídicas preparadas a partir do (I) trimiristato de glicerila e do (II) behenato de glicerila. (IA) MTL; (IB) MTL_{Q1:25}; (IC) MTL_{Q1:50}; (IIA) MB; (IIB) MB_{Q1:25}; (IIC) MBL; (IID) MBL_{Q1:25}.

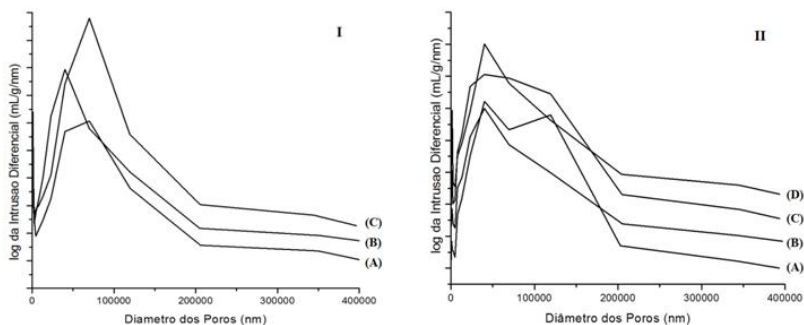


Figura 14. Curvas de intrusão porosimétrica obtidas a partir das micropartículas lipídicas preparadas com (I) trimiristato de glicerila e (II) behenato de glicerila: (IA) MTL; (IB) MTL_{Q1:25}; (IC) MTL_{Q1:50}; (IIA) MB; (IIB) MB_{Q1:25}; (IIC) MBL; (IID) MBL_{Q1:25}.

Tabela 18. Características porosimétricas das micropartículas lipídicas

Amostra	Diâmetro médio dos poros (nm)	ρ aparente esquelética (g/mL)	Porosidade (%)	Área total dos poros (m²/g)
MTL	1602,3	1,4039	83,83	9,220
MTL_{Q1:25}	1988,7	1,4801	85,94	8,309
MTL_{Q1:50}	2246,0	1,4688	84,86	6,797
MB	9487,0	0,8277	71,28	1,265
MB_{Q1:25}	4599,4	0,8387	68,83	2,290
MB_{Q1:50}	4365,7	0,8354	69,70	2,189
MBL	6762,9	0,8113	73,43	2,014
MBL_{Q1:25}	4883,9	1,1481	76,29	2,296
MBL_{Q1:50}	4177,5	0,8196	69,07	2,724

As micropartículas lipídicas apresentam alto grau de porosidade, de 71,28 a 85,94%. As micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila apresentam-se mais porosas que aquelas preparadas a partir do behenato de glicerila. Estas partículas ainda possuem menor diâmetro de poro e maior área total dos poros. Este fato é confirmado por microscopia eletrônica de varredura, item 3.3.1. No entanto, os espaços entre as partículas são intrudidos por mercúrio, sendo contabilizados como poros, fato que explica a presença de “poros” de diâmetro de cerca de 100 μm , como observado nas curvas de intrusão diferencial por diâmetro dos poros (Figura 14), sendo assim, o mercúrio pode intrudir os poros das micropartículas e o espaço entre as micropartículas.

3.3.4 Avaliação do tamanho médio e distribuição granulométrica das micropartículas lipídicas.

3.3.4.1 Tamanho e distribuição granulométrica das partículas (MMGD)

As figuras 15 e 16 apresentam os gráficos de distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila e behenato de glicerila, respectivamente, e na tabela 19 estão dispostos os valores de $d_{10\%}$, $d_{50\%}$ e $d_{90\%}$ médios das amostras, além dos valores de diâmetro geométrico médio ($D_{4,3}$) e span.

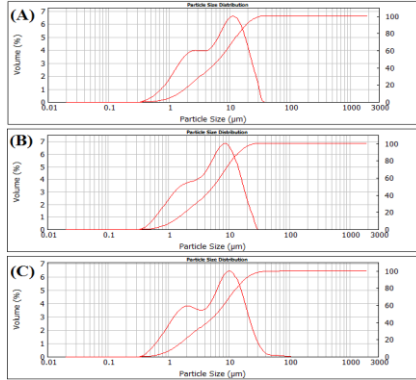


Figura 15. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila: (A) MTL; (B) MTL_{Q1:25}; e (C) MT_{Q1:50}.

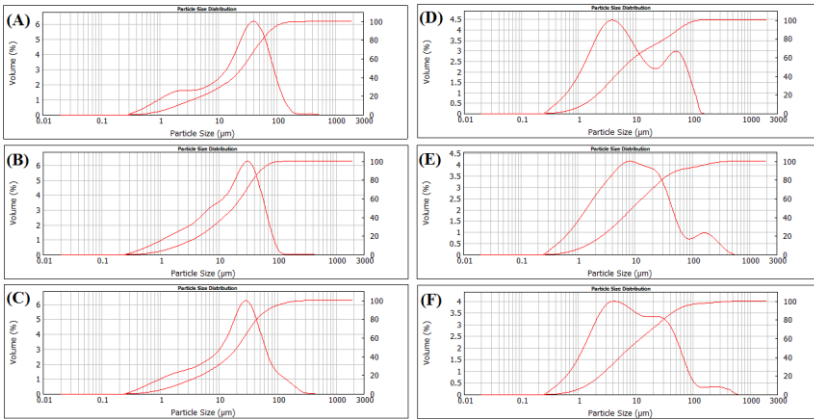


Figura 16. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula das micropartículas lipídicas preparadas a partir do behenato de glicerila: (A) MB; (B) MB_{Q1:25}; e (C) MB_{Q1:50}, (D) MBL; (E) MBL_{Q1:25}; e (F) MBL_{Q1:50}.

Tabela 19. Diâmetros geométricos médios das micropartículas lipídicas.

Amostra	$d_{10\%} \pm \sigma$	$d_{50\%} \pm \sigma$	$d_{90\%} \pm \sigma$	$d_{4,3} \pm \sigma$	Span $\pm \sigma$
MTL	1,41 \pm 0,52	6,84 \pm 0,92	18,99 \pm 0,65	6,67 \pm 2,56	2,56 \pm 1,04
MTL_{Q1:25}	1,22 \pm 0,37	6,33 \pm 1,65	18,36 \pm 1,58	8,43 \pm 1,84	2,71 \pm 0,99
MTL_{Q1:50}	1,21 \pm 0,40	5,59 \pm 1,31	14,91 \pm 3,48	6,96 \pm 3,80	2,45 \pm 1,75
MB	2,04 \pm 0,40	25,62 \pm 1,30	77,38 \pm 2,66	34,30 \pm 1,84	2,94 \pm 0,90
MB_{Q1:25}	2,12 \pm 0,78	17,53 \pm 3,45	51,90 \pm 4,96	23,11 \pm 2,45	2,84 \pm 0,85
MB_{Q1:50}	2,03 \pm 1,03	20,72 \pm 3,22	66,22 \pm 3,69	30,61 \pm 1,25	3,20 \pm 1,83
MBL	1,27 \pm 0,08	6,23 \pm 1,99	56,61 \pm 5,41	18,16 \pm 2,52	8,88 \pm 1,61
MBL_{Q1:25}	1,44 \pm 0,51	9,04 \pm 2,03	56,10 \pm 1,35	26,71 \pm 2,95	6,05 \pm 1,73
MBL_{Q1:50}	1,42 \pm 0,67	7,87 \pm 3,28	50,95 \pm 1,62	22,93 \pm 2,02	6,29 \pm 2,76

onde σ é o desvio padrão.

Como pode ser observado na tabela 19, as micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila (MTL) apresentaram valores de $d_{50\%}$ (diâmetro de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada) variando entre 5,59 e 6,84 μm e diâmetro médio em volume (diâmetro correspondente a uma esfera de igual volume), variando entre 6,67 e 8,43 μm . As micropartículas lipídicas preparadas com behenato de glicerila sem lecitina apresentaram tamanhos de partículas maiores, como demonstrado pelos valores de $d_{50\%}$ e $d_{4,3}$. Esses valores foram reduzidos pela adição da lecitina, sugerindo que este surfactante lipofílico contribui para a formação de uma emulsão mais fina. Entretanto, nesse caso os valores Span foram elevados indicando que sistemas mais polidispersos foram obtidos. A diferença de tamanhos entre as micropartículas lipídicas pode estar relacionada à presença de lecitina de soja, que atua como tensoativo lipofílico, estabilizando a emulsão e induzindo à redução do diâmetro das micropartículas. No entanto, o uso da técnica de difusão do solvente a quente parece resultar na formação de micropartículas de distribuição granulométrica mais uniforme (figura 15), provavelmente por proporcionar uma distribuição mais homogênea da lecitina de soja no trimiristato de glicerila. Por sua vez, o uso da técnica de homogeneização a quente, não parece proporcionar uma distribuição homogênea da lecitina de soja no behenato de glicerila, uma vez que pode-se observar uma distribuição granulométrica bimodal (figura 16D, 16E e 16F), formando partículas de diâmetros menores, estabilizadas pelo tensoativo lipofílico lecitina de soja, e partículas de diâmetros superiores, acarretando em um aumento dos valores de span que variaram de 6,05 a 8,88 (tabela 19).

3.3.4.2 Determinação do diâmetro aerodinâmico médio (MMAD)

Os valores de diâmetro aerodinâmico médio e diâmetro aerodinâmico correspondente a 50% da distribuição acumulada (MMAD_{50%}), calculados conforme equação descrita no item 2.4.4.2, são apresentados na tabela 20. Como pode ser observado os valores de MMAD variaram de 3,18 a 16,72 μm , enquanto os de MMAD_{50%} variam de 2,64 a 12,49 μm .

Tabela 20. Diâmetro aerodinâmico médio das micropartículas lipídicas e diâmetro aerodinâmico correspondente a 50% da distribuição acumulada

Amostra	MMAD (μm)	MMAD_{50%} (μm)
MTL	3,18 \pm 1,22	3,26 \pm 0,44
MTL_{Q1:25}	3,84 \pm 0,84	2,89 \pm 0,75
MTL_{Q1:50}	3,28 \pm 1,79	2,64 \pm 0,62
MB	16,72 \pm 0,90	12,49 \pm 0,63
MB_{Q1:25}	11,82 \pm 1,25	8,96 \pm 1,76
MB_{Q1:50}	15,40 \pm 0,63	10,52 \pm 1,62
MBL	8,43 \pm 1,17	2,89 \pm 0,92
MBL_{Q1:25}	13,93 \pm 1,54	4,72 \pm 1,06
MBL_{Q1:50}	11,54 \pm 1,02	3,96 \pm 1,65

Para deposição adequada nas porções mais profundas do pulmão é necessário que as micropartículas apresentem diâmetro aerodinâmico médio entre 1 e 5 μm . As micropartículas preparadas com trimiristato de glicerila demonstram um menor diâmetro aerodinâmico médio, cerca de 3 μm , sugerindo que estas micropartículas estejam aptas para administração pulmonar. As micropartículas preparadas com behenato de glicerila, independente da adição de lecitina de soja, demonstram um maior diâmetro aerodinâmico, entre 8,43 e 16,72 μm . Este aumento era esperado, uma vez que estas micropartículas demonstraram maior diâmetro geométrico e menor grau de porosidade. Sendo assim, as micropartículas preparadas com behenato de glicerila tenderiam a se depositar nas porções mais superiores do trato respiratório.

Ao analisar o diâmetro aerodinâmico correspondente a 50% da distribuição acumulada pode-se observar que 50% das micropartículas preparadas com behenato de glicerila na presença de lecitina de soja apresentam diâmetro aerodinâmico variável de 2,89 a 4,72 μm , possibilitando que esta fração respirável, partículas menores de 5 μm que penetram nas regiões mais profundas dos pulmões, alcance o local de ação, enquanto as demais partículas provavelmente se depositarão em regiões superiores. As micropartículas preparadas a partir do behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja apresentam MMAD_{50%} de 8,96 a 12,49 μm , indicando que esta fração de 50% das partículas se depositariam em regiões superiores do trato respiratório.

A fim de obter partículas com diâmetro aerodinâmico adequado e baixa captura dos macrófagos, Yang e colaboradores (2009), prepararam micropartículas poliméricas porosas. Desta forma, o aumento da

porosidade e a conseqüente redução da densidade das micropartículas levaram à redução do diâmetro aerodinâmico. Por outro lado, os poros aumentaram o diâmetro geométrico das partículas, fator que reduz a probabilidade de captura dos carreadores pelos macrófagos.

Kwon e colaboradores (2007) também prepararam micropartículas poliméricas para administração pulmonar. As micropartículas possuíam diâmetros geométricos médio de cerca de 22 μm , porém, em função do alto grau de porosidade das micropartículas, apresentaram diâmetros aerodinâmicos médio de cerca de 3 μm .

Sendo assim, as amostras $\text{MTL}_{\text{Q1:25}}$ e $\text{MTL}_{\text{Q1:50}}$ apresentam diâmetros aerodinâmicos médios adequados para administração pulmonar. As formulações $\text{MBL}_{\text{Q1:25}}$ e $\text{MBL}_{\text{Q1:50}}$, por sua vez, apresentam uma porção respirável referente a 50% das micropartículas, sendo capaz de se depositar adequadamente no trato respiratório. $\text{MB}_{\text{Q1:25}}$ e $\text{MB}_{\text{Q1:50}}$ poderiam se depositar em regiões superiores, mas ainda possibilitando a liberação da quercetina no sítio de ação.

3.3.5 Avaliação das propriedades de fluxo das micropartículas

A propriedade de fluxo foi avaliada pelo índice de Carr como descrito no item 2.4.5. A tabela 21 apresenta os valores do índice de Carr e a classificação da fluidez.

Tabela 21. Índice de Carr e classificação da fluidez das micropartículas lipídicas

Amostra	Índice de Carr (%)	Fluidez
MTL	14,93 \pm 0,22	Bom
MTL_{Q1:25}	18,49 \pm 0,22	Favorável a tolerável
MT_{Q1:50}	15,79 \pm 0,30	Bom
MB	16,89 \pm 0,55	Bom
MB_{Q1:25}	19,47 \pm 0,56	Favorável a tolerável
MB_{Q1:50}	18,80 \pm 0,38	Favorável a tolerável
MBL	20,00 \pm 0,75	Favorável a tolerável
MBL_{Q1:25}	20,99 \pm 0,67	Favorável a tolerável
MBL_{Q1:50}	15,87 \pm 1,30	Bom

Os valores do índice de Carr apresentaram pequena variação, entre 14,93 e 20,99%, indicando que os pós apresentam fluidez variável de boa à favorável/tolerável. Indicando que provavelmente seria

necessária a adição de excipientes para melhoria da fluidez do pós para administração das micropartículas lipídicas por via pulmonar.

3.3.6 Difração de Raios-X

As figuras 17, 18 e 19 mostram os perfis de difração de raios-X das micropartículas lipídicas e das matérias-primas utilizadas na preparação destas. As tabelas 22 e 23 mostram os valores das distâncias interplanares, segundo a Lei de Bragg, e formas polimórficas das matérias-primas e das micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila e do behenato de glicerila, respectivamente.

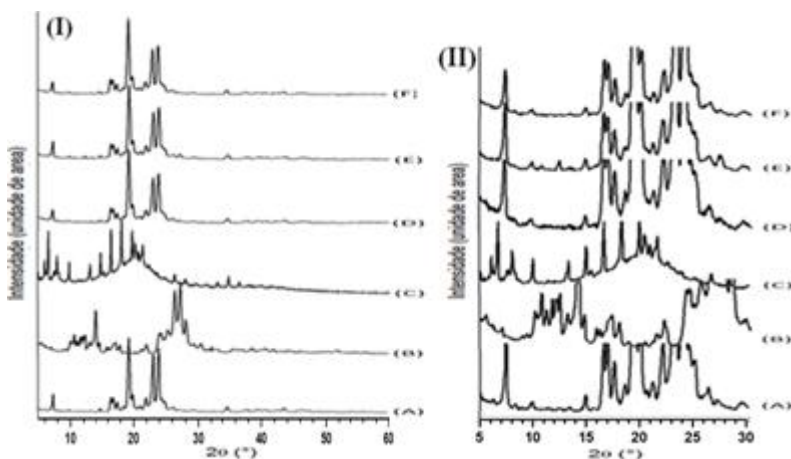


Figura 17. Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Trimiristato de glicerila; (B) Quercetina; (C) Lecitina de soja; (D) MTL; (E) MTL_{Q1:25}; e (F) MTL_{Q1:50}.

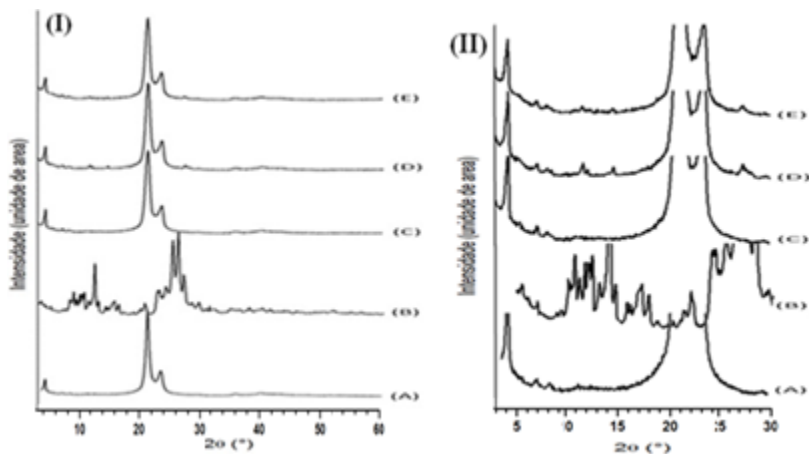


Figura 18. Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MB; (D) MB_{Q1:25}; e (E) MB_{Q1:50}.

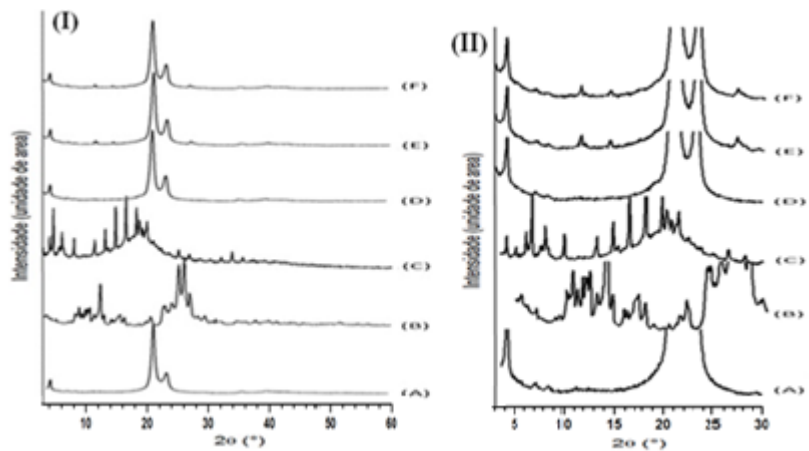


Figura 19. Difração de raios-X das amostras; (I) visualização do padrão de difração completo; (II) padrão de difração ampliado; sendo em (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) Lecitina de soja; (D) MBL; (E) MBL_{Q1:25}; e (F) MBL_{Q1:50}.

Tabela 22. Distâncias interplanares, segundo a Lei de Bragg, e forma polimórfica dos cristais do trimiristato de glicerila e das micropartículas lipídicas preparadas a partir deste triacilglicerol.

Amostra	2θ ($^{\circ}$)	d (nm)	2θ ($^{\circ}$)	d (nm)	2θ ($^{\circ}$)	d (nm)	F. P.
Trimiristato de glicerila	19,32	0,46	23,17	0,38	24,00	0,37	β
MTL	19,26	0,46	23,10	0,38	23,94	0,37	β
MTL_{Q1:25}	19,29	0,46	23,10	0,38	23,94	0,37	β
MTL_{Q1:50}	19,29	0,46	23,07	0,38	24,00	0,37	β

onde F. P. é forma polimórfica.

Tabela 23. Distâncias interplanares, segundo a Lei de Bragg, e forma polimórfica dos cristais do behenato de glicerila e das micropartículas lipídicas preparadas a partir desta mistura de acilgliceróis.

Amostra	2θ ($^{\circ}$)	d (nm)	2θ ($^{\circ}$)	d (nm)	F. P.
Behenato de glicerila	21,16	0,42	23,34	0,38	β'
MB	21,20	0,42	23,53	0,38	β'
MB_{Q1:25}	21,20	0,42	23,40	0,38	β'
MB_{Q1:50}	21,16	0,42	23,40	0,38	β'
MBL	21,16	0,42	23,40	0,38	β'
MBL_{Q1:25}	21,16	0,42	23,34	0,38	β'
MBL_{Q1:50}	21,16	0,42	23,40	0,38	β'

onde F. P. é forma polimórfica.

Através das figuras 17, 18 e 19 fica evidente que as micropartículas lipídicas apresentam comportamento cristalino semelhante ao das respectivas matérias-primas. Nas amostras MTL_{Q1:25}, MB_{Q1:25} e MBL_{Q1:25} pode-se observar a presença de picos característicos da quercetina, indicando a presença deste polifenol na forma cristalina nas micropartículas.

Na amostra MTL_{Q1:50} (figura 17IIF), não é possível afirmar que a quercetina se apresenta no estado cristalino, uma vez que os picos mais intensos e característicos da quercetina se sobrepõe àqueles do trimiristato de glicerila, e devido ao baixo teor de quercetina nesta amostra, a intensidade dos eventos podem ocorrer abaixo do limite de detecção do equipamento. Existem dois pequenos eventos em 12,40° e em 27,21° que diferenciam a amostra MTL_{Q1:25} (figura 17IIE) das

demais micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila, cuja intensidade é condizente aos 3,36% (m/m) de quercetina nesta micropartícula. Somado à sobreposição dos picos característicos do lipídio e do polifenol, existe a possibilidade de que nem toda a quercetina presente nas micropartículas se encontre na forma cristalina, reduzindo ainda mais a intensidade da difração nos ângulos característicos.

Quanto às micropartículas preparadas a partir do behenato de glicerila, as amostras MB_{Q1:25}, MB_{Q1:50}, MBL_{Q1:25} e MBL_{Q1:50}, apresentam picos nos ângulos (2θ) em 11,67 – 11,71°, 14,54 – 14,64°, e 27,24 – 27,31°, indicando a presença deste flavonoide na forma cristalina (figuras 18IID, 18IIE, 19IIE, e 19IIF respectivamente).

A quercetina, matéria-prima, apresenta um estado cristalino diferente daqueles descritos na literatura, na tabela 24 é possível visualizar os principais picos encontrados no padrão de difração de raios-X experimental e de cinco padrões encontrados na literatura. De acordo com esta tabela, e os dados do espectro de difração de raios-X é possível presumir que a amostra de quercetina utilizada pode apresentar uma mistura de formas cristalinas nas amostras QPA ou QPGa com a amostras QPGb, conforme descrito e ilustrado por Borghetti e colaboradores (2006).

Tabela 24. Posição (2θ) dos principais picos de difração de raios-X da quercetina apresentada neste estudo e de cinco amostras de quercetina encontradas na literatura.

Experimental (°)	Quercetina (°) ^a	QPA (°) ^b	QPGa (°) ^b	QPGb (°) ^b	QPGc (°) ^b
14,07	11,64	10,75	10,73	13,51	4,54
26,51	17,84	12,43	12,41	14,11	13,07
27,38	21,32	27,38	27,38	26,52	26,04
-	27,18	-	-	-	-

^a NATARAJAN et al., 2010; ^b BORGHETTI et al., 2006.

Para avaliação da forma polimórfica dos lipídios foi utilizada a Lei de Bragg para determinar a distância interplanar. Uma vez que o polimorfismo é caracterizado pela diferença de empacotamento dos cristais, este implica em variadas formas e diâmetros das células unitárias. A forma α é caracterizada por uma célula hexagonal (H) com distância interplanar de 0,42 nm. A forma β' , por sua vez, apresenta célula ortorrômbica perpendicular ($O\perp$) com distâncias de 0,42 a 0,43

nm e 0,37 a 0,40 nm. Por fim, a forma β possui célula triclinica paralela (Tl), com distância de 0,46 nm (HAGEMANN, 1988 *apud* BRESSON; MARSSI; KHELIFA, 2005). Logo, observa-se que não existe variação polimórfica dos lipídios durante a preparação das micropartículas lipídicas, e que os lipídios trimiristato de glicerila e behenato de glicerila se encontram nas suas formas polimórficas mais estáveis, β e β' , respectivamente.

A cristalinidade dos lipídios trimiristato de glicerila e behenato de glicerila, tanto como matriz das micropartículas quanto como matéria-prima foi verificada por difração de raios-X através da presença de picos característicos de materiais cristalinos em todas as formulações. Através da Lei de Bragg foi determinado que a matriz lipídica das micropartículas preparadas com trimiristato de glicerila, assim como a respectiva matéria prima, se encontram na forma polimórfica β , enquanto a matriz lipídica das micropartículas preparadas com behenato de glicerila, independente da adição de lecitina de soja, bem como a matéria-prima, se encontram na forma polimórfica β' , evidenciando que os lipídios se encontram na forma cristalina mais estável mesmo quando constituem a matriz lipídica das micropartículas.

3.3.7 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para verificar a presença ou não de interação entre os lipídios utilizados e a quercetina. Esta técnica apresenta como principal vantagem a facilidade de preparo das amostras, a sensibilidade mínima à interferência da água, o detalhamento espectral e a sensibilidade conformacional, além de detectar vibrações de baixa frequência (MANTANUS et al., 2011). As figuras 20, 21 e 22 apresentam os espectros das micropartículas lipídicas obtidos por espectroscopia Raman.

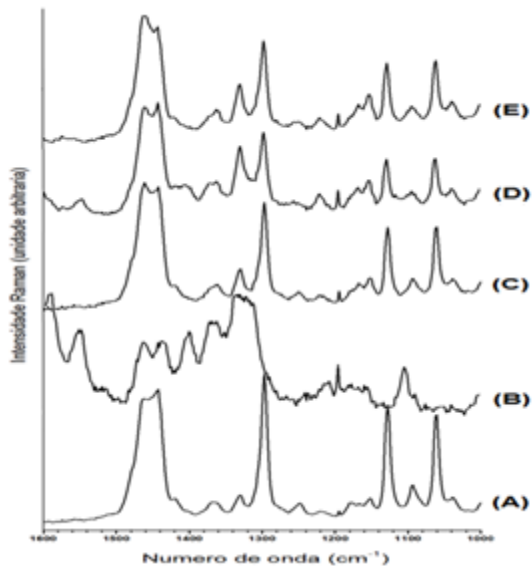


Figura 20. Espectro Raman das amostras; (A) Trimiristato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MTL; (D) MTL_{Q1:25}; (E) MTL_{Q1:50}.

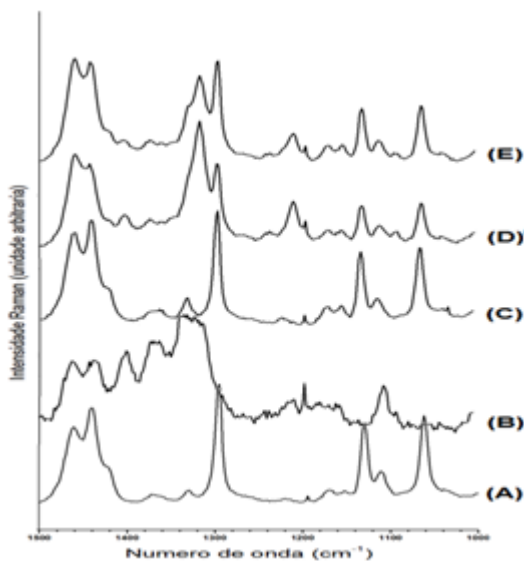


Figura 21. Espectro Raman das amostras; (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MB; (D) MB_{Q1:25}; (E) MB_{Q1:50}.

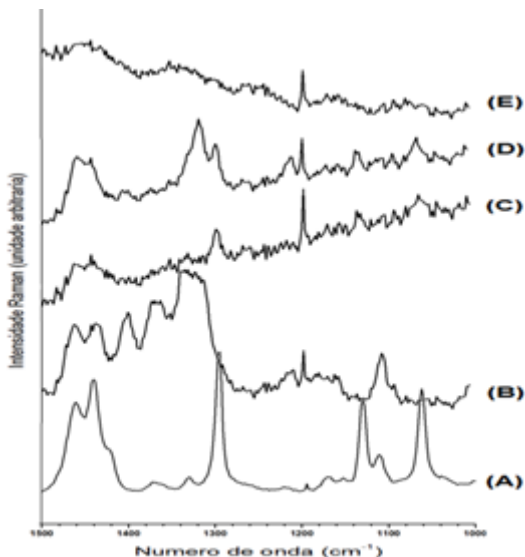


Figura 22. Espectro Raman do (A) Behenato de glicerila; (B) Quercetina; (C) MBL; (D) MBL_{Q1:25}; (E) MBL_{Q1:50}.

Tabela 25. Número de onda (cm^{-1}) das matérias-primas obtidos experimentalmente e descritos na literatura

Trimiristato de glicerila		Behenato de glicerila		Quercetina	
Número de onda (cm^{-1})		Número de onda (cm^{-1})		Número de onda (cm^{-1})	
Amostra	Lit. ^a	Amostra	Lit. ^b	Amostra	Lit. ^c
1465	1465	1461	1465	-	1664
-	1452	1440	1440	1648	-
1442	1442	1424	1420	1615	1609
1439	1439	1371	-	1610	1604
1420	1418	1329	-	1591	1596
1368	1369	1295	1295	1588	-
1329	1337	1130	1130	1547	1548
1296	1296	1111	-	1463	1463
1248	1252	1062	1060	1437	1440
1128	1128			-	1410
1093	1094			1400	1398
1060	1061			1371	1371
1039	-			-	1357

	1333	1328
	1315	1315
	-	1268
	1206	1216
	1176	1175
	1012	1013

onde lit. são os dados obtidos através da literatura.

^aBresson; Marssi; Khelifa (2005); ^bJores et al. (2005); ^cCornard et al., 1997.

Através da análise dos espectros Raman nas figuras 20, 21 e 22, e da tabela 25 pode-se concluir que as matérias-primas utilizadas apresentam mesmo perfil daqueles descritos na literatura, a exceção da quercetina, que apresenta ligeira diferença, principalmente quanto à alteração de número de onda dos eventos. Isto pode estar relacionado a uma provável mistura de formas polimórficas deste flavonoide. No entanto, os estudos que descrevem os espectros Raman da quercetina não citam ou discutem a forma polimórfica deste polifenol, não sendo possível estabelecer uma relação direta entre os picos e a forma polimórfica da quercetina.

Os espectros Raman das micropartículas lipídicas preparadas tanto com trimiristato de glicerila, quanto por behenato de glicerila, não diferiram muito dos espectros dos respectivos lipídios, exceto quanto à intensidade de alguns deslocamentos Raman. No entanto, é visível que existe alteração do espectro Raman das micropartículas contendo quercetina, e que a intensidade destas alterações é dependente da concentração do polifenol.

Nas micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila observa-se o surgimento dos deslocamentos Raman em 1591 e 1588 cm^{-1} , característicos da quercetina, na amostra MTL_{Q1:25}. Este evento não é perceptível na amostra MTL_{Q1:50}, provavelmente em função da intensidade Raman neste número de onda estar abaixo do limite de detecção do equipamento, uma vez que esta amostra apresenta menor teor de quercetina. Não se pode afirmar que houve interação entre a quercetina e o lipídio uma vez que os eventos característicos da quercetina coincidem com aqueles do trimiristato de glicerila, tornando difícil a visualização de deslocamentos dos números de onda característicos de cada matéria-prima.

As micropartículas preparadas a partir do trimiristato de glicerila conservam as características do espectro da matéria-prima, indicando manutenção das propriedades físicas e químicas do lipídio original.

Nas micropartículas preparadas com behenato de glicerila observa-se o surgimento de um evento em 1400 cm^{-1} devido à presença de quercetina na amostra MB_{Q1:25}. Assim como observado para as amostras preparadas com trimiristato de glicerila, não é possível afirmar a existência de interação entre a quercetina e o behenato de glicerila, porém é evidente a presença deste polifenol nas micropartículas. Além disso, pode-se observar a conservação do padrão de deslocamento Raman do behenato de glicerila nas micropartículas preparadas a partir deste lipídio.

Não foi possível analisar com precisão as amostras preparadas com behenato de glicerila contendo lecitina de soja, uma vez que a intensidade dos eventos sofre grande influência da fluorescência da lecitina de soja, provavelmente devido a presença de átomos de fósforo. A fluorescência interfere aumentando fortemente a intensidade da linha de base Raman, impossibilitando a comparação destes espectros com aqueles das matérias-primas de quercetina e behenato de glicerila. Claramente parece ter havido alguma espécie de interação entre o behenato de glicerila e a lecitina de soja, pois esta interferência não foi observada nas amostras preparadas a partir do trimiristato de glicerila (figura 22), que também contem lecitina de soja.

3.3.8 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os lipídios utilizados no preparo das micropartículas, bem como a quercetina, apresentam variações nas formas cristalinas. Em especial, as propriedades cristalinas dos lipídios empregados na preparação de micropartículas têm mostrado afetar as características de incorporação e liberação de fármacos (WISSING; KAYSER. MÜLLER, 2004). Assim, a análise por DSC foi realizada com o objetivo de caracterizar esses polimorfos e as possíveis modificações durante a etapa de preparação das micropartículas. A figura 23 e tabela 26 apresentam, respectivamente, as curvas de DSC e os parâmetros termoanalíticos obtidos após análise de DSC dos lipídios e da quercetina empregados como matérias-primas.

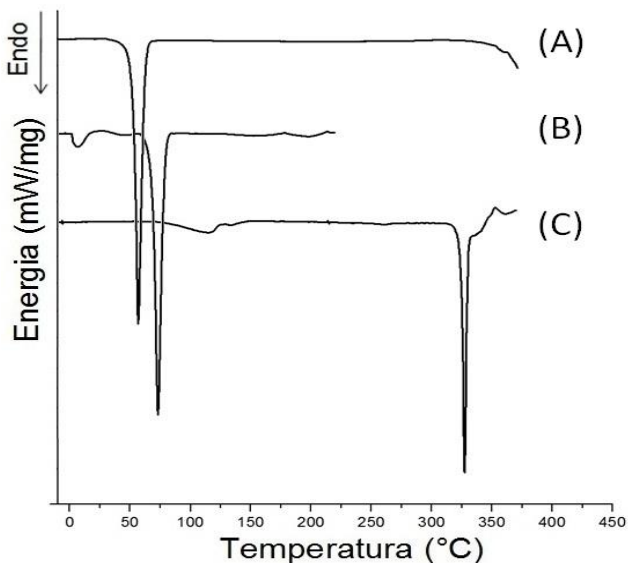


Figura 23. Curvas de DSC do (A) Trimiristato de glicerila; (B) Behenato de glicerila; (C) Quercetina dihidratada.

Zhang e colaboradores (2011) demonstram que a quercetina apresenta dois eventos endotérmicos, 127,8 e 327,5 °C, e um evento exotérmico a 357,1 °C. Na figura 23C é possível identificar a presença destes eventos, sendo o primeiro característico da perda de água de cristalização, e o segundo evento, característico da fusão deste polifenol.

O trimiristato de glicerila cristaliza em quatro diferentes polimorfos γ , α , β' e β e sua formação depende das condições de preparação, incluindo velocidade de agitação e de resfriamento (HARTEL, 2001). A forma α possui a tendência em se transformar rapidamente na forma β , que apresenta um empacotamento mais denso. Das quatro formas, a forma β é a mais estável, assim, a transição α a β , via β' é a rota seguida pelos triglicerídeos para alcançar um ótimo empacotamento das moléculas. Segundo Bresson, Marssi e Khelifa (2005) as formas polimórficas α , β' e β do trimiristato de glicerila apresentam temperaturas de fusão de 32, 45 e 57 °C, respectivamente. Logo, pode-se sugerir que o trimiristato de glicerila (Figura 23A) apresenta forma cristalina β mais estável.

O behenato de glicerila (Figura 23B), por sua vez, é uma mistura do mono-, di- e tribehenato. Este lipídio se cristaliza, também, em quatro formas polimórficas α , β' , β_i , e β . Porém, para misturas de

glicerídeos, a forma polimórfica mais estável é a β' , decorrente da presença de dibehenato, induzindo a uma maior imperfeição no empacotamento dos cristais (BRUBACH et al., 2007; LONG; ZHANG; QIAN, 2006). Freitas e Müller (1999) relatam que este lipídio, como matéria-prima, apresenta temperatura de fusão de 72,2 °C, característico da forma β' , a mais estável para o behenato de glicerila.

Nas figuras 24, 25 e 26 pode-se observar as curvas termoanalíticas das micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila e do behenato de glicerila na ausência e presença de lecitina, respectivamente. Na tabela 24 encontram-se sumarizados os eventos térmicos obtidos a partir das respectivas curvas de DSC.

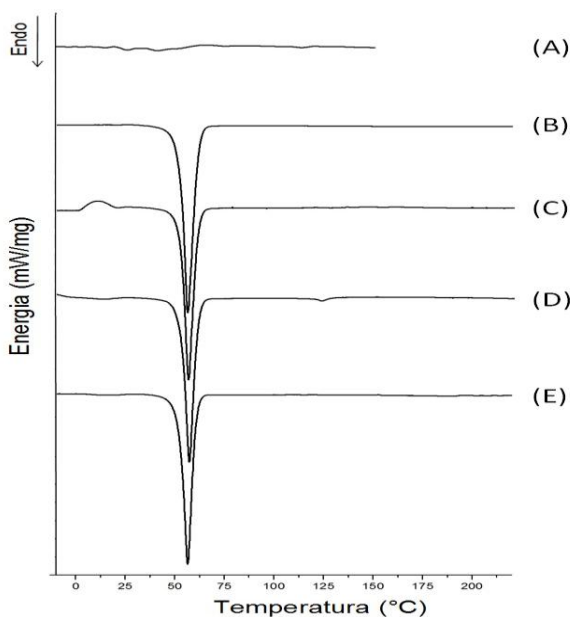


Figura 24. Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de trimiristato de glicerila: (A) Lecitina de soja; (B) Trimiristato de glicerila; (C) MTL; (D) MTL_{Q1:25}; (E) MTL_{Q1:50}.

Ao analisar a figura 24 em conjunto com a tabela 26 fica evidente que não houve deslocamento do evento de fusão do trimiristato de glicerila (56 °C), indicando a manutenção do polimorfo β do lipídio mesmo após a formação das micropartículas, corroborando com os resultados observados por difração de raios-X (item 3.3.6). Pode-se observar, ainda, que não houve redução da cristalinidade do lipídio,

quando comparado com a matéria-prima, fator que pode ter contribuído para a baixa incorporação de quercetina nestas micropartículas. Igualmente, quando as micropartículas de behenato de glicerila foram analisadas (figuras 25 e 26), não foram observadas alterações significativas nos eventos endotérmicos referentes à fusão do lipídio, indicando a inexistência de alteração das suas propriedades cristalinas durante a etapa de preparação das micropartículas.

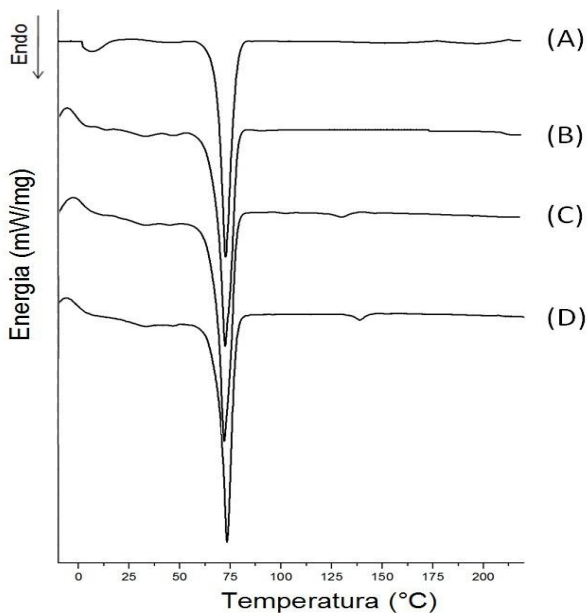


Figura 25. Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja: (A) Behenato de glicerila; (B) MB; (C) MB_{Q1:25}; (D) MB_{Q1:50}.

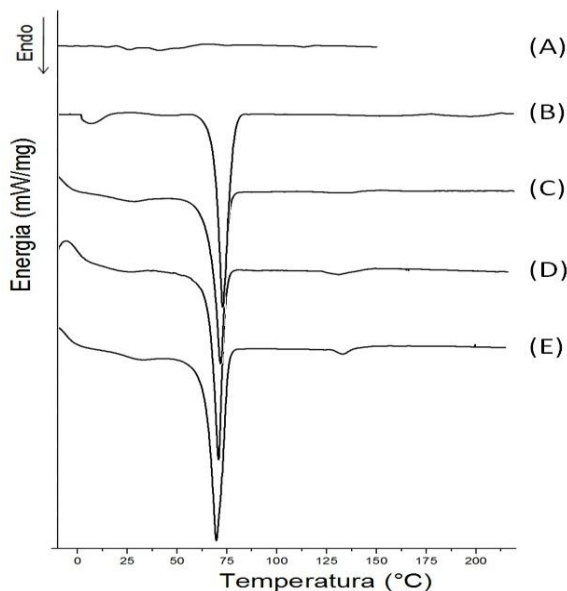


Figura 26. Curvas de DSC obtidas após análise das micropartículas de behenato de glicerila na presença de lecitina de soja: (A) Lecitina de soja; (B) Behenato de glicerila; (C) MBL; (D) MBL_{Q1:25}; (E) MBL_{Q1:50}.

Tabela 26. Parâmetros termoanalíticos obtidos a partir das curvas de DSC das matérias-primas e das micropartículas lipídicas.

Amostra	T_f (°C) [*]	ΔH (J/g) ^{**}	CR (%) ^{***}
Quercetina diidratada	327,16	-145,06	-
Trimiristato de glicerila	56,57	-209,20	100,00
MTL	56,59	-197,04	94,19
MTL_{Q1:25}	56,82	-206,15	98,54
MTL_{Q1:50}	56,39	-188,04	89,88
Behenato de glicerila	73,23	-121,89	100,00
MB	72,89	-131,40	107,80
MB_{Q1:25}	72,70	-119,73	98,23
MB_{Q1:50}	73,31	-130,17	106,79
MBL	72,07	-136,40	111,90
MBL_{Q1:25}	71,97	-128,44	105,37
MBL_{Q1:50}	71,34	-135,09	110,83

onde T_f^* é a temperatura de fusão; ΔH (J/g)^{**} é variação da entalpia no evento de fusão; CR^{***} é a cristalinidade relativa do lipídio.

A presença da quercetina no estado cristalino não pode ser avaliada uma vez que em torno de 300 °C existe uma alteração na linha de base de caráter exotérmico, possivelmente em função da degradação dos componentes das micropartículas, impossibilitando a detecção do evento de fusão da quercetina na forma cristalina. Este evento pode estar associado ao efeito fumaça decorrente da degradação do grupo glicerol presente nos acilgliceróis.

3.4 ENSAIO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA NAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS

3.4.1 Seleção do meio de dissolução

3.4.1.1 Avaliação da estabilidade da quercetina nos diferentes meios de dissolução

A realização de ensaios de dissolução requer a prévia avaliação da estabilidade e da solubilidade no meio de dissolução para garantir que o método seja confiável e possa ser empregado para avaliar a velocidade com que o fármaco é liberado no meio. A quercetina é extensamente degradada em pH neutro e alcalino em um processo dependente de oxigênio. Segundo Zenkevich e colaboradores (2007) ocorre ionização das hidroxilas do anel C, induzindo a formação de peróxidos intermediários, seguindo para a formação de posteriores produtos de degradação. A figura 27 exhibe os espectros da quercetina em diferentes meios de dissolução antes e após 24 horas de agitação ao abrigo da luz, onde a figura 27I apresenta os espectros no UV da quercetina em tampão fosfato pH 7,4. Neste pode-se observar o desaparecimento da banda característica do grupo catecol do anel C, provavelmente devido alteração estrutural que ocorreu nesta porção da molécula. Kitson (2004) evidenciou que a velocidade de degradação da quercetina é reduzida na presença de albumina sérica bovina (BSA) e pela adição de ácido ascórbico. O BSA tende a se ligar às hidroxilas ionizadas da quercetina, impedindo a formação dos peróxidos, mantendo as características do flavonoide. O ácido ascórbico é um agente antioxidante, atuando diretamente no combate da oxidação do polifenol. Assim, na tentativa de realizar estudos de dissolução da quercetina em

tampão fosfato pH 7,4, diversos meios contendo BSA e antioxidantes em diferentes concentrações foram testados, afim de aprimorar a propriedade do BSA em impedir a degradação por oxidação da quercetina. A solubilidade da quercetina em meio aquoso é extremamente baixa, para que quantidades detectáveis de quercetina pudessem ser analisadas foi adicionado PEG 400 com objetivo de aumentar a solubilidade desse composto em meio aquoso.

Observa-se que o BSA individualmente não foi capaz de reduzir a oxidação da quercetina no meio de dissolução (Figura 27III), assim com a adição de ácido ascórbico e o metabissulfito de sódio 0,5% (m/m) junto ao BSA (Figuras 27IV, 27V, 27VI). A adição de metabissulfito de sódio 1,0% (m/m) junto ao BSA proporciona maior estabilidade à quercetina (Figura 27VII), sendo que esta não é alterada pelo aumento da concentração de BSA (Figura 27VIII e 27IX). Nestas soluções pode-se observar maior integridade da banda referente ao grupo catecol.

Sendo assim, esses estudos indicaram que o meio de dissolução PEG 400:tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (2:8,V/V) contendo BSA 25 μ M e metabissulfito de sódio 1% mostrou ser promissor para o estudo de liberação da quercetina, uma vez que não foram observadas alterações nos espectros de varredura após 24 horas (Figura 27VII). Porém, quando executado o ensaio de liberação, a quercetina foi degradada nesse meio, provavelmente por ação conjunta do pH e da temperatura do meio de dissolução ($37 \pm 0,5$ °C), se mostrando ineficiente para determinação do perfil de liberação da quercetina a partir das micropartículas lipídicas (dados não mostrados).

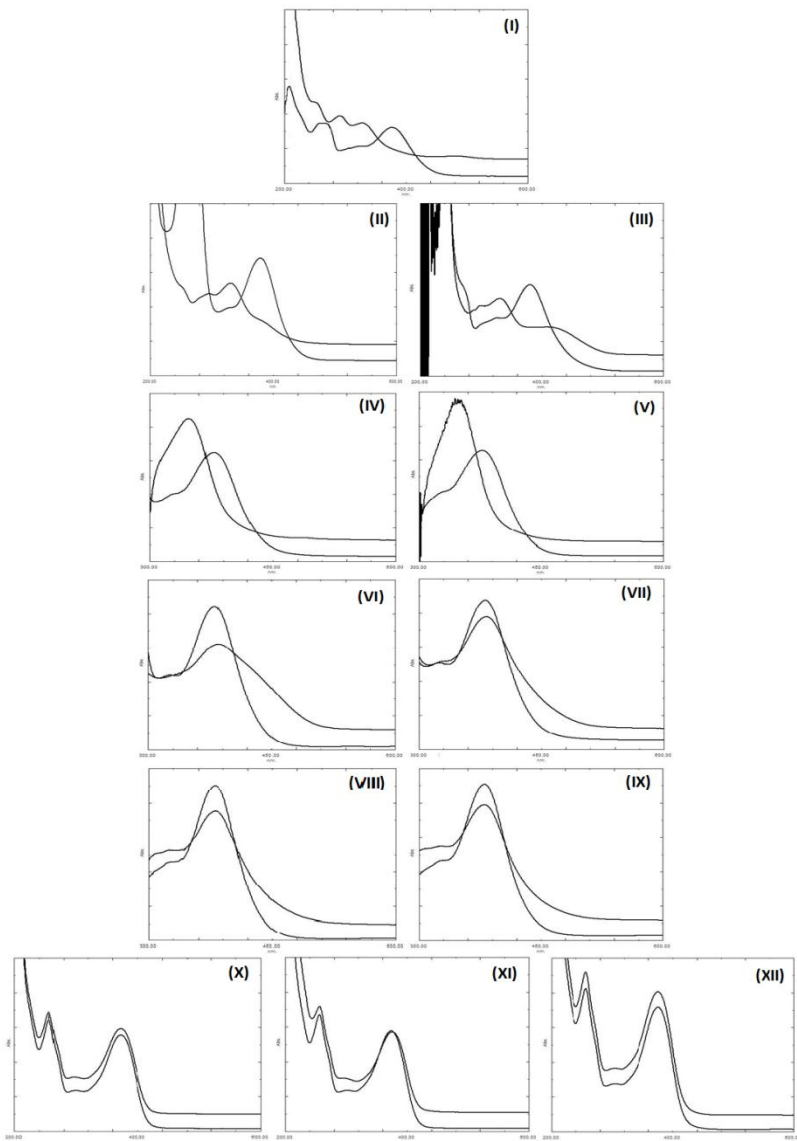


Figura 27. Espectro no UV/Vis da quercetina (A) antes e (B) depois de 24 horas de agitação magnéticos nos meios de dissolução: (I) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4; (II) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) pH 7,4; (III) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μ M com pH 7,4; (IV) solução de PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8

(V/V) contendo BSA 15 μM e ácido ascórbico 0,05% (m/V) em pH 7,4; (V) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μM e ácido ascórbico 0,1% (m/V) em pH 7,4; (VI) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μM e metabissulfito de sódio 0,5% (m/V) em pH 7,4; (VII) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 15 μM e metabissulfito de sódio 1,0% (m/V) em pH 7,4; (VIII) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 25 μM e metabissulfito de sódio 1,0% (m/V) em pH 7,4; (IX) PEG 400:tampão fosfato 0,1 M 2:8 (V/V) contendo BSA 50 μM e metabissulfito de sódio 1,0% (m/V) em pH 7,4; (X) PEG 400:Água 2:8 (V/V) com pH 4,0; (XI) PEG 400:Água 3:7 (V/V) com pH 4,0; e (XII) PEG 400:Água 4:6 (V/V) com pH 4,0.

Por outro lado, em pH ácido ($< 5,0$) a quercetina demonstrou ser estável, conforme indicado nos espectros de absorção das Figuras 27X, 27XI e 27XII. Assim o meio de dissolução PEG 400:água pH 4,0 foi selecionado para a realização dos ensaios de dissolução. Ainda, a solubilidade da quercetina foi avaliada nesse meio contendo diferentes proporções de PEG 400:água. Os resultados estão mostrados na tabela 30.

3.4.1.2 Avaliação da solubilidade da quercetina nos meios de dissolução selecionados

Como pode ser observada na tabela 27, a solubilidade da quercetina aumentou consideravelmente com o aumento da proporção de PEG 400. Para realização do ensaio de liberação da quercetina foi respeitada a condição *sink*. Esta condição é a concentração onde não há saturação do meio e a velocidade de liberação é linear, sem sofrer influência da saturação da quercetina no meio de dissolução (AULTON et al., 2005).

Tabela 27. Avaliação da solubilidade da quercetina em misturas apresentando proporções de PEG e água.

Meio de dissolução	Solubilidade da quercetina ($\mu\text{g/mL}$)
PEG 400:água 2:8 (V/V), pH 4,0	$4,57 \pm 0,02$
PEG 400:água 3:7 (V/V), pH 4,0	$114,18 \pm 0,06$
PEG 400:água 4:6 (V/V), pH 4,0	$1025,85 \pm 0,04$

Portanto, a fim de em condições inferiores à *sink* obter concentrações quantificáveis de quercetina. Os estudos de liberação, então, foram conduzidos em uma mistura de PEG 400:Água pH 4,0 (4:6,V/V) uma vez que esta exibe maior solubilidade do polifenol.

3.4.2 Linearidade e limites de detecção e de quantificação

A figura 28 representa a curva de calibração da quercetina no meio de dissolução. A curva de calibração da quercetina foi linear na faixa de concentração de 1,0 a 12,0 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de correlação de 0,9989 ($y = 0,0682x - 0,004$). A análise da variância confirmou a linearidade do método ($F_{\text{calculado}} 3614,248 > F_{\text{critico}} 2,510158$, $P = 0,05$). O limite de detecção e de quantificação foram $0,27 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $0,83 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando que o método foi suficientemente sensível para determinar a concentração de quercetina no meio de dissolução.

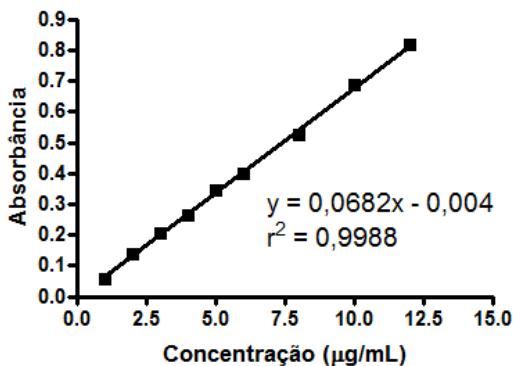


Figura 28. Curva de calibração da quercetina em PEG 400:água pH 4,0 (4:6, V/V).

3.4.3 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da quercetina a partir das micropartículas lipídicas

Nas figuras 29, 30 e 31 pode-se observar os perfis de liberação da quercetina a partir das micropartículas lipídicas de trimiristato de glicerila e behenato de glicerila, na ausência e presença de lecitina, respectivamente.

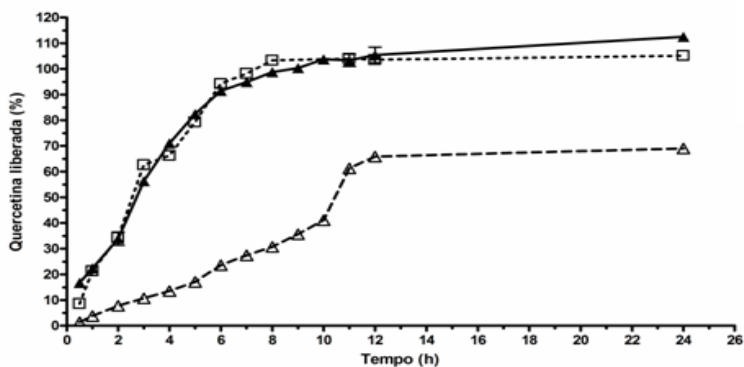


Figura 29. Perfil de liberação da quercetina: (Δ) MTL_{Q1:25}; (\blacktriangle) MTL_{Q1:50}; e (\square) Quercetina livre.

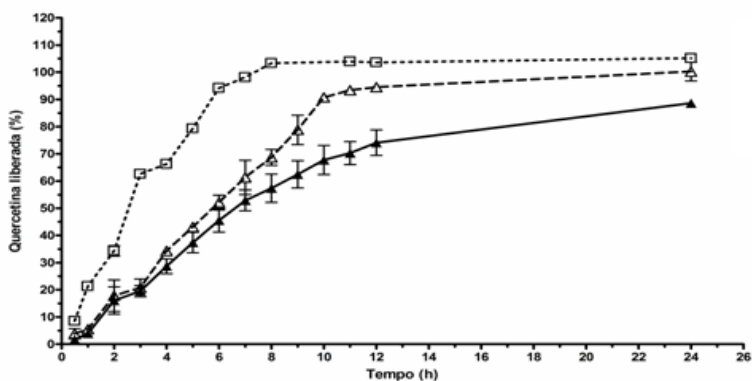


Figura 30. Perfil de liberação *in vitro* da quercetina: (Δ) MB_{Q1:25}; (\blacktriangle) MB_{Q1:50}; e (\square) Quercetina livre.

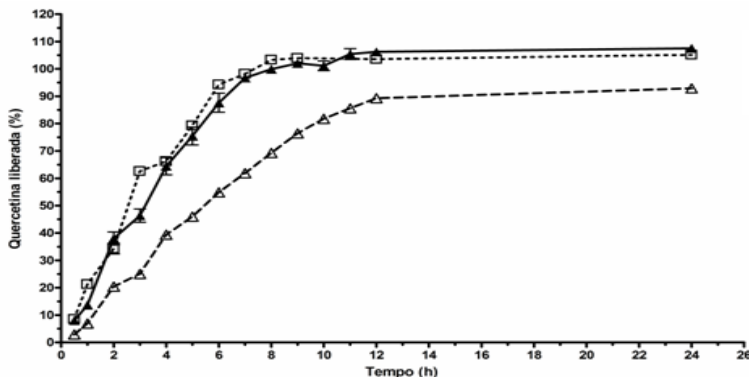


Figura 31. Perfil de liberação *in vitro* da quercetina: (Δ) MBL_{Q1:25}; (▲) MBL_{Q1:50}; e (□) Quercetina livre.

Como pode ser visualizado na Figura 29, quando a quercetina foi adicionada na proporção de 1:50 nas formulações de MTL, a liberação do fármaco foi rápida, e ocorreu com uma velocidade similar à do fármaco não encapsulado. Enquanto a amostra MTL_{Q1:50} liberou 50% do seu teor em aproximadamente 2 horas, a amostra MTL_{Q1:25} liberou a mesma quantidade em cerca de 10 horas. Esta variação de perfil parece estar relacionada ao teor de quercetina nas micropartículas, onde uma maior concentração de quercetina tende a menor velocidade de liberação. Por outro lado, como discutido anteriormente, a formulação MTL_{Q1:25} apresenta muitos cristais de quercetina não encapsulados e seria esperado a obtenção de um maior efeito *burst* no perfil de liberação obtido a partir dessa formulação. No entanto uma maior velocidade de liberação na MTL_{Q1:50} pode ser explicada pela possibilidade da quercetina se encontrar na forma molecular, facilitando sua difusão para o meio de dissolução. Em contrapartida, o trimiristato de glicerila apresenta alto grau de cristalinidade, e as condições empregadas na preparação das micropartículas não foram suficientes para redução da cristalinidade da matriz lipídica. Então, devido à cristalinidade das micropartículas, espera-se que haja uma redução na velocidade de liberação do flavonoide, fato observado na amostra MTL_{Q1:25}.

As micropartículas lipídicas preparadas com behenato de glicerila apresentaram perfis de liberação diferentes daqueles apresentados pelas formulações preparadas a partir do trimiristato de glicerila. A amostra MB_{Q1:25} liberou 50% da quercetina em aproximadamente 6 horas, enquanto a amostra MB_{Q1:50} liberou a mesma porcentagem do flavonoide em 7 horas. O retardo na liberação da quercetina ocorrido na

amostra $MB_{Q1:50}$ quando relacionado à amostra $MB_{Q1:25}$ pode estar associado a diferença no diâmetro geométrico, onde micropartículas de diâmetro inferior apresentam maior superfície de contato com o meio de dissolução, facilitando o processo de liberação da quercetina. Com a adição da lecitina de soja houve uma aceleração na liberação do polifenol, as amostras $MBL_{Q1:25}$ e $MB_{Q1:50}$ liberam 50% da quercetina em cerca de 3 e 6 horas, respectivamente. Este processo pode ocorrer devido redução do diâmetro das micropartículas com a incorporação da lecitina de soja. A redução do diâmetro implica em um aumento da área de contato entre as partículas e o meio de dissolução, aumentando a possibilidade de migração da molécula da matriz lipídica para o meio de dissolução. Com a redução do diâmetro ocorre, também, uma redução da rota para liberação do polifenol, ou seja, as moléculas de quercetina percorrem uma menor distância entre a micropartícula e o meio de dissolução. Este fator tendem a promover a elevação da velocidade de liberação da quercetina.

Os perfis de liberação foram avaliados e comparados estatisticamente, empregando os valores de eficiência de dissolução (ED%) (tabela 28). Os resultados da ANOVA são mostrados na tabela 29.

Tabela 28. Resultados de eficiência de dissolução das micropartículas

Amostra	Eficiência de dissolução (%)
$MTL_{Q1:25}$	45,07 ± 0,30
$MTL_{Q1:50}$	76,04 ± 2,35
$MB_{Q1:25}$	70,46 ± 3,48
$MB_{Q1:50}$	59,76 ± 4,46
$MBL_{Q1:25}$	82,07 ± 3,76
$MBL_{Q1:25}$	67,78 ± 1,98

Tabela 29. Análise da variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$) obtida a partir da eficiência de dissolução da quercetina a partir das micropartículas lipídicas obtidos após 24 horas de ensaio.

Fonte da variação	SQ*	GL**	MQ***	F_{calculado}	F_{crítico}
Tipo de lipídio	646,710	2	323,355	36,167	3,885
Massa de quercetina	17,920	1	17,920	1,949	4,747
Tipo de Lipídio + Massa de quercetina	1898,583	2	949,291	103,241	3,885
Resíduo	110,339	12	9,195		
Total	2673,551	17	157,268		

SQ* é a soma dos quadrados; gl** o grau de liberdade; e MQ*** a média dos quadrados.

$\alpha = 0,05$

A análise da variância (ANOVA) (tabela 29) indicou que as micropartículas apresentam diferenças significativas quanto à velocidade de liberação da quercetina em função do tipo de lipídio ($F_{\text{calculado}} 36,17 > F_{\text{crítico}} 3,88$), porém não existe diferença na quantidade inicialmente adicionada de quercetina nas formulações ($F_{\text{calculado}} 1,96 < F_{\text{crítico}} 4,75$). Porém quando realizado o pós-teste de Tukey de comparação de médias alternadas, todas as amostras apresentam diferença estatisticamente significativa, inclusive aquelas com variação da massa inicial de quercetina.

Sendo assim, as micropartículas lipídicas desempenham liberação relativamente rápida para materiais altamente cristalinos. Este aumento na velocidade de liberação pode estar relacionado à alta porosidade das partículas, fator que eleva a área de superfície de contato do meio de dissolução com as micropartículas.

4. CONCLUSÕES

- Foram preparadas micropartículas lipídicas a partir do trimiristato de glicerila com boas propriedades de aerossolização, que provavelmente se depositariam em regiões mais profundas do pulmão.

- Foram preparadas micropartículas lipídicas a partir do behenato de glicerila, contendo lecitina de soja, com boas propriedades de aerossolização, com uma fração respirável que possivelmente se depositaria em regiões mais profundas do pulmão.

- Foi validado um método linear, específico, preciso, exato, e robusto para quantificação, por espectroscopia de absorção no UV, da quercetina extraída a partir das micropartículas lipídica.

- Os métodos utilizados para preparação das micropartículas não foram suficientemente agressivos para degradação da quercetina, sendo a estabilidade química deste polifenol nas micropartículas lipídicas comprovada mediante análise comparativa dos espectros no UV/Vis da quercetina extraída a partir das micropartículas lipídicas e das soluções de quercetina induzidas à degradação por estresse.

- As técnicas de preparação das micropartículas lipídicas foram viáveis, produzindo partículas bastante porosas, de formato esférico, com densidade bruta e de compactação próxima a 0,2 g/mL, conferindo propriedades de fluxo entre boa e favorável a tolerável, segundo cálculo pelo índice de Carr.

- As micropartículas preparadas com trimiristato estariam, teoricamente, aptas para deposição em regiões profundas do pulmão, uma vez que demonstra MMAD entre 1 e 5 μm .

- As micropartículas preparadas com behenato de glicerila, independentemente da adição de lecitina de soja, apresentem MMAD superiores a 8,43 μm , sugerindo sua deposição em regiões superiores do trato respiratório. Porém, as micropartículas preparadas com behenato de glicerila na presença de lecitina de soja apresentam uma fração respirável, onde cerca de 50% das partículas tendem a se depositarem nas regiões mais profundas dos pulmões.

- As micropartículas preparadas com behenato de glicerila, na ausência de lecitina de soja, apresentam MMAD_{50%} elevados, com

fração fina capaz de se depositar nas regiões superiores do pulmão, promovendo liberação da quercetina.

- Os perfis de difração de raios-X das micropartículas lipídicas sugerem que o trimiristato de glicerila e o behenato de glicerila, constituintes da matriz lipídica das micropartículas, apresentam perfis cristalinos semelhantes aos das matérias-primas. Este resultado foi confirmado através da análise por calorimetria exploratória diferencial através da análise da entalpia de fusão dos lipídios.

- O trimiristato de glicerila e o behenato de glicerila, e suas respectivas micropartículas demonstraram indícios de que apresentam a mesma forma polimórfica, β e β' , respectivamente, quando analisadas por difração de raios-X e por calorimetria exploratória diferencial. Demonstrando assim que os lipídios se encontram nas formas mais estáveis em suas respectivas formulações.

- O ordenamento cristalino da matriz lipídica pode ser um fator fundamental para a baixa eficiência de encapsulação da amostra MTL_{Q1:50} e para a presença de cristais de quercetina na porção exterior das micropartículas MTL_{Q1:25}.

- As análises por espectroscopia Raman e calorimetria exploratória diferencial são inconclusivas quanto à interação entre os lipídios e a quercetina.

- A espectroscopia Raman indica que possivelmente houve uma interação, formação de blenda ou alteração da forma de disposição da lecitina nas micropartículas preparadas com behenato de glicerila quando comparado com aquelas de trimiristato de glicerila.

- As micropartículas lipídicas apresentam diferença estatisticamente significativa em termos de velocidade de liberação, em função da alteração massa inicial de quercetina e do tipo de lipídio.

- A amostra MTL_{Q1:25}, apresenta retardo acentuado na liberação da quercetina, liberando somente 70% do polifenol em até 24 horas. Este fator pode estar relacionado ao grau de cristalinidade do lipídio.

- O aumento da eficiência de dissolução das micropartículas de behenato de glicerila contendo lecitina de soja pode ocorrer devido a diminuição do diâmetro das micropartículas. Outra possibilidade é a presença de quercetina em porções de lecitina de soja presentes na matriz lipídica.

- As micropartículas lipídicas preparadas a partir do trimiristato de glicerila tendem à deposição no trato pulmonar de forma mais adequada para a administração da quercetina. Destaca-se a amostra $MTL_{Q1:25}$ em função de apresentar maior teor de quercetina, e maior controle da velocidade de liberação deste polifenol. Apesar da presença de cristais de quercetina na porção exterior das partículas, os carreadores estariam, possivelmente, aptos a liberar o flavonoide de forma adequada nos pulmões.

- As micropartículas lipídicas preparadas a partir do behenato de glicerila na ausência de lecitina de soja parecem inadequados para a administração pulmonar em virtude dos altos diâmetros aerodinâmicos ($MMAD$ e $MMAD_{50\%}$).

- As micropartículas lipídicas preparadas a partir do behenato de glicerila na presença de lecitina de soja apresentam uma fração respirável que provavelmente se depositaria em regiões profundas do pulmão, com uma fração secundária depositadas nas porções superiores. As amostras $MBL_{Q1:25}$ e $MBL_{Q1:50}$ apresentam eficiência de encapsulação aceitável, porém não apresentam grande capacidade de controle da liberação do polifenol. No entanto, a amostra $MBL_{Q1:25}$ demonstra maior teor e menor velocidade de liberação da quercetina a partir das micropartículas, se mostrando mais adequada para carrear este flavonoide.

- Sendo assim, as micropartículas $MTL_{Q1:25}$ e $MBL_{Q1:25}$ despontam como os sistemas microencapsulados mais promissores, uma vez que suas propriedades de aerossolização são adequadas para a administração pulmonar da quercetina.

BIBLIOGRAFIA

AKSOY, S.; KLENER, J.; WEINSHILBOUM, R. M. Catechol-*O*-methyltransferase pharmacogenetics – photoaffinity-labeling and Western-blot analysis of human liver samples. **Pharmacogenetics**, v. 3, n. 2, p. 116-122, abr., 1993.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.

BEGAT, P.; PRICE, R.; HARRIS, H.; MORTON, D. A. V.; STANIFORTH, J. N. The influence of force control agents on the cohesive-adhesive balance in dry powder inhaler formulations. **KONA**, v. 23, p. 109-121, ago., 2005.

BIEGER, J.; CERMAK, R.; BLANK, R.; de BOER, V. C. J.; HOLLMAN, P. C. H.; KAMPHUES, J.; WOLFFRAM, S. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 8, p. 1417-1420, ago., 2008.

BISCHOFF, S. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 6, p. 733-740, nov., 2008.

de BOER, V. C.; DIHAL, A. A.; van der WOUDE H.; ARTS, I. C.; WOLFFRAM, S.; ALINK, G. M.; RIETIENS, I. M.; KEIJER, J.; HOLLMAN, P. C. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1718-1725, jul., 2005.

BOERSMA, M. G.; WOUDE, H. van der; BOGAARDS, J.; BOEREN, S.; VERVOORT, J.; CNUBBEN, N. H. P.; IERSEL, M. L. P. S. van; BLADEREN, P. J. van; RIETJENS, I. M. C. M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 662-670, maio, 2002.

BOKKENHEUSER, V. D.; WINTER, J.; COHEN, B. I.; O'ROURKE, S.; MOSBACH, E. H. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochemical Journal**, v. 248, n. 3, p. 953-956, dez., 1987 *apud* GRAEFE, E. U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A-K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 492-499, maio, 2001.

BOSQUILLON, C.; LOMBRY, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 3, p. 329-339, fev., 2007.

BORGHETTI, G. S.; COSTA, I. M.; PETROVICK, P. R.; PEREIRA, V. P.; BASSANI, V. L. Characterization of different samples of quercetin in solid-state: Indication of polymorphism occurrence. **Pharmazie**, v. 61, n. 9, p. 802-804, set., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Estatísticas de saúde e mortalidade. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRESSON, S.; EL MARSSI, M.; KHALIFA, B. Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n. 2, p. 119-129, abr., 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA, The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, CD-ROM, versão 11.0, Londres, 2007.

BRUBACH, J. B.; JANIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to

differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2; p. 248-256, maio, 2007.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 21, p. 3229-3235, set., 2006.

CESUR, S.; GOKBEL, S. Crystallization of mefenamic acid and polymorphs. **Crystal Research and Technology**, v. 43, v. 7, p. 720-728, mar., 2008.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 4930-4934, mar., 2006.

CHEBIL, L.; HUMEAU, C.; ANTHONI, J.; DEHER, F.; ENGASSER, J.-M.; GHOUL, M. Solubility of flavonoids in organic solvents. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 52, n.5, p. 1552-1556, jul., 2007.

CHEN, J. S.; LEE, M.-J.; LI, H. YANG, C. S. Absorption, distribution and elimination of tea polyphenol in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 9, p. 1045-1050, set., 1997.

CHEW, N. Y. K.; TANG, P.; CHAN, H.-K.; RAPER, J. A. How much particle surface corrugation is sufficient to improve aerosol performance of powders? **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 148-152, jan., 2005.

COATES, A. L.; O'CALLAGHAN, C. Drug administration by aerosol in children. In: CHERNICK, V.; BOAT, T. F.; WILLMONT, R. W.; BUSH, A. **Kending 'S disorders of the respiratory tract in children**. Philadelphia: Saunders-Elsevier, p. 268-279, 2006.

CODORNIU-HERNANDEZ, E.; MESA-IBIRICO, A.; MONTERO-CABRERA, L. A.; MARTINEZ-LUZAARDO, F.; BORRMANN, T.; STOHRER, W. D. Theoretical study of flavonoids and proline interactions, aqueous and gas phase. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 623, n. 1-3, p. 63-73, abr., 2003.

COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTER, I.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. In vivo quercetrin anti-inflammatory effect involves release of quercetrin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. **European Journal of Immunology**, v., 35, n. 2, p. 584-592, fev., 2005.

CORNARD, J. P.; MERLIN, J. C.; BOUDET, A. C.; VRIELYNCK, L. Structural study of quercetin by vibrational and electronic spectroscopies combined with semiempirical calculations. **Biospectroscopy**, v. 3, n. 3, p. 183-193, 1997.

COUGHTRIE, M. W. H.; SHARP, S.; MAXWELL, K.; INNES, N. P. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. **Chemical-Biological Interacts**, v. 109, n. 1-3, p. 3-27, fev., 1998.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 618-621, jan., 2002.

DAS, M. RAM, A.; GHOSH, B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. **Inflammation Research**, v. 52, n. 3, p. 101-106, mar., 2003.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and

liver β -glucosidase activity. **FEBS Letters**, v. 436, n. 1, p. 71-75, set., 1998.

DEL CURTO, M. D.; CHICCO, D.; D'ANTONIO, M.; CIOLLI, V.; DANNA, H.; D'URSO, S.; NEUTEBOOM, B.; PMPILI, S.; SCHIESARO, S.; ESPOSITO, P. Lipid microparticle as sustained release system for a GnRH antagonist (Antide). **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 297-310, abr., 2003.

DEVEREUX, G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 869-874, nov., 2006.

DONAVAN, J. L.; CRESPIY, V.; MANACH, C.; MORAND, C.; BESSON, C.; SEALBERT, A.; REMESY, C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1753-1757, jun., 2001.

DORA, C. L.; SILVA, L. F. C.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; LEMOS-SENNA, E. Formulation study of quercetin-loaded lipid based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 2.; p. 289-296, 2011.

DORSCH, W.; BITTINGER, M.; KASS, A.; MULLER, A.; KREHER, B.; WAGNER, H. Antiasthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, e related compounds prevent allergen- and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 97, n. 1, p. 1-7, 1992.

EDWARDS, D. A.; HANES, J.; CAPONETTI, G.; HRKACH, J.; BEN-JEBRIA, A.; ESKEW, M. L.; MINTZES, J.; DEEVER, D.; LOTAN, N.; LANGER, R. Large porous particles for pulmonary drug delivery. **Science**, v. 276, n. 5320, p. 1868-1971, jun., 1997.

ERNI, C.; SUARD, C.; FREITAS, S.; DREHER, D.; MERKLE, H. P.; WALTER, E. Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4667-4676, dez., 2002.

EVORA, C.; SORIANO, I.; ROGERS, R. A.; SHAKESCHEFF, K. M.; HANES, J.; LANGER, R. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. **Journal of Controlled Release**, v. 51, n. 2-3, p. 143-152, fev., 1998.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 125-132, mar., 1999.

GEISER, M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 207-217, ago., 2010.

GLOBAL INITIATIVE OF ASTHMA. Global burden for Asthma, 2004.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 2-3, p. 229-234, dez., 1975.

GRAEFE, E. U.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 5, p. 219-233, maio, 1999 *apud* GRAEFE, E. U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A.-K.; UEHLEKE, B.; DREWELow, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DARENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics

and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 492-499, maio, 2001.

GRAEFE, E. U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A.-K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DARENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 492-499, maio, 2001.

GREENE, R. J.; HARRIS, N. D. **Pathology and therapeutics for pharmacists: A basis for clinical pharmacy practice**. 3. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2008. 271-364 p.

GUARINO, V.; TADDEI, P.; DI FOGGIA, M.; FAGNANO, C.; CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L. The influence of hydroxyapatite particles on *in vitro* degradation behavior of poly ϵ -caprilactone-based composite scaffolds. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 11, p. 3655-3668, nov., 2009.

HAGEMANN, J. W. Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides. In: GARTY, N.; SATO, K. **Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids**. Nova York: Marcel Dekker, 1988, 9-95 p. *apud* BRESSON, S.; MARSSI, M. El ; KHELIFA, B. Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n. 2, p. 119-129, abr., 2005.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, nov., 2007.

HICKEY, A. J.; MANSOUR, H. M.; TELKO, M. J.; XU, Z.; SMYTH, H. D. C.; MULDER, T.; MCLEAN, R.; LANGRIDGE, J.;

PAPADOPOULOS, D. Physical characterization of components particles included in dry powder inhalers. I. Strategy review and static characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 1282-1301, maio, 2007.

HOLLMAN, P. C.; VRIES, J. H. de; LEEUWEN, S. D. van; MENGELERS, M. J.; KATAN, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1276-1282, dez., 1995.

HOLLMAN, P. C.; TRIJP, J. M. van; BUYSMAN, M. N.; GAAG, M. S. van der; MENGELERS, M. J.; VRIES, J. H. de; KATAN, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 418, n. 1-2, p. 152-156, nov., 1997.

HU, F-Q.; JIANG, S-P.; DU, Y-Z.; YUAN, H.; YE, Y-Q; ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 45, n. 3-4, p. 167-173, nov., 2005.

HU, F-Q.; JIANG, S-P.; DU, Y-Z.; YUAN, H.; YE, Y-Q; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructures lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83-89, maio, 2006.

ICH, International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: Texte and methodology Q2(R1). **ICH Harmonised Tripartite Guideline**, 2005.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The Protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 154, n. 1-3, p. 21-29, nov., 2000.

JASPART,S.; BERTHOLET, P.; PIEL, G.; DOGNÉ, J.-M.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, n. 1, p. 47-56, jul., 2007.

JORES, K.; HABERLAND, A.; WARTEWIG, S.; MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 11, p. 1887-1897, nov., 2005.

KIM, D. H.; JUNG, E. A.; SOHNG, I. S.; HAN, J. A.; KIM, T. H.; HAN, M. J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 1, p. 17-23, fev., 1998.

KING, C. D.; RIOS, G. R.; GREEN, M. D.; TEPHLY, T. R. UDP-glucuronosyltransferases. **Current Drug Metabolism**, v. 1, n. 2, p. 143-161, set., 2000.

KITSON, T. M. Spectrophotometric and kinetic studies on the binding of the bioflavonoid quercetin to bovine serum albumin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 10, p. 2165-2170, out., 2004.

KO, W. C.; SHIH, C. M.; CHEN, M. C.; LAI, Y. H.; CHEN, J. H.; CHEN, C. M. Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovoalbumin-induce airway hyperresponsiveness. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1123-1127, dez., 2004.

KWON, M. J.; BAR, J. H.; KIM, J. J.; NA, K.; LEE, E. S. Long acting porous microparticle for pulmonary protein delivery, v. 333, n. 1-2, p. 5-9, jan., 2007.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutics effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588-599, dez., 2003.

LAHRIB, H.; ZENG, X. M.; MARTIN, G. P.; MARRIOTT, C.; PRITCHARD, J. The use of different grades of lactose as a carrier for aerosolized salbutamol sulphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 191, n. 1, p. 1-14, nov., 1999.

LI, H. L.; ZHAO, X. B.; MA, Y. K. ; ZHAI, G. X. ; LI, L. B. ; LOU, H. X. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 3, p. 238-244, fev., 2009.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, n. 1-2, p. 9-12, fev., 2001.

LONG, X.; ZHANG, L.; QIAN, Y. Preparation and crystal modification of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, p. 518-525, ago., 2006.

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F. ; RÉMÉSY, C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 409, n. 1, p. 12-16, jun., 1997.

MANACH, C.; TEXIER, O.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; RÉGÉRAT, F. ; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechins in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1259-1266, dez., 1999.

MANTANUS, J.; ROZET, E.; van BUTSELE, K.; de BLEYE, C.; CECCATO, A.; EVRARD, B.; HUBERT, P.; ZIÉMONS, E. Near infrared and Raman spectroscopy as process analytical technology tools for the manufacturing of silicone-based drug reservoirs. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 96-106, ago., 2011.

MEAAWNA, M.; SCALIA, S.; YOUNG, P. M.; TRAINI, D. Solid lipid budesonide microparticles for controlled release inhalation therapy. **The AAPS Journal**, v. 2, n. 4, dez., 2009.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, abr., 2001.

MIN, Y.-D.; CHOI, C.-H.; BARK, H.; SON, H.-Y.; PARK, H.-H.; LEE, S.; PARK, J.-W.; PARK, E.-K.; SHIN, H.-I.; KIM, S.-H. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflammation Research**, v. 56, n. 5, p. 210-215, maio, 2007.

MOMIĆ, T.; SAVIĆ, J.; ČERNIGOJ, U.; TREBŠE, P.; VASIĆ, V. Protolytic equilibria and photodegradation of quercetin in aqueous solution. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 72, n. 11, o. 1447-1460, nov., 2007.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, jul., 2000.

NAIR, M. P.; KANDASWAMI, C.; MAHAJAN, S.; CHEDHA, K. C.; CHAWDA, R.; NAIR, H.; KUMAR, N.; NAIR, R. E. SCHWARTZ, S. A. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood

mononuclear cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1593, n. 1, p. 29-36, dez., 2002.

NASEEM, B.; SABRI, A.; HASAN, A.; SHAH, S. S. Interaction of flavonoids within organized molecular assemblies of anionic surfactant. **Colloids and Surfaces B**, v. 35, n. 1, p. 7-13, maio, 2004.

NATARAJAN, V.; KRITHICA, N.; MADHAN, B.; SEHGAL, P. K. Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 195-205, jan., 2010.

NEMETH, K.; PISKULA, M. K. Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 397-409, maio, 2007.

PARK, H. J.; LEE, C. M.; JUNG, I. D.; LEE, J. S.; JEONG, Y. I.; CHANG, J. H.; CHUN, S. H.; KIM, M. J.; CHOI, I. W.; AHN, S. C.; SHIN, Y. K.; YEOM, S. R.; PARK, Y. M. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 261-267, mar., 2009.

PARLATI, C. Respirable microparticles of aminoglycoside antibiotics for pulmonary administration. Universita' Degli Studi di Parma, 2008. 162 p. [Tese de Doutorado].

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 6, n. 1, p. 67-74, jan., 2007.

PAULKE, A.; NÖLDNER, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. **Pharmazie**, v. 63, n. 4, p. 296-302, abr., 2008.

PILCER, G.; AMIGHI, K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 1-19, jun., 2010.

PRICE, R.; YOUNG, P. M.; EDGE, S.; STANFORTH, J. N. The influence of relative humidity on particulate interactions in carrier-based dry powder inhaler formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1-2, p. 47-59, out., 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2004, 920p.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of controlled release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, jul., 2006.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 339-350, jun., 2001.

ROGÉRIO, A. P.; DORA, C. L.; ANDRADE, E. L.; CHAVES, J. S.; SILVA, L. F. C.; LEMOS-SENNA, E.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airway allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p. 288-297, abr., 2010.

ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; da SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, n. 10, p. 402-408, out., 2007.

SANNA, V.; KIRSCHVINK, N.; GUSTIN, P.; GAVINI, E.; RELAND, I.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Preparation and *in vivo* toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 2, p. 1-7, março, 2004.

SCHNEIDER, H.; BLAUT, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 1, p. 71-75, jan., 2000.

SCHNEIDER, H.; SCHWIERTZ, A.; COLLINS, M. D.; BLAUT, M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from human intestinal tract. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 2, p. 81-91, jan., 1999.

SEBTI, T.; AMIGHI, K. Preparation and *in vitro* evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 1, p. 51-58, maio, 2006.

SINGH, A. M.; BUSSE, W. W. Asthma exacerbation – 2: Aetiology. **Thorax**, v. 61, n. 9, p. 809-816, set., 2006.

SMITH, I. J.; PARRY-BILLINGS, M. The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, v. 2, p. 79-95, abr., 2003.

SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G. G. C.; WILLIAMS, R. J. RICE-EVANS, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. **The Biochemical Journal**, v. 372, parte 1, p. 173-181, maio, 2003.

SRINIVAS, K.; KING, J. W.; HOWARD, L. R.; MONRAD, J. K. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and

quercetin dehydrate in subcritical water. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 2, p. 208-218, set., 2010.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. **Biomaterials**, v. 9, n. 4, p. 356-362, jul., 1988.

TANG, P.; CHAN, H.-K.; RAPER, J. A. Prediction of aerodynamic diameter of particles with rough surfaces. **Powder Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 64-78, out., 2004.

TELKO, M. J.; HICKEY, A. J. Dry powder inhaler formulation. **Respiratory Care**, v. 50, n. 9, p 1209-1227, set., 2005.

TELLES FILHO, P. d'A. Informações Médicas: **Asma Brônquica**, disponível em:
http://www.asma-bronquica.com.br/medical/historia_da_asma.html#6,
acessado em 25 de março de 2009.

TOMODA, K.; KOJIMA, S.; KAJIMOTO, M.; WATANABE, D.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K. Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 1, p. 1-6, set., 2005.

TORTORA, G. J.; BRABOWSKI, S. R. **Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2006. 449-475 p.

UNGARO, F.; BIANCA, R. d'E. di V.; GIOVINO, C.; MIRO, A.; SORRENTINO, R.; QUAGLIA, F.; La ROTONDA, M. I. Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: *In vivo* deposition and hypoglycemic activity after delivery to rat lungs. **Journal of Controlled Release**, v. 135, p. 25-34, 2009.

USAMI, E.; KUSANO, G.; KATAYOSE, T.; WACHI, H.; SEYAMA, Y. Assessment of antioxidant capacity of natural compound by water- and lipid-soluble antioxidant factor. **The Journal of Pharmaceutical Society of Japan**, v. 124, n. 11, p. 847-850, nov., 2004.

WALLE, T.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 10, p. 2648-2652, out., 2001.

WARK, P. A. B.; GIBSON, P. G. Asthma exacerbations – 3: Pathogenesis. **Thorax**, v. 61, n. 10, p. 909-915, out., 2006.

WINDBERGS, M.; STRACHAN, C. L.; KLEINEBUDDE, P. Investigating the principles of recrystallization from glyceride melts. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 4, p. 1224-1233, dez., 2009.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

WRIGHT, D. M.; SARACEVIS, Z. S.; KYLE, N. H.; MOTSKIN, M.; SKEPPER, J. N. The mesoporosity of microparticles spray dried from trehalose and nanoparticle hydroxyapatite depends on the ratio of nanoparticles to sugar and nanoparticles surface charge. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 1, p. 189-206, jan., 2010.

WU, Y. Q.; ZHOU, C. H.; TAO, J.; LI, S. N. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. **Life Science**, v. 78, n. 23, p. 2689-2696, maio, 2006.

YANG, W.; PETERS, J. I.; WILLIAMS III, R. O. Inhaled nanoparticles – A current review. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 356, n. 1-2, p. 239-247, fev., 2008.

YANG, Y.; BAJAJ, N.; XU, P.; OHN, K.; TSIFANSKU, M. D.; YEO, Y. Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 10, p. 1947-1953, abr., 2009.

YANO, J.; SATO, K. FT-IR studies on polymorphism of fats: molecular structures and interactions. **Food Research International**, v. 32, n. 4, p. 249-259, maio, 1999.

ZENKEVICH, I. G.; ESHCHENKO, A. Y.; MAKAROVA, S. V.; VITENBERG, A. G.; DOBRYAKOV, Y. G.; UTSAL, V. A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 654-672, mar., 2007.

ZHANG, L.; YANG, X.; LI, S.; GAO, W. Preparation, physicochemical characterization and *in vitro* digestibility on solid complex of maize starches with quercetin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 787-792, abr., 2011.

ZHOU, A.; KIKANDI, S.; SADIK, O. A. Electrochemical degradation of quercetin: Isolation and structural elucidation of the degradation products. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 9, p. 2246-2255, set., 2007.