



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANO-
E MICROESTRUTURADOS CONSTITUÍDOS DE COMPLEXOS
DE LECITINA E QUITOSANA PARA A LIBERAÇÃO
COLÔNICA DA NARINGENINA**

MARIANA DALAGNOL

Florianópolis
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO NANO-
E MICROESTRUTURADOS CONSTITUÍDOS DE COMPLEXOS
DE LECITINA E QUITOSANA PARA A LIBERAÇÃO
COLÔNICA DA NARINGENINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos Senna
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves
Cardoso

MARIANA DALAGNOL

Florianópolis
2011

*Ao maior tesouro da minha vida, meus pais Sérgio e
Miriam e minha irmã Raquel.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amores, meus pais Sérgio e Miriam. Tudo que sou e tudo que conquistei até hoje devo a vocês. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos, sempre apoiando, aconselhando e me enchendo de amor e carinho.

À minha querida irmã Raquel, pela companhia, por compreender os momentos difíceis, por tudo que aprendi contigo e por ser exemplo de persistência e força de vontade.

Aos meus dindos Sérgio e Stela pelo amor, carinho e incentivo. Vocês ocupam um lugar especial no meu coração. Obrigada por tudo!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elenara Lemos Senna por todo empenho, sabedoria, compreensão e confiança, pela presença em todos os momentos e por ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho. Serei eternamente grata por esta oportunidade!

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Simone Gonçalves Cardoso por acreditar no meu trabalho e pelo carinho de sempre.

Aos meus colegas e amigos do lab: Talitha, Clarissa, Luís, Luiza, Bianca, Cristian, Geórgia, Letícia, Geci e Mayra pela amizade, companheirismo e momentos de descontração e risadas. Com certeza tudo teria sido mais difícil sem a presença de vocês.

Ao Rafa, Paulo e Lari pela ajuda com o DSC, dissolução e validação. Obrigada por tudo que vocês me ensinaram, por terem tornado os dias difíceis mais alegres, pelo otimismo, apoio e pela amizade que nasceu durante os experimentos. Vocês são muito especiais!

Ao Prof. Dr. Marcos Segatto pela colaboração nos ensaios de DSC e dissolução.

Ao amigo Prof. Dr. Jamil Assreuy e a Karin pela oportunidade de realizar os ensaios de captura celular.

À Leka, minha amiga, irmã, fisioterapeuta, psicóloga e para assuntos gerais! Sou grata por você existir e fazer parte da minha vida, por tudo que compartilhamos juntas e por você ter sempre me dado força e acreditado em mim.

Muito Obrigada!

RESUMO

O emprego de nano- e micropartículas como carreadores de fármacos anti-inflamatórios tem sido considerada uma estratégia promissora para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn. A naringenina, um flavonóide amplamente encontrado nos frutos e vegetais, exibe inúmeras propriedades farmacológicas, tais como antiinflamatória, antitumoral e antioxidante. Entretanto, a naringenina apresenta baixa solubilidade aquosa, além de ser extensivamente metabolizada pelas bactérias colônicas, limitando assim, o seu uso terapêutico. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nano- e micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com polímero gastrorresistente visando a liberação colônica da naringenina, após administração oral. As nano- e micropartículas de lecitina/quitosana foram preparadas por meio da técnica de interação iônica. Inicialmente, vários fatores de formulação foram testados, como a massa molar da quitosana, o tipo de lecitina e a proporção de lecitina e quitosana nas formulações. Para a quantificação da naringenina, uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada. A eficiência de encapsulação da naringenina nas partículas de lecitina/quitosana foi superior a 94,5 % para todas as amostras e o teor variou entre 262,41 a 386,31 $\mu\text{g/mL}$. Igualmente, o tamanho, a distribuição granulométrica e o potencial zeta das partículas foram afetados pela composição das formulações. Estudos de captura celular em cultura de macrófagos murinos J774 foram realizados após a encapsulação do fluorocromo vermelho de Nilo nas partículas. Nesses estudos, a visualização da fluorescência vermelha e a alteração do tamanho e morfologia dos macrófagos indicaram que as partículas são fagocitadas, sendo essa característica vantajosa para o aumento do tempo de residência dos carreadores no sítio da inflamação. Após esses ensaios, o revestimento das partículas de lecitina/quitosana com polímero entérico foi realizado mediante ressuspensão das partículas, previamente liofilizadas, em uma solução de Eudragit[®] S100. Para as preparações entéricas, o teor de naringenina variou de 1,36 a 1,97 mg /100 mg. O revestimento foi evidenciado pela alteração da carga superficial positiva, das partículas de lecitina e quitosana, para negativa, caracterizando a presença do polímero entérico aniônico na superfície das mesmas. Além disso, um acréscimo no tamanho de partícula foi observado, sugerindo o revestimento de aglomerados de partículas. Os estudos de calorimetria exploratória diferencial e

espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier evidenciaram a interação entre os componentes das formulações. O ensaio de liberação *in vitro* realizado em fluido gástrico simulado confirmou a obtenção de partículas gastrorresistentes, visto que somente 8,27 a 11,98 % da naringenina foram liberados após 2 horas. Por outro lado, entre 85 e 90,33 % e 97,63 e 101,83 % de naringenina foram liberados em fluido entérico simulado e fluido biorrelevante colônico, respectivamente, após 4 horas. A análise estatística da eficiência de dissolução indicou que a taxa de liberação de naringenina foi diferente nos três meios estudados, entretanto, não foi afetada pela proporção de lecitina e quitosana nas formulações.

Palavras-chave: Naringenina, interação iônica, nano- e micropartículas de lecitina/quitosana, partículas entéricas, doenças inflamatórias intestinais.

ABSTRACT

Title: Development of nano and microparticles from lecithin and chitosan complexes aiming the colonic delivery of naringenin.

The use of nano and microparticles as anti-inflammatory drug carrier systems is considered a promising strategy for the treatment of inflammatory bowel diseases, as ulcerative colitis and Crohn's disease. Naringenin, a flavonoid widely distributed in fruits and vegetables, displays several pharmacological properties, including anti-inflammatory, antitumor, and antioxidant activities. However, this polyphenolic compound exhibits low water solubility, besides being extensively metabolized by the colonic bacteria, which, in turn, prevents its use in therapeutics. So, the aim of this study was to develop nano- and microparticles consisted of lecithin and chitosan for colonic delivery of the naringenin. Lecithin/chitosan nano- and microparticles were prepared using the ionic interaction technique. Initially, several formulation parameters were assayed, i.e., the chitosan molar weight, the type of lecithin, and the lecithin to chitosan ratio. To determine the naringenin loading in the nano- and microparticles, a high performance liquid chromatography method was developed and validated. The encapsulation efficiency of the naringenin in the particles was above 94.5 % for all formulations and the naringenin content varied from 262.12 to 386.31 $\mu\text{g/mL}$. Also, particle size, size distribution, and zeta potential were varied, depending on the composition of the formulations. *In vitro* uptake studies were carried by incubation of Nile red-loaded nano- and microparticles with J774 murine macrophages. In these studies, the visualization of the red fluorescence inside the cells and the size and morphology change of the macrophages indicated that lecithin/chitosan particles undergoes phagocytosis, which may be advantageous for increasing the residence time of the carriers in the inflammation site. The enteric coating of the particles was achieved by adding a Eudragit[®] S100 solution on the freeze dried particles. The naringenin content in the particles was varied from 1.36 to 1.97 mg/100 mg. The Eudragit[®] S100 coating provoked a change in the surface charge of the particles from positive to negative values. Besides, the increase in the particle size was verified, suggesting that agglomerates of particles were coated by the Eudragit. Differential scanning calorimetry and the Fourier-transformed infrared spectroscopy studies

evidenced the interactions between the formulation components. The naringenin release in simulated gastric fluid varied from 8.27 to 11.98 % after 2 hours, confirming that gastro resistant microparticles were obtained. In simulated enteric fluid and simulated colonic fluid, naringenin release varied from 85 to 90.33% and from 97.63 and 101.83 %, respectively, after 4 hours. Naringenin release rate was statistically different in the three dissolution media, but it was not affected by lecithin to chitosan ratio in the formulations.

Key-words: Naringenin, ionic interaction technique, lecithin/chitosan nano and microparticles, enteric particles, inflammatory bowel disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. O paradigma tradicional da patogênese das DII.	36
Figura 1.2. Estrutura química monomérica do Eudragit® S100.	42
Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo de formação de nano- e micropartículas de lecitina (LC) e quitosana (QS) pelo método de interação iônica.	44
Figura 1.4. Estrutura química monomérica da quitosana.	46
Figura 1.5. Estrutura química da fosfatidilcolina.	48
Figura 1.6. Estrutura genérica dos flavonóides	49
Figura 1.7. Estrutura química da naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona).....	50
Figura 2.1. Cromatogramas da especificidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência. (A) solução de naringenina 4 µg/mL em metanol; (B) amostra S100-3/QS _{5kDa} branca; (C) amostra S45/QS _{50kDa} branca; (D) amostra S100-3/QS _{50kDa} branca com revestimento de Eudragit® S100. Condições cromatográficas: Coluna Luna C18 (250 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm); fase móvel: metanol:água 60:40 (pH 2,5); volume de injeção 20 µL; fluxo de 1 mL/min; detecção: 288 nm.....	71
Figura 2.2. Curva de calibração para a naringenina obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.	72
Figura 2.3. Gráficos de distribuição granulométrica para: (A) S100-3/QS _{50kDa} 10:1; (B) S45/QS _{5kDa} 5:1; (C) S100-3/QS _{5kDa} 5:1 e (D) S45/QS _{50kDa} 10:1.	84
Figura 2.4. Fotomicrografias obtidas por MET das partículas encapsulando naringenina (A1) e (A2) S100-3/QS _{5kDa} 20:1, (B1) e (B2) S100-3/QS _{50kDa} 10:1, (C1) e (C2) S45/QS _{5kDa} 5:1 e (D1) e (D2) S45/QS _{50kDa} 1:1.	88
Figura 2.5. TGA das quitosanas de 5 kDa (a) e 50 kDa (b)	90
Figura 2.6. Curvas de DSC 50 kDa e 5 kDa antes do resfriamento (a e c) e após resfriamento e re-aquecimento (b e d), respectivamente.....	90
Figura 2.7. Curvas de DSC obtidas a partir: lecitina S45 (a), lecitina S100-3 (b) e naringenina (c).....	91
Figura 2.8. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S100-3 e QS 50 kDa em diferentes proporções; 1:1 branca (a), 1:1 NAR (b), 5:1 NAR (c), 10:1 NAR (d) e 20:1 NAR (e).....	91
Figura 2.9. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S100-3 e QS 5 kDa; branca (a) e naringenina (b).....	91

Figura 2.10. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S45 e QS 5 kDa; branca (a) e naringenina (b).....	92
Figura 2.11. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S45 e QS 50 kDa; branca (a) e naringenina (b).....	92
Figura 2.13. Estrutura química da naringenina, fosfatidilcolina e quitosana e espectros de FIT-IR para: (A) Naringenina, (B) Quitosana 5kDa (C) Quitosana 50kDa (D) Lecitina S100-3, (E) Lecitina S45, (F) S100-3/QS _{5kDa} 1:1, (G) S100-3/QS _{50kDa} 1:1, (H) S45/QS _{5kDa} 1:1 (I) S45/QS _{50kDa} 1:1.....	94
Figura 2.14. Estrutura química do Vermelho de Nilo.....	95
Figura 2.14. Curva analítica do vermelho de Nilo.....	97
Figura 2.15. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com vermelho de Nilo livre: (A1) uma hora de incubação e (A2) duas horas de incubação.	100
Figura 2.16. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com (A1 e A2) S100-3/QS _{5kDa} 1:1; (B1 e B2) S100-3/QS _{5kDa} 5:1, (C1 e C2) S100-3/QS _{5kDa} 10:1 e (D1 e D2) S100-3/QS _{5kDa} 20:1.	101
Figura 2.17. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com (A1 e A2) S100-3/QS _{50kDa} 1:1; (B1 e B2) S100-3/QS _{50kDa} 5:1, (C1 e C2) S100-3/QS _{50kDa} 10:1 e (D1 e D2) S100-3/QS _{50kDa} 20:1.....	102
Figura 3.1. Gráficos de distribuição granulométrica para: (A) S100-3/QS _{50kDa} 1:1 entérica e (B) (C) S100-3/QS _{50kDa} 5:1 entérica.....	116
Figura 3.1. Fotomicrografias obtidas por MEV das partículas entéricas S45/QS _{50kDa} 20:1.....	117
Figura 3.3. Curvas de DSC obtidas para as matérias primas: (a) Lecitina S100-3, (b) Quitosana 50 kDa (c) Eudragit [®] S100 e (d) Naringenina.	118
Figura 3.4. Curvas de DSC obtidas para as micropartículas de lecitina e quitosana, revestidas com Eudragit S100; (a) S100-3/QS _{50kDa} 1:1 (b) S100-3/QS _{50kDa} 5:1, (c) S100-3/QS _{50kDa} 10:1 e (d) S100-3/QS _{50kDa} 20:1.	119
Figura 3.6. Espectros de FIT-IR da (A) Naringenina, (B) Quitosana QS _{50kDa} , (C) Lecitina S100-3, (D) Eudragit [®] S100, (E) S100-3/QS _{50kDa} 10:1 revestida e (F) S100-3/QS _{50kDa} 20:1 revestida.	121
Figura 3.7. Curvas de calibração da naringenina obtidas após análises por CLAE. (a) fluido gástrico simulado pH 1,2 (FGS); (b) fluido intestinal simulado pH 6,8 (FIS); (c) fluido biorrelevante colônico (FaSSCoF).	122
Figura 3.8. Perfis de liberação de naringenina nos meios FGS pH 1,2 (0 – 2 horas) seguido de FIS pH 6,8 (2 – 6 horas) ◆ S100-3/QS _{50kDa} 1:1;	

■ S100-3/QS_{50kDa} 5:1; ■ S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e ▲ S100-3/QS_{50kDa} 20:1. 123

Figura 3.9. Perfis de liberação de naringenina no meio de dissolução FaSSCoF pH 7,8 para as partículas entéricas ■ S100-3/QS_{50kDa} 1:1;

■ S100-3/QS_{50kDa} 5:1; ■ S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e ▲ S100-3/QS_{50kDa} 20:1. 124

Figura 4.1. Localização de diagnóstico em pacientes com UC (A) e CD (B). Estes valores indicam a porcentagem de pacientes com envolvimento em cada segmento intestinal. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Composição da microflora gastrointestinal humana.	34
Tabela 2.1. Parâmetros de robustez avaliados na validação do método por cromatografia líquida, para análise da naringenina em nano- e micropartículas.....	62
Tabela 2.2. Características físico-químicas das quitosanas.....	70
Tabela 2.3. Valores das áreas dos picos da naringenina obtidas em diferentes concentrações.	72
Tabela 2.5. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão. .	75
Tabela 2.6. Variação do fluxo da fase móvel para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.	76
Tabela 2.7. Variação do comprimento de onda de detecção para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.....	76
Tabela 2.8. Variação do pH da fase móvel para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.	77
Tabela 2.9. Efeito da quantidade inicial de naringenina sobre o teor, recuperação e eficiência de encapsulação de fármaco nas partículas....	78
Tabela 2.10. Efeito da massa molar da quitosana, tipo de lecitina e proporção de lecitina/quitosana sobre o teor, recuperação e eficiência de encapsulação da naringenina nas partículas (n=3).	79
Tabela 2.11. Análise da variância do teor de naringenina nas nano- e micropartículas.....	80
Tabela 2.12. Efeito da massa molar da quitosana e da proporção de lecitina/quitosana no diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo 10 mg de naringenina.....	82
Tabela 2.13. Efeito da massa molar da quitosana e da proporção de lecitina/quitosana sobre o diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo 10 mg de naringenina.	83
Tabela 2.14. ANOVA do tamanho médio das nano- e micropartículas.	85
Tabela 2.15. Valores de potencial zeta para partículas contendo 10 mg de naringenina.....	87
Tabela 2.16. Valores de diâmetro, span e potencial zeta das partículas encapsulando o fluorocromo vermelho de Nilo destinadas aos estudos de captura celular.....	96
Tabela 2.17. Valores de intensidade de fluorescência para obtenção da curva analítica do fluorocromo Vermelho de Nilo.....	97
Tabela 2.18. Valores de intensidade de fluorescência e teor de vermelho de Nilo das micropartículas.....	98

Tabela 3.1. Valores de teor e eficiência de encapsulação das partículas entéricas.....	115
Tabela 3.2. Valores de diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta das micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com Eudragit® S100.....	116
Tabela 3.3. Resultados obtidos após análise da regressão das curvas de calibração da naringenina nos diferentes meios de dissolução.....	122
Tabela 3.4. Valores de eficiência de dissolução da naringenina obtidos a partir dos perfis de liberação do fármaco nos diferentes meios de dissolução.....	125
Tabela 3.5. ANOVA da eficiência de dissolução.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise da Variância
APCs – Células apresentadoras de antígenos
ASC – Área sob a curva
CD – Doença de Crohn
DII – Doenças Inflamatórias Intestinais
DMEM – Dulbecco's Modified Eagles's Medium
d.m.s – Diferença Mínima Significativa
DMSO - Dimetilsulfóxido
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
eNOS – Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
EAF – Epitélio Associado aos Folículos
EE % - Eficiência de Encapsulação %
ED % - Eficiência de Dissolução %
EPR – Efeito permeação e retenção aumentados
Eudragit® S100 – Copolímero do Ácido Metacrílico e Metil Metacrilato
FaSSCoF – Fluido Biorrelevante Colônico
FGS – Fluido Gástrico Simulado
FIS – Fluido Entérico Simulado
FIT-IR – Infravermelho com transformada de Fourier
GL – Graus de Liberdade
ICH – International Conference on Harmonisation
IL-10 – Interleucina-10
iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzida
LC – Lecitina
LC/QS – Proporção lecitina/quitosana
LD – Limite de Detecção
LQ – Limite de Quantificação
MDA – Dialdeído Malônico
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MM – Massa Molar
NO – Óxido Nítrico
nNOS – Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
PBS – Tampão Fosfato
QS – Quitosana
QS 5kDa – Quitosana oligossacarídeo
QS 50kDa – Quitosana 50 – 190 kDa

QS 190kDa – Quitosana 190 – 310 kDa
QS 310kDa – Quitosana > 310 kDa
SQ – Soma dos Quadrados
S100-3 – Lecitina 100 % de fosfatidilcolina
S45 – Lecitina 45 % de fosfatidilcolina
T_{ef} – Células T efectoras
T_{reg} – Células T regulatórias
TGA – Análise Termogravimétrica
TGF- β – Fator de crescimento β
TGI – Trato Gastrointestinal
UC – Colite Ulcerativa
VN – Vermelho de Nilo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
OBJETIVOS	28
GERAL	29
ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	31
1.1 Cólon.....	33
1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)	34
1.2.2 Colite Ulcerativa	38
1.2.3 Tratamento Convencional das DII	39
1.3 Liberação Colônica	39
1.4 Nano- e micropartículas para liberação colônica	42
1.4.3 Lecitinas.....	48
1.5 Flavonóides.....	48
1.5.1 Naringenina.....	49
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANO- E MICROESTRUTURADOS À BASE DE COMPLEXOS DE LECITINA E QUITOSANA CONTENDO NARINGENINA.....	53
2.1 Introdução	55
2.2 Materiais	57
2.2.1 Matérias-primas	57
2.2.2 Solventes, soluções e reagentes.....	57
2.2.3 Equipamentos.....	57
2.3 Metodologia	59
2.3.1 Preparação dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de lecitina e quitosana.....	59
2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naringenina nas nano- e micropartículas.....	59
2.3.3 Caracterização físico-química das nano- e micropartículas	63
2.3.4 Estudos de captura celular.....	64
2.3.5 Análise Estatística.....	66
2.4 Resultados e Discussão	69
2.4.1 Preparação dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de quitosana e lecitina.....	69
2.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naringenina nas nano e micropartículas.....	70
2.4.4 Estudos de captura pelos macrófagos	95

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE LECITINA E QUITOSANA REVESTIDAS COM POLÍMERO ENTÉRICO	103
3.1 Introdução	105
3.2 Materiais.....	107
3.2.1 Matérias-primas.....	107
3.2.2 Solventes, soluções e reagentes.....	107
3.2.3 Equipamentos.....	107
3.3 Metodologia	109
3.3.1 Preparação das micropartículas de quitosana e lecitina revestidas com Eudragit® S100.....	109
3.3.2 Determinação do teor de naringenina nas micropartículas revestidas com Eudragit® S100	109
3.3.3 Caracterização físico-química das nano e micropartículas.....	109
3.4. Resultados e Discussão	115
3.4.1 Preparação e caracterização das micropartículas de quitosana e lecitina revestidas Eudragit® S100	115
4.3.3 Avaliação morfológica das partículas entéricas	117
4.3.5 Espectroscopia de absorção no Infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR)	119
3.4 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da naringenina.....	122
DISCUSSÃO GERAL	127
CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

INTRODUÇÃO GERAL

A administração de fármacos por via oral é a forma mais empregada, por ser de fácil acesso e conveniente para o paciente. Por

esta via, os fármacos contidos nas formas farmacêuticas convencionais são dissolvidos e absorvidos ao longo do trato gastrointestinal (TGI) para a circulação sistêmica, sendo ambos os processos de dissolução e absorção grandemente dependentes das características físico-químicas dos mesmos. Entretanto, a utilização de formas farmacêuticas convencionais pela via oral é limitada em condições em que o fármaco necessita ser protegido do ambiente hostil do TGI ou quando a liberação localizada do mesmo é necessária, como por exemplo, a administração colônica de fármacos. O cólon é vulnerável a inúmeras desordens inflamatórias incluindo colites ulcerativas (UC) e a doença de Crohn (CD) (CHOURASIA & JAIN, 2003; KUMAR & MISHRA, 2008). Tais condições inflamatórias predisõem os pacientes ao desenvolvimento de câncer colorretal. Embora a etiologia das doenças inflamatórias colônicas não seja bem conhecida, fatores imunológicos, genéticos e ambientais parecem exercer um importante papel no desenvolvimento das mesmas (GEIER, BUTLER e HOWARTH, 2007).

O tratamento convencional das doenças inflamatórias do intestino requer a freqüente administração de fármacos anti-inflamatórios em altas dosagens, os quais são absorvidos pelo intestino delgado, provocando efeitos adversos significantes. Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para evitar estes problemas, como o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de liberação diretamente no cólon. Formulações colônicas são geralmente formas farmacêuticas de liberação retardada, as quais podem ser delineadas de modo a fornecer a completa liberação do fármaco ou permitir o prolongamento da liberação, após o alcance da forma farmacêutica no cólon. O sucesso da liberação colônica requer, portanto, a proteção do fármaco no estômago e intestino delgado. As estratégias para a liberação colônica se baseiam nas seguintes propriedades do TGI: (i) tempo de trânsito da forma farmacêutica ao longo do TGI, (ii) diferenças das condições fisiológicas nas diferentes regiões do TGI, (iii) especificidade das enzimas bacterianas localizadas no cólon, (iv) especificidade do cólon a certas substâncias que são usadas como ligantes em sistemas vetorizáveis. Assim, sistemas para liberação colônica podem classificados em pH-dependentes (ou liberação retardada), tempo-dependentes, enzimaticamente controláveis e pressão luminal-dependentes (SINGH, 2007).

O fator fisiológico mais comumente empregado no delineamento de formulações de liberação colônica é o gradiente de pH ao longo do TGI. Os sistemas pH-dependentes exploram o aspecto de

que o pH é ácido no estômago (pH 1 – 2 com aumento para 4 durante a digestão) e aumenta progressivamente a partir do duodeno (pH $6,6 \pm 0,5$) até o íleo terminal (pH $7,4 \pm 0,4$), diminui no ceco (pH $6,4 \pm 0,4$) e aumenta lentamente a partir do cólon direito para o esquerdo até atingir um valor final de $7,0 \pm 0,7$. O revestimento entérico pH-sensível das formulações promove um retardo na liberação e protege o fármaco do fluido gástrico. Os polímeros utilizados para liberação colônica devem, portanto, ser capazes de resistir aos valores de pH mais baixos do estômago e da porção proximal do intestino delgado e possuírem capacidade de desintegração no pH neutro ou ligeiramente alcalino do íleo terminal e, preferencialmente, na junção íleo-cecal. Os polímeros mais comumente empregados são os derivados do ácido acrílico e da celulose, especialmente os copolímeros do ácido metacrílico que dissolvem em valores de pH maior que 7,0. (CHOURASIA & JAIN, 2003; SINGH, 2007). O Eudragit[®] S100 é um polímero gastrorresistente amplamente utilizado como polímero de revestimento entérico para administração colônica. Trata-se de um copolímero aniônico formado pelo ácido metacrílico e metilmetacrilato (razão 1:2), insolúvel em ácidos e solúvel em pH acima de 7,0, sendo ideal para a liberação íleo-colônica de fármacos. O Eudragit[®] S100 ioniza-se nas condições de pH elevado do intestino delgado, dissolvendo-se no local e permitindo a liberação do fármaco (RAFFIN et al, 2006; LIU & BASIT, 2010).

O revestimento de esferas, cápsulas e comprimidos tem sido empregado como estratégia para liberação de fármacos no cólon. Entretanto, a eficiência destas formas farmacêuticas é frequentemente diminuída devido à ocorrência de diarreia, um sintoma comum das doenças inflamatórias intestinais que provoca a eliminação da forma farmacêutica e reduz o tempo para a liberação do fármaco. Por outro lado, carreadores nanoestruturados ($< 1 \mu\text{m}$) e microestruturados ($< 200 \mu\text{m}$) permitem liberar o fármaco em regiões inflamadas, mesmo por períodos prolongados, sem provocar diarreia (WATTS et al., 1992). Na colite existe uma intensa resposta imune celular na região inflamada, com conseqüente aumento do número de neutrófilos, células “natural killer”, mastócitos, e células T regulatórias. Visto que nano- e micropartículas podem ser capturadas por macrófagos, espera-se que a captura das partículas pelas células imunes contribua para o aumento do tempo de residência da forma farmacêutica. Além disso, a destruição da matriz extracelular do tecido inflamado no lado apical do epitélio e a alteração na organização da função barreira, causada principalmente pela destruição das junções oclusivas, aumentam consideravelmente a

permeabilidade do tecido inflamado, ocasionando o maior extravasamento de nanopartículas nestes tecidos (VASIR, REDDY & LABHASETWAR, 2005). Assim, ambos os fatores podem contribuir para o acúmulo das partículas e liberação do fármaco diretamente no tecido a ser tratado.

Uma vasta gama de materiais, como polímeros naturais e sintéticos, lipídeos, surfactantes e dendrímeros, têm sido empregados como carreadores de fármacos. Dentre eles, os polissacarídeos têm recebido uma maior atenção devido a suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas (LIU et al., 2008). A quitosana, um aminopolissacarídeo linear composto de unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina randomicamente distribuídas, é obtida pela deacetilação da quitina, um polissacarídeo amplamente encontrado no exoesqueleto de crustáceos como camarões e caranguejos (KUMAR et al., 2004). As quitosanas diferem no seu grau de deacetilação (40 – 98%) e na sua massa molar (50.000 – 2.000.000 Da), sendo estas duas características muito importantes para as propriedades físico-químicas das quitosanas e possuem um efeito crucial nas propriedades biológicas. A quitosana é uma base fraca com valor de pKa do resíduo de D-glucosamina de cerca de 6,2 – 7,0, e, desta maneira, é insolúvel em pHs neutro e alcalino. Em meio ácido, os grupos amino do polímero são protonados resultando em um polissacarídeo solúvel, positivamente carregado e com uma alta densidade de carga. Este polímero catiônico é utilizado para aplicações farmacêuticas e biomédicas, devido a sua abundante disponibilidade, mucoadesividade única, propriedades farmacológicas inerentes, e outras propriedades biológicas benéficas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade (PARK et al., 2010). Além das propriedades bioadesivas que permitem a interação com a mucosa ao longo do TGI, a quitosana é degradada pela microflora presente no intestino, tornando-se assim um material promissor para a liberação controlada de fármacos no cólon (TOZAKI et al., 1997; HEJAZI & AMIJI, 2003).

Os flavonóides constituem uma família de compostos polifenólicos naturais que representam uma das classes mais prevalentes em legumes, nozes, frutas e bebidas como café, chá e vinho tinto, assim como em ervas medicinais. As classes de flavonóides incluem as chalconas, flavonas, flavanonas, flavanols, antocianinas e isoflavonas (MOON et al., 2005). A naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) é uma flavanona amplamente distribuída nas frutas cítricas, tomate, cereja, toranja e no cacau. A naringenina apresenta reconhecida atividade

antioxidante a qual é atribuída a sua relação estrutura-atividade. O número de hidroxilas permite que a naringenina doe hidrogênios às espécies reativas de oxigênio, permitindo adquirir uma estrutura estável e, portanto, sendo capaz de seqüestrar estes radicais livres. Em adição, a naringenina tem sido investigada quanto as suas propriedades farmacológicas, incluindo antitumoral, antiinflamatória e hepatoprotetora. Estudos *in vivo* realizados em modelo de colite induzida pela dextrana sulfato de sódio em camundongos mostraram que a naringenina reduz significativamente o edema intestinal, sugerindo atividade antiinflamatória neste modelo. O mecanismo pelo qual a naringenina influencia o processo inflamatório se dá através do seu efeito na supressão e na atividade da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (AMARO et al., 2009).

Por outro lado, um fator importante que influencia a efetividade dos polifenóis com os parâmetros celulares é a sua biodisponibilidade. Estudos mostram que a biodisponibilidade da naringenina após administração oral em coelhos é de apenas 4% (YEN et al., 2009). Esta baixa biodisponibilidade é decorrente em parte à sua solubilidade aquosa extremamente baixa. Além disso, muitos estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos são extensivamente metabolizados *in vivo* pela microflora colônica, durante sua passagem pelo intestino, e pelo fígado, resultando na alteração significativa das espécies encontradas na circulação sistêmica. Assim, a utilização deste composto na terapêutica e em especial no tratamento de doenças do cólon necessita da sua incorporação em sistemas de liberação gastrorresistentes.

Desta maneira, considerando o exposto acima, esse trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas nano- e microestruturados visando a liberação colônica da naringenina. Nesse trabalho, o desenvolvimento de nano- e micropartículas pela técnica de interação iônica entre a quitosana e lecitina, e o revestimento das partículas com Eudragit® S100, são descritos. Diferentes componentes de formulação são testados e as características finais das partículas, bem como a capacidade das diferentes formulações em retardar a liberação da naringenina, são avaliadas e comparadas.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver sistemas nano- e microestruturados constituídos de complexos de lecitina/quitosana revestidos com polímero entérico para a liberação colônica da naringenina.

ESPECÍFICOS

- Preparar nano- e micropartículas a base de complexos de lecitina/quitosana contendo naringenina, utilizando a técnica de interação iônica;
- Preparar nano- e micropartículas revestidas com polímero gastrorresistente para liberação colônica;
- Desenvolver e validar metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da naringenina nas nano e micropartículas;
- Caracterizar as nano- e micropartículas não revestidas e entéricas quanto ao tamanho, morfologia, eficiência de encapsulação e teor de naringenina;
- Avaliar o efeito da massa molar da quitosana e do tipo de lecitina sobre as características finais das partículas;
- Preparar e caracterizar nano- e micropartículas contendo o marcador fluorescente vermelho de Nilo e avaliar a captura das partículas em cultura de células de macrófagos murinos J774;
- Avaliar o estado físico do fármaco e as interações entre os componentes das nano- e micropartículas por calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia de infravermelho;
- Avaliar os perfis de liberação da naringenina *in vitro* a partir das partículas entéricas em meios simulado gástrico, simulado intestinal e biorrelevante colônico;
- Comparar os resultados obtidos com as diferentes formulações no que se refere às características físico-químicas finais das partículas e a capacidade de retardar a liberação da naringenina.

O trabalho mostra-se dividido em capítulos para melhor leitura e compreensão. O primeiro capítulo corresponde à revisão da literatura, o segundo capítulo corresponde ao desenvolvimento e caracterização de

sistemas nano- e microestruturados constituídos de complexos de lecitina e quitosana contendo naringenina e o terceiro capítulo corresponde ao desenvolvimento e caracterização de micropartículas revestidas com polímero entérico.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Cólon

O cólon humano representa a porção final do trato gastrointestinal. É um órgão constituído pelo cólon ascendente (ou cólon direito), colón transverso, cólon descendente (ou cólon esquerdo) e o cólon sigmóide, ao qual se encontra ligado ao reto e ânus. Nos adultos, este órgão apresenta um comprimento de 1,5 m, 6,5 cm de diâmetro e uma área total de 0,3 m². A parede do cólon é formada por quatro camadas. Da mais externa para a mais interna designam respectivamente, por camada serosa, muscular externa, submucosa e mucosa. A mucosa do cólon é composta pela mucosa muscular, a lâmina própria e o epitélio. A lâmina própria possui grande quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos e de células sanguíneas (linfócitos e macrófagos) importantes na função imunológica do cólon.

A primeira porção do cólon, que compreende o ceco, cólon ascendente e parte do cólon transverso, caracteriza-se por um antiperistaltismo, pelo que o conteúdo fecal é retido por longos períodos de tempo, o que permite a absorção prolongada de água, eletrólitos e princípios ativos. Além disso, nesta porção o conteúdo intestinal não é tão viscoso, o que faz do cólon proximal o local preferencial de liberação de fármacos. A restante parte do cólon transverso e cólon descendente são caracterizados por movimentos peristálticos coordenados que forçam o conteúdo intestinal a fragmentar-se e progredir em direção à porção final do cólon. O cólon sigmóide e o reto armazenam as fezes e apresentam um arco reflexo de defecação e como tal esta zona é caracterizada por contrações musculares vigorosas (FREIRE et al., 2006).

O cólon também é caracterizado pela existência de um elevado número de microorganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos. Existem cerca de 400 espécies identificadas correspondendo de 10¹¹ – 10¹² microorganismos por grama de conteúdo intestinal. A microflora é composta predominantemente de *Bacteroides fecalis* e *Bifidobacteria*, enquanto os lactobacilos anaeróbios, enterobactérias e *Clostridium* são menos significativos (Tabela 1.1). Em condições fisiológicas normais, estas bactérias não se encontram no estômago, devido aos baixos valores de pH, mas a sua concentração aumenta ao longo do intestino delgado e sua expressão máxima ocorre em torno na válvula ileocecal. No cólon o crescimento dos microorganismos é máximo nas regiões proximais, devido à maior concentração de fontes energéticas (VANDAMME et al., 2002; YANG, CHU, FIX, 2002).

Tabela 1.1 Composição da microflora gastrointestinal humana.Adaptado de Van Der Mooter and Kinget, 1994 *apud* Freire et al., 2006.

	Estômago	Jejuno	Íleo	Fezes
Número total de bactérias	$0-10^3$	$0-10^5$	10^3-10^7	$10^{10}-10^{12}$
Enterobacteria	$0-10^2$	$0-10^3$	10^2-10^6	10^4-10^{10}
Streptococcus	$0-10^3$	$0-10^4$	10^2-10^6	10^5-10^{10}
Staphylococcus	$0-10^2$	$0-10^3$	10^2-10^5	10^4-10^7
Lactobacilos	$0-10^3$	$0-10^4$	10^2-10^5	10^6-10^{10}
Fungos	$0-10^2$	$0-10^2$	10^2-10^3	10^2-10^6
Bacteroides	Raro	$0-10^2$	10^3-10^7	$10^{10}-10^{12}$
Bifidobacteria	Raro	$1-10^3$	10^3-10^5	10^8-10^{12}
Cocos gram-positivos	Raro	$0-10^3$	10^2-10^5	10^8-10^{11}
Clostridia	Raro	Raro	10^2-10^4	10^6-10^{11}
Eubacteria	Raro	Raro	Raro	10^9-10^{12}

A flora colônica e suas fontes nutricionais permanecem qualitativamente similares de um indivíduo para outro, porém podem mudar quantitativamente. Diferentes fatores influenciam a microflora intestinal, como o oxigênio, o qual é limitante para o crescimento da microflora colônica, idade, doenças gastrointestinais, administração de medicamentos e fermentação de resíduos alimentares (VANDAMME, et al, 2002).

1.2 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

O cólon é vulnerável a inúmeras desordens inflamatórias incluindo a colite ulcerativa (UC) e a doença de Crohn (CD). Estas desordens caracterizam-se por uma inflamação crônica e descontrolada da mucosa intestinal e possuem algumas similaridades entre si tais como seu curso remitente e recorrente, suas naturezas inflamatórias e suas causas não totalmente elucidadas. Todavia, a UC e a CD são claramente distintas devido a suas características clínico-patológicas, incluindo as diferentes localizações no trato gastrointestinal, padrões histológicos de inflamação, e várias complicações específicas de cada patologia (CHOURASIA e JAIN, 2003; BAMIAS et al., 2005; KUMAR e MISHRA, 2008).

Como a maioria das doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, acredita-se que ambas as formas de DII resultem de interações de fatores genéticos, imunes e ambientais. Estas interações contribuem

para a inflamação intestinal crônica em indivíduos geneticamente susceptíveis. (GEIER et al., 2006; SARTOR, 2006). Estudos epidemiológicos e familiares demonstram que fatores genéticos possuem uma grande importância na susceptibilidade as DII. As DII são, entretanto, patologias geneticamente complexas e não fundamentadas em modelo de genes isolados. Acredita-se que a UC e CD sejam desordens poligênicas heterogêneas que possuem em comum alguns, porém não todos, *loci* suscetíveis. Mais provavelmente, o fenótipo da patologia seja determinado por diversos fatores, incluindo a interação entre variantes alélicas, bem como influências genéticas e ambientais. Conseqüentemente, a presença de genes mutantes não garante que a DII se desenvolverá, ou preverá quais indivíduos irão desenvolvê-la, salientando a importância dos cofatores no progresso da patologia (SATSANGI et al., 2003; HANAUER, 2006).

A microbiota comensal possui uma grande importância no desenvolvimento e na progressão das DII e acredita-se que um dos fatores essenciais para a patogênese seja a resposta imune elevada do hospedeiro a esta microbiota. Outros fatores imunológicos que possuem papéis importantes no reconhecimento do antígeno incluem a superatividade dos linfócitos efetores e citocinas pró-inflamatórias, falha nos linfócitos regulatórios e citocinas anti-inflamatórias em controlar a inflamação e a resistência das células T a apoptose (THOMPSON-CHAGOYAN et al., 2005; BAMIAS et al., 2005).

O que diferencia as DII da resposta inflamatória observada no intestino normal é a incapacidade de suprimir as respostas do sistema imune (Figura 1.1). A apresentação de antígeno intraluminal aos linfócitos da mucosa pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) dá origem às respostas de células efectoras. No intestino normal (*esquerda*), a inflamação é prevenida através do controle da ativação das células T efectoras (T_{ef}) de mucosa através de dois mecanismos distintos: Primeiro, as sub-populações de células T regulatórias (T_{reg}) no sistema imune da mucosa suprimem a atividade da célula T efectora, em parte através da produção de interleucina-10 (IL-10) e do fator de crescimento de transformação β (TGF- β). Segundo, o controle também ocorre pela eliminação da T_{ef} através da apoptose, e, desta maneira, previne a super-expressão indesejável. Em indivíduos com DII, ambos os mecanismos regulatórios parecem estar defeituosos (*direita*). Desta maneira, em indivíduos saudáveis, o intestino torna-se inflamado em resposta a um patógeno em potencial, e então, retorna ao estado normal uma vez que o patógeno é erradicado do local. Em indivíduos com DII, entretanto, a

inflamação não é suprimida, o sistema imune da mucosa permanece constantemente ativado, e desta maneira, o intestino permanece cronicamente inflamado (SARTOR, 2004; HANAUER, 2006).

As DII possuem maior prevalência em países mais desenvolvidos. As regiões com melhor saneamento básico e melhor qualidade de vida tornam os indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento de DII. Tem sido proposto que a exposição a condições não higiênicas aprimora o ambiente intestinal, levando ao desenvolvimento e regulação ideal da resposta imune mucosa, prevenindo respostas inflamatórias futuras (SHANAHAN, 2004).

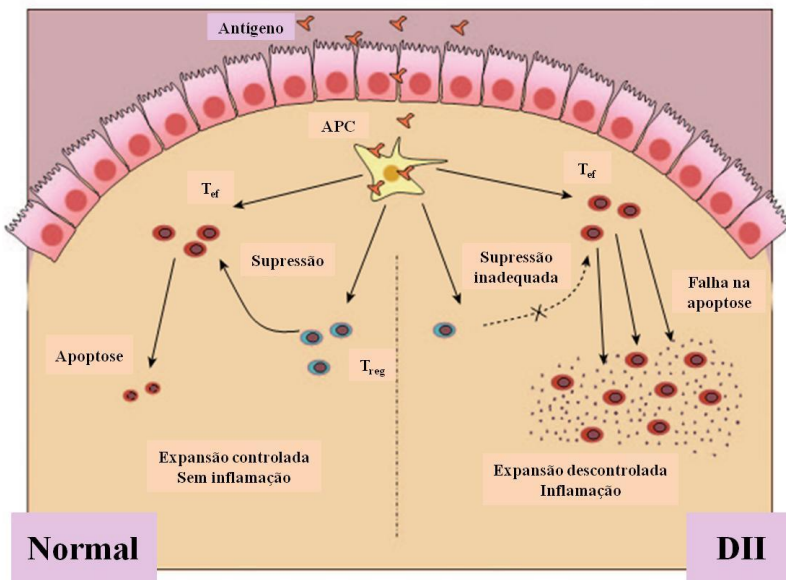


Figura 1.1. O paradigma tradicional da patogênese das DII.

Fonte: Adaptado de BAMIAS et al., 2005.

1.2.1 Doença de Crohn

A doença de Crohn é uma patologia inflamatória da mucosa gastrointestinal que pode afetar todo o trato gastrointestinal desde a orofaringe até a área perianal. Quando plenamente desenvolvida, a CD caracteriza-se patologicamente por um envolvimento bem delimitado e tipicamente transmural do intestino, por um processo inflamatório com

lesão da mucosa, presença de granulomas não-caseosos e formação de fissuras e fístulas (BAUMGART & SANDBORN, 2007).

A Doença de Crohn ocorre no mundo inteiro, mas principalmente nas populações do Ocidente desenvolvido. Sua incidência anual nos Estados Unidos é de aproximadamente 3 por 100.000 habitantes. Ocorre em qualquer idade, desde o início da infância à idade avançada, mas as idades de detecção máxima são a segunda e a terceira décadas, com um pico menor na sexta e sétima décadas. As mulheres são afetadas de modo mais leve do que os homens. Os brancos parecem apresentar a doença com uma frequência duas a cinco vezes maior do que os não-brancos (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

As manifestações da CD são extremamente variáveis. Em geral, a doença inicia com episódios intermitentes de diarreia, relativamente leve, febre e dor abdominal, espaçados por períodos assintomáticos que duram semanas a meses.

A atividade da doença é tipicamente descrita como branda a moderada (pacientes ambulatoriais capazes de tolerar alimentação oral sem manifestações de desidratação, toxicidade, desconforto abdominal, presença de massa dolorosa, obstrução ou mais de 10% de perda de peso), doença moderada à severa (falha na resposta ao tratamento para doença branda, sintomas mais proeminentes incluem febre, perda de peso, dor ou desconforto abdominal, náusea intermitente e vômito sem obstrução, ou anemia significativa) e doença severa à fulminante (sintomas persistentes com corticosteróides, febres altas, vômito persistente, evidência de obstrução intestinal, desconforto rebote, caquexia ou evidência de abscesso) (BAUMGART & SANDBORN, 2007).

Durante a doença crônica prolongada, complicações podem surgir dos estreitamentos fibrosantes, sobretudo no íleo terminal, e fístulas para outras alças do intestino, bexiga urinária, vagina ou pele perianal, ou para um abscesso peritoneal. O envolvimento extenso do intestino delgado, incluindo o íleo terminal, pode gerar perda acentuada de albumina, diminuição da absorção generalizada, com má absorção específica de vitamina B₁₂, ou má absorção de sais biliares, levando a esteatorréia (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

1.2.2 Colite Ulcerativa

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória não-transmural restrita ao cólon. Dependendo da extensão anatômica de envolvimento, a doença pode ser classificada em diferentes tipos: proctite ulcerativa, quando acomete apenas a porção distal do cólon e reto; colite limitada ou distal, referente àquela no cólon descendente, e pancolite, quando a doença envolve todo o cólon (HEAD & JURENKA, 2003).

A colite ulcerativa possui uma distribuição global, e sua incidência varia em relação à CD, sustentando o conceito de que são doenças distintas. Nos Estados Unidos, a incidência é de aproximadamente 4 a 12 por 100.000 habitantes. Assim como na doença de Crohn, a incidência da colite ulcerativa aumentou nas últimas décadas. A doença é mais comum entre brancos do que em negros, e as mulheres são mais afetadas que os homens e o início da doença ocorre entre 20 e 25 anos de idade (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

A UC apresenta-se tipicamente como um distúrbio recorrente caracterizado por episódios de diarreia que podem persistir por dias, semanas ou meses, cedendo depois e só recorrendo após um intervalo assintomático de meses e anos, ou até mesmo décadas. A diarreia (frequentemente noturna e pós-prandial) é caracterizada pela presença de sangue, pus, muco ou ambos, sangramento retal e dor abdominal e cólica baixa, geralmente aliviadas pela defecação. Em pacientes com doença limitada (apenas o envolvimento do cólon sigmóide e do reto), os sintomas são de irritação retal, denominados tenesmo (sensação de esvaziamento incompleto), diarreia de pequeno volume, constipação proximal e predominância de sangramento retal. Em contraste, na colite extensiva (além da curvatura esplênica), diarreia profusa com sangue, cólicas abdominais e características sistêmicas como perda de peso, febre e taquicardia são mais proeminentes (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000; BAUMGART & SANDBORN, 2007; HO et al., 2007).

A atividade da doença é descrita como branda (quatro evacuações com sangue diárias e nenhuma toxicidade sistêmica), moderada (de quatro a seis evacuações com sangue diárias e toxicidade mínima), ou severa (mais de seis evacuações com sangue diárias e sinais de toxicidade, como febre, taquicardia, anemia, taxa de sedimentação eritrocitária aumentada). Pacientes com colite ulcerativa fulminante usualmente apresentam mais de dez evacuações diárias, sangramento contínuo, anemia necessitando de transfusão sanguínea, desconforto

abdominal, e dilatação colônica em radiografia plena do abdômen (CARTER et al., 2004; KORNBLUTH & SACHAR, 2004).

1.2.3 Tratamento Convencional das DII

A terapia convencional para o tratamento das DII inclui a administração de altas dosagens de fármacos anti-inflamatórios e corticosteróides, como a megalasina, sulfasalazina, prednisona, prednisolona, hidrocortizona, dentre outros, por via oral durante um período prolongado e em muitas ocasiões vitalício, devido à cronicidade destas doenças. Porém, a administração oral na maioria dos casos, resulta na absorção do fármaco pelo intestino delgado e obtenção de um efeito sistêmico, sendo que apenas uma fração do composto ativo atinge a mucosa inflamada do intestino. Além disso, a absorção pelo intestino delgado é considerada responsável pela severidade dos efeitos adversos, como a toxicidade gastrointestinal, incluindo danos à mucosa na forma de erosões e úlceras, e sangramento na porção superior do TGI, intestino delgado e cólon. Por estas razões, o delineamento de sistemas nano- e microestruturados gastrorresistentes que garantem a liberação localizada do composto ativo no sítio da inflamação tem sido proposto (XU, MENG, PAN, 2004; MEISSNER & LAMPRECHT, 2007; KLEIN & ELIAKIM, 2010).

1.3 Liberação Colônica

Até recentemente, o cólon era considerado apenas como um local de reabsorção de água e fermentação de carboidratos residuais. Atualmente, o cólon é considerado um local ativo de absorção de fármacos (SINHA, KUMRIA, 2001; VAN DER BILJ & EYK, 2003). A liberação colônica de fármacos após administração oral é promissora para o tratamento de doenças do cólon, como a colite ulcerativa, doença de Crohn, carcinomas e infecções. No tratamento destas patologias, altas concentrações do fármaco no local de ação podem ser alcançadas, com a minimização dos efeitos adversos que ocorrem quando o fármaco é liberado no TGI superior ou absorvido sistemicamente. Outro foco de grande interesse do cólon como sítio de liberação de fármacos é o aumento da biodisponibilidade de moléculas fracamente absorvidas. A região colônica é reconhecida por ser um ambiente menos hostil do que o estômago e o intestino delgado, além de proporcionar um maior tempo

de retenção da forma farmacêutica e ser altamente responsivo aos promotores de absorção (CHOURASIA & JAIN, 2003).

Devido às vantagens acima descritas, recentemente, um grande número de formulações tem sido desenvolvidas para a liberação de fármacos nas porções inferiores do TGI, especialmente no cólon. Estas formulações podem ser divididas em quatro tipos: (I) sistemas tempo-dependentes; (II) sistemas microflora-dependentes; (III) sistemas pressão-dependente; e (IV) sistemas pH-dependentes.

Os sistemas tempo-dependentes são utilizados tanto para a liberação sincronizada de um fármaco em tempos predeterminados após o paciente ter recebido o medicamento, quanto para a liberação em sítios pré-selecionados do TGI. Sistemas tempo-dependentes para liberação colônica são também formulações de liberação retardada. Nestes sistemas, o sítio de liberação do fármaco é determinado pelo tempo de trânsito da forma farmacêutica no TGI, o que torna o desenvolvimento um desafio para a obtenção de uma liberação precisa no cólon. Os sistemas microflora-dependentes baseiam-se na atividade enzimática específica da microflora (enterobactérias) presente no cólon. As bactérias colônicas são predominantemente anaeróbicas e secretam enzimas que são capazes de metabolizar substratos como carboidratos e proteínas que escapam da digestão no TGI superior. Os mecanismos mais comuns de ativação microbiana no cólon são a azo-redução e a hidrólise de ligações glicosídicas. Os sistemas pressão-dependentes envolvem a atividade contrátil do estômago e os movimentos peristálticos para a propulsão do conteúdo intestinal. No intestino grosso, o conteúdo é movimentado de uma parte para a próxima, do cólon ascendente para o cólon transversal por movimentos peristálticos potentes. Estas fortes ondas peristálticas no cólon são de menor duração, ocorrendo apenas 3 ou 4 vezes ao dia. Entretanto, essas ondas aumentam temporariamente no cólon, formando a base para o desenvolvimento de sistemas de liberação pressão-dependentes (BASIT, BLOOR, 2003; SINGH, 2007).

O fator fisiológico mais comum e utilizado para o desenvolvimento deste trabalho é o gradiente de pH ao longo do TGI. Os sistemas pH-dependentes exploram o aspecto geral de que o pH do TGI humano aumenta progressivamente do estômago (pH 1 – 2, com aumento para 4 durante a digestão) para o duodeno (pH $6,6 \pm 0,5$), até o íleo terminal (pH $7,0 \pm 0,4$). No ceco ocorre um decréscimo (pH $6,4 \pm 0,4$), e então um pequeno aumento do cólon direito para o esquerdo com um valor final de pH de $7,0 \pm 0,7$. Formulações sólidas para a liberação colônica que são baseadas em mecanismos de liberação dependente do pH

são similares às formulações entéricas convencionais, mas diferem no sítio alvo para liberação e, portanto, no tipo de polímero entérico (CHOURASIA & JAIN, 2003; SINGH, 2007).

Os maiores obstáculos para a liberação colônica de fármacos são as vias de absorção e de degradação do trato gastrointestinal superior. Para isso, o revestimento da forma farmacêutica com polímeros pH-sensíveis se faz necessário, visando promover a liberação retardada do fármaco, bem como sua proteção contra o fluido gástrico. Neste sentido, os polímeros utilizados para liberação colônica devem ser capazes de resistir aos baixos valores de pH encontrados no estômago e na porção proximal do intestino delgado, além de serem capazes de desintegrar-se em pH neutro a ligeiramente alcalino, no íleo terminal e preferivelmente na junção íleo-cecal. Este processo distribui o fármaco por todo o intestino grosso e melhora o potencial para sistemas de liberação colônica. Portanto, polímeros entéricos para esse propósito devem apresentar um limiar de pH para a dissolução relativamente mais elevados (CHOURASIA & JAIN, 2003; SINGH, 2007; PARK et al., 2009).

Os revestimentos entéricos são amplamente utilizados em formas farmacêuticas com o objetivo de retardar a liberação do fármaco no estômago e permitir a liberação no intestino delgado. Existem três principais razões para o uso dessas formas farmacêuticas revestidas: (1) prevenção da degradação de substâncias ativas no ambiente ácido do estômago, (2) proteção do estômago contra fármacos potencialmente irritantes e, (3) alcance de sítios específicos de liberação no intestino para o tratamento de doenças locais. Os revestimentos mais utilizados empregam polímeros pH-dependentes, os quais contêm grupamentos carboxílicos. Estes grupamentos permanecem não-ionizados no pH ácido do estômago e tornam-se ionizados nas condições de pH elevado do intestino delgado, permitindo desta maneira, a dissolução do revestimento e liberação do fármaco (LIU & BASIT, 2010).

Os Eudragits tem sido extensivamente utilizados como polímeros pH-sensíveis, para o revestimento entérico de formas farmacêuticas e também como veículo para liberação de fármacos. O Eudragit[®] S100 (Figura 1.2) é composto de ácido metacrílico e metilmetacrilato (razão 1:2, MM aproximadamente 135 kDa) e possui um comportamento único de dissolução acima de pH 7,0, tornando-se um candidato atrativo para uso em sistemas de liberação colônica de fármacos. Este copolímero possui a capacidade de mudar sua estrutura frente a mudanças de pH e liberar o fármaco no local desejado, além de ser biocompatível (VIJAY, SATI, MAJUMDAR, 2010; YOO, GIRI, LEE, 2011).

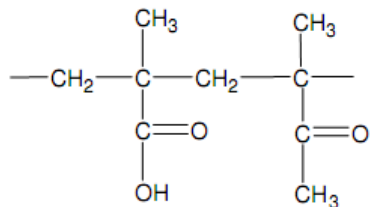


Figura 1.2. Estrutura química monomérica do Eudragit® S100.

Fonte: www.evonik.com.br

1.4 Nano- e micropartículas para liberação colônica

As nano- (10 – 1.000 nm) e micropartículas (1 – 1.000 µm) são definidas como sendo sistemas matriciais sólidos capazes de dissolver, encapsular ou adsorver fármacos na sua matriz, dependendo do método de obtenção. Estes sistemas têm recebido maior atenção nos últimos anos devido a suas inúmeras vantagens, como o controle da liberação, proteção do fármaco frente à degradação pelos componentes do meio biológico e durante o armazenamento e a melhora da eficácia terapêutica. A utilização desses sistemas permite ainda que a liberação do fármaco ocorra diretamente no sítio de ação, através da escolha da formulação e de combinações de fármaco-polímero adequadas (SOPPIMATH et al., 2000; SINHA et al., 2004; MORA-HUERTAS, FESSI, ELAISSARI, 2009).

Para a preparação de sistemas nano- e microestruturados poliméricos, a escolha dos polímeros deve preencher alguns requisitos: devem ser biodegradáveis ou totalmente eliminados num curto período de tempo, permitindo administrações repetidas sem quaisquer riscos de acúmulo descontrolado; devem ser atóxicos e não imunogênicos e devem ser escolhidos levando-se em consideração o sítio de liberação desejado (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2008).

Em especial para liberação colônica, os sistemas nano- e microestruturados de tamanhos inferiores a 200 µm não são sujeitos à rápida evacuação do intestino, uma vez que a diarreia é uma condição constante em pacientes com UC e CD. Para formas farmacêuticas convencionais este fato promove um decréscimo no tempo de residência da forma farmacêutica no sítio de ação e por consequência a eficiência do tratamento também é diminuída. Diferentemente, sistemas nano- e microestruturados de tamanho reduzido tem se tornado opções promissoras no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação

direta no cólon para o tratamento de doenças locais. Desta maneira, o desenvolvimento de sistemas carreadores que liberam o fármaco especificamente e exclusivamente no tecido inflamado são os sistemas mais desejáveis (WATTS et al., 1992; RODRÍGUEZ, VILA-JATO, TORRES, 1998; LAMPRECHT, SCHAFER, LEHR, 2001).

1.4.1 Obtenção de sistemas de liberação nano- e microestruturados pela técnica de interação iônica

Os diferentes métodos de preparo de nano- e micropartículas permitem produzir sistemas com propriedades adequadas para garantir a liberação apropriada e localizada do fármaco. Graças ao progresso na química de polímeros e na físico-química de polímeros coloidais, é possível preparar sistemas nano- e microestruturados com uma vasta gama de propriedades sob condições controladas (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2008).

Diversas técnicas de preparo têm sido propostas para o desenvolvimento de sistemas nano- e microestruturados dentre elas a técnica de interação iônica tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao fato de ser um processo simples e fácil de ser realizado. A força motriz para a formação das nano- e micropartículas envolve interações eletrostáticas entre polieletrólitos de cargas opostas ou forças intermoleculares não-covalentes como pontes de hidrogênio, força de van der Waals ou transferência de dipolo. Além de ser um processo que poupa energia, ele assegura que o fármaco encapsulado nas nano- e micropartículas seja protegido da inativação devido à ausência de estresse físico e químico durante a fabricação (CHUAH et al., 2009; AMIDI et al., 2010).

Várias substâncias podem ser empregadas para formação de nano- e micropartículas via interação iônica. A quitosana é o polímero mais empregado para esta finalidade, pois a carga positiva do grupamento $-NH_2$ é capaz de ligar-se à iônica a polianions como o alginato de cálcio, tripolifosfato e as lecitinas, sendo estas últimas escolhidas para o desenvolvimento dos sistemas neste trabalho (Figura 1.3) (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004; SONVICO et al., 2006; MLADENOVSKA et al., 2007).

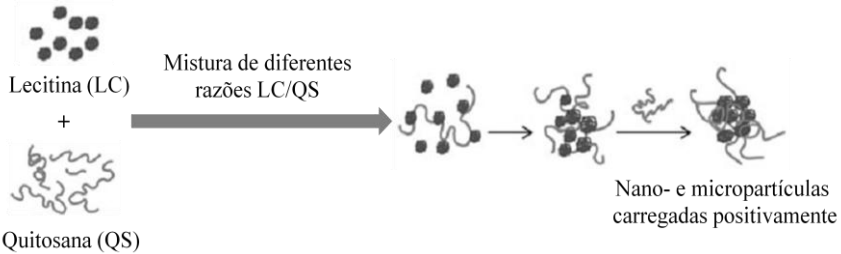


Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo de formação de nano- e micropartículas de lecitina (LC) e quitosana (QS) pelo método de interação iônica. Fonte: Adaptado de Chuah et al., 2009.

Sonvico *et al.* (2006) desenvolveram nanopartículas pela técnica de interação iônica utilizando 7 diferentes tipos de quitosana (grau de deacetação entre 92-99 % e viscosidade entre 8-715 cP) e lecitina S45 (Lipoid S45) para a encapsulação da progesterona. Diferentes proporções de lecitina/quitosana foram utilizadas variando de 5:1 até 80:1. Foram obtidas partículas coloidais com carga superficial positiva (40 mV); diâmetros inferiores a 280 nm e índice de polidispersão abaixo de 0,2. Foram testadas diferentes concentrações de progesterona, de 2, 5, 10, 13, 15 e 20 mg/mL. Nas concentrações de 2, 5 e 10 mg de fármaco em 100 mL de suspensão, a eficiência de encapsulação foi maximizada (cerca de 60 %) e o teor de fármaco aumentou alcançando valores de cerca de 3,5 %. Nas maiores concentrações de progesterona uma alta variabilidade nos resultados foi obtida com o aumento progressivo na quantidade de fármaco precipitado durante a produção das nanopartículas. A quantidade total de progesterona precipitada, progesterona dissolvida e progesterona encapsulada nas nanopartículas foi de $99,3 \pm 5,8$ % do total de fármaco utilizado no preparado das amostras. O rendimento geral das nanopartículas encapsulando a progesterona foi de 59 ± 11 %.

Hafner *et al.* (2009) sintetizaram nanopartículas utilizando a quitosana na forma de sal e lecitinas de soja S45, S75 e S100 (Lipoid S45, Lipoid S75 e Lipoid S100) para a encapsulação da melatonina. As proporções de lecitina/quitosana utilizadas foram de 5:1, 10:1 e 20:1. O tamanho e o potencial zeta aumentaram com o aumento da concentração de quitosana e da carga negativa das lecitinas utilizadas nas formulações, respectivamente. As partículas de lecitina/quitosana apresentaram tamanhos entre $121,6 \pm 2,8$ e $347,5 \pm 3,2$ nm. A eficiência de encapsulação das nanopartículas variaram de 26 a 38,2 % e o teor de 4,9 a 7,1 %. Os melhores valores de teor de fármaco foram obtidos com os sistemas compostos de lecitina S45.

Chuah *et al.* (2006) desenvolveram nanopartículas através da interação iônica entre lecitinas modificadas (lisofosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ácido fosfatídico) e quitosanas de baixa, média e alta massas molares. A albumina sérica bovina foi utilizada como fármaco modelo e as proporções de lecitina/quitosana testadas foram de 1:1 a 80:1. Nanopartículas de potencial zeta entre +29 e +59 mV e tamanhos entre 123 e 350 nm foram obtidas. A formação de estruturas maiores ocorreu com o aumento da massa molar de quitosana e sendo as partículas de menores dimensões, obtidas com quitosanas de massas molares inferiores, mais compactas e uniformes.

Senyigit *et al.* (2010) produziram partículas encapsulando o propionato de clobetasol pela interação iônica entre a lecitina S45 (Lipoid S45) e quitosana com grau de deacetilação de 95 % e viscosidade de 93 cP. A eficiência de encapsulação foi de $92,2 \pm 0,5$ % com um teor de cerca de 10,9 %. O tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão para as nanopartículas brancas foram de $246,6 \pm 12,57$ nm, $+34,75 \pm 1,12$ mV e $0,106 \pm 0,01$, respectivamente. Para as suspensões coloidais contendo o fármaco o diâmetro foi cerca de 250 nm e cargas altas e positivas devido a presença das cadeias de quitosana na superfície.

1.4.2 Quitosana

A quitosana é um polímero catiônico, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza após a celulose. É um aminopolissacarídeo linear composto de ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ de unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina randomicamente distribuídas (Figura 1.4). A forma de quitosana mais comumente encontrada é a α -quitosana proveniente da quitina encontrada em carapaças de caranguejos e camarões. No preparo da quitosana, as carapaças são desproteínas e desmineralizadas pelo tratamento seqüencial de álcali e ácido, após este processo a quitina extraída é deacetilada para quitosana por hidrólise alcalina em alta temperatura (GEORGE & ABRAHAM, 2006). A obtenção desta molécula ocorre através da reação de deacetilação parcial da quitina no seu estado sólido em condições alcalinas ou por hidrólise enzimática na presença de quitina deacetilase. Quando o grau de deacetilação da quitina alcança cerca de 50%, a molécula torna-se solúvel em meio ácido e passa a chamar-se quitosana. A palavra quitosana refere-se a um grande número

de polímeros, os quais diferem no seu grau de N-deacetilação (40-98%) e na massa molar (50 – 2.000 kDa). Estas duas características são muito importantes nas propriedades físico-químicas das quitosanas e conseqüentemente, possuem maiores efeitos nas propriedades biológicas.

A quitosana contém três tipos de grupos funcionais reativos, um grupamento amino/acetamido, bem como ambos os grupamentos hidroxil primários e secundários nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente. O conteúdo de grupos amino é a principal razão para as diferenças existentes entre as estruturas e propriedades físico-químicas das quitosanas, e está correlacionada aos processos de quelação, floculação e funções biológicas. A quitosana é uma base fraca com valor de pK_a para o resíduo de D-glucosamina de cerca de 6,2 – 7,0 e, desta maneira, é insolúvel em valores de pHs neutro e alcalino. A solubilização em meio ácido ocorre através da protonação dos grupamentos $-NH_2$ na posição C-2 do resíduo de D-glucosamina resultando em um polissacarídeo com alta densidade de carga positiva (uma carga para cada resíduo de D-glucosamina) (RINAUDO, 2006; JAYAKUMAR et al., 2010; XIA et al., 2010).

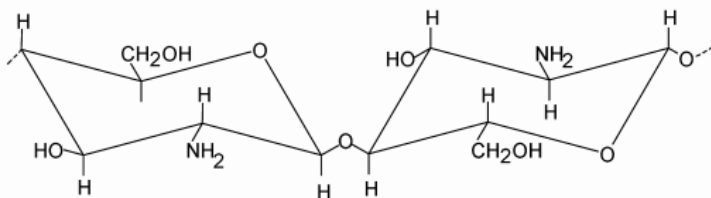


Figura 1.4. Estrutura química monomérica da quitosana.

Fonte: Hejazi & Amiji, 2003.

O maior componente da quitosana, a glucosamina, é uma substância natural produzida pelo corpo humano a partir da glicose e está envolvida na manufatura de glucosaminoglicano, o qual forma as cartilagens nos tecidos corporais; a glucosamina está também presente nos tendões e ligamentos. Sendo assim, a quitosana é biocompatível com os tecidos, e por este motivo não causa reações alérgicas e rejeição. A molécula quebra-se lentamente em produtos inofensivos, os quais são completamente absorvidos pelo corpo humano; degrada-se sob ação da fermentação e é facilmente removida do organismo sem ocasionar

efeitos adversos (HEZAJI & AMIJI, 2003; AGNIHOTRI et al., 2004; PARK et al., 2009; BALDRICK, 2010).

As propriedades mucoadesivas da quitosana têm sido ilustradas pela sua habilidade em aderir à mucosa gástrica porcina *in vitro*, e desta maneira ela torna-se interessante para a liberação de fármacos em locais específicos do trato gastrointestinal como o estômago, intestino delgado e também a mucosa bucal. Tem sido sugerido que o tempo de residência destas formas farmacêuticas no local de ação possa ser prolongado pelo uso da quitosana na formulação. A mucoadesividade da quitosana no seu estado intumescido mostra-se persistente durante o contato da quitosana com o substrato, o que implica que, além da adesão pelo processo de hidratação, diversos outros mecanismos, como as ligações de hidrogênio e as interações iônicas podem também estar envolvidas. Um importante mecanismo de ação sugerido são as interações iônicas entre os grupamentos amino carregados positivamente da quitosana e a camada de muco carregada negativamente (HE, DAVIS, ILLUM, 1998; GEORGE & ABRAHAM, 2006).

Tem sido relatado que a quitosana age como promotor através da abertura das junções oclusivas epiteliais, sendo capaz de aumentar a rota paracelular de absorção, a qual é importante para o transporte de compostos terapêuticos através da membrana. O mecanismo fundamental para este efeito promotor de absorção parece estar baseado nas cargas positivas do polímero, as quais interagem com a membrana celular resultando em uma reorganização das proteínas associadas às junções oclusivas. A quitosana possui certas vantagens em relação a outros promotores de absorção, principalmente pela sua propriedade mucoadesiva que permite um maior tempo de residência no local de absorção. Esta habilidade da quitosana em melhorar a absorção, foi demonstrada em células Caco-2, que funcionam como modelo de epitélio intestinal, bem como em experimentos *in vitro* em mucosas nasal, bucal, vaginal e de bexiga urinária de diferentes animais (DODANE, KHAN, MERWIN, 1999; RANALDI et al., 2002).

A quitosana exibe um comportamento pH-sensível como base fraca, devido a grande quantidade de grupamentos amino na sua estrutura. A quitosana se dissolve facilmente em baixo pH e é insolúvel em faixas maiores de pH. O mecanismo de intumescimento envolve a protonação dos grupos amino da quitosana sob condições de baixo pH. Esta protonação leva a repulsão da cadeia, difusão de prótons e contra-íons junto com a água no interior do gel e dissociação de interações secundárias. Esta propriedade auxilia na liberação de fármacos no

estômago e tem sido amplamente investigada como matriz para liberação de compostos ativos (GEORGE & ABRAHAM, 2006).

1.4.3 Lecitinas

As lecitinas são misturas de fosfolipídeos vegetais, principalmente a fosfatidilcolina (Figura 1.5), combinados com outras substâncias como triglicerídeos e ácidos graxos (SENYIGIT et al., 2010).

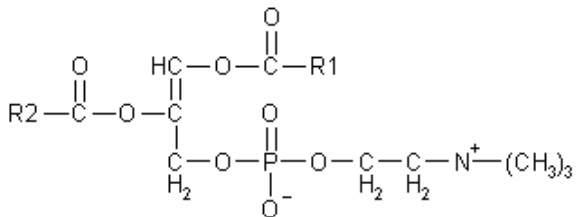


Figura 1.5. Estrutura química da fosfatidilcolina.

Fonte: www.bioq.unb.br

As lecitinas são componentes da membrana celular e desta maneira são consumidas como parte da dieta normal, sendo consideradas seguras e biocompatíveis. Em aplicações farmacêuticas as lecitinas têm sido utilizadas como agentes dispersantes, emulsificantes e estabilizantes, introduzidas em injetáveis intramusculares e intravenosos, formulações de nutrição parenteral, produtos tópicos, bem como em sistemas de liberação de fármacos (CUI, QIU, SLOAT, 2006; CHUAH et al., 2009).

1.5 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma família de compostos polifenólicos naturais e são constituintes normais da dieta humana devido a sua abundância em legumes, frutas, sementes e bebidas como o café, chá e vinho tinto, bem como em ervas medicinais.

Recentemente, os compostos polifenólicos têm recebido maior atenção devido a estudos demonstrando sua capacidade antioxidante e também devido à sua habilidade em modular uma série de vias moleculares, envolvidas principalmente na regulação da proliferação celular, função celular e reações inflamatórias. Suas possíveis aplicações benéficas à saúde humana têm sido amplamente estudadas, como para

prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, processos neurodegenerativos e diversas doenças crônicas envolvendo o fígado, intestino, rins e pulmões (CROFT, 1998).

Os flavonóides possuem uma estrutura química básica de difenil propanos, consistindo em dois anéis benzênicos ligados por uma cadeia linear de três carbonos ($C_6-C_3-C_6$). Na maioria dos casos, os três carbonos centrais formam um anel pirano fechado com um dos anéis benzênicos, formando, desta maneira, uma estrutura de 15 átomos de carbono organizados em três anéis, denominados A, B e C (Figura 1.6) (PIETTA, 2000).

Os flavonóides podem ser divididos em classes, baseadas na conexão do anel aromático ao anel heterocíclico, bem como o estado de oxidação e os grupos funcionais do anel heterocíclico. Dependendo das variações no anel heterocíclico C, os flavonóides são classificados em diferentes subtipos: flavonas (apigenina, luteolina, diosmetina), flavonols (quercetina, kaempferol), flavanonas (naringenina, hesperitina), flavanols (catequina, epicatequina, galato), isoflavonas (genisteína, daidzeína), antocianinas e antocianidinas (cianidina, delphinidina) (MOON et al., 2005; LEONARDUZZI et al., 2010).

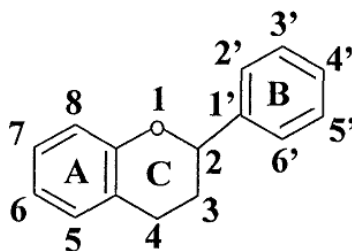


Figura 1.6. Estrutura genérica dos flavonóides

Fonte: Cook & Samman, 1996.

1.5.1 Naringenina

A naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) (Figura 1.7) é uma flavanona amplamente distribuída nas frutas cítricas, tomate, cereja, toranja e no cacau. A naringenina apresenta reconhecida atividade antioxidante a qual é atribuída a sua relação estrutura-atividade. O número de hidroxilas permite que a naringenina doe hidrogênios às espécies reativas de oxigênio, permitindo adquirir uma estrutura estável e, portanto, sendo capaz de sequestrar estes radicais livres. Em adição, a

naringenina tem sido investigada quanto as suas propriedades farmacológicas, incluindo antitumoral, hepatoprotetora e antiinflamatória. O mecanismo de ação antiinflamatória da naringenina está relacionado ao seu efeitos de inibição da expressão e na atividade da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (YEN et al., 2009; AMARO et al., 2009; MUELLER, HOBIGER, JUNGBAUER, 2010).

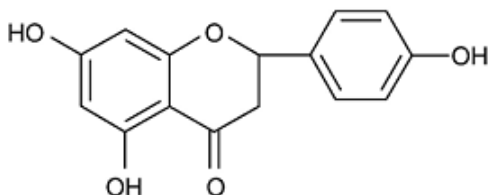


Figura 1.7. Estrutura química da naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona)

Fonte: Hirai et al., 2007.

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina por três óxido nítrico sintetases (NOS); a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), a óxido nítrico neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Níveis fisiológicos baixos de NO são produzidos pelas isoformas constitutivas eNOS e nNOS, enquanto a iNOS é responsável pela maior produção de NO. A produção de iNOS é induzida pelas citocinas inflamatórias nos macrófagos e em outras células, desta maneira tendo sua produção aumentada durante o processo inflamatório, possuindo efeitos pró inflamatórios (HAMALAINEN et al., 2007).

Amaro e colaboradores (2009) realizaram um estudo utilizando a naringenina imobilizada em materiais microestruturados visando avaliação da sua atividade antiinflamatória em modelo de colite ulcerativa em camundongos induzida por dextrana sulfato de sódio. Após a coleta das amostras, quatro sinais de inflamação foram medidos: massa seca e úmida do intestino, níveis de nitrato/nitrito, níveis de dialdeído malônico (MDA) e integridade do epitélio intestinal. Os resultados do estudo mostraram através da diminuição da massa de água, nos modelos tratados com naringenina, que este composto reduz significativamente o edema intestinal. Para a medida nos níveis de nitrato/nitrito, foi demonstrado também que nas amostras coletadas a naringenina foi capaz de reduzir os níveis de NO, sendo que esta diminuição atribuída provavelmente a inibição do mecanismo da enzima iNOS.

De acordo com Burda e Oleszek (2001), os flavonóides são conhecidos como sequestradores de espécies reativas de oxigênio devido a sua atuação como doadores de oxigênio. Os seus grupamentos fenólicos atuam como uma fonte de átomos de hidrogênio, pronta para ser capturada por radicais livres. Neste sentido, a naringenina possui atividade antiinflamatória nos casos onde existe a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (as quais em colite ulcerativa são demonstradas pelo acréscimo nos níveis de dialdeído malônico, um marcador de peroxidação lipídica), devido a estas duas moléculas apresentarem uma ótima atividade antioxidante. No estudo realizado por Amaro e colaboradores (2009), os grupos tratados com naringenina apresentaram uma redução nos níveis de MDA, conseqüentemente um decréscimo na peroxidação lipídica e dano tecidual, demonstrando sua ação antioxidante e antiinflamatória.

Assim, o aproveitamento deste composto na terapêutica e em especial no tratamento de doenças do cólon necessita da sua incorporação em sistemas de liberação gastrorresistentes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho consiste em desenvolver sistemas nano- e microestruturados a base de complexos de quitosana/lecitina revestidos com polímero entérico para a liberação colônica da naringenina.

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS NANO- E MICROESTRUTURADOS À BASE DE COMPLEXOS DE LECITINA E QUITOSANA CONTENDO NARINGENINA

2.1 Introdução

Na administração sistêmica, para que o fármaco alcance o sítio de ação, é necessária sua passagem por diversas barreiras biológicas, como órgãos, células e compartimentos intracelulares, onde pode ser inativado ou exercer influências indesejáveis sob órgãos e tecidos não envolvidos no processo patológico. Como resultado, para alcançar a concentração terapêutica do fármaco num determinado local no organismo é necessário a administração de grandes quantidades, pois uma extensa parte dela é perdida em tecidos normais. A administração sítio específico apresenta soluções para estes problemas, pois possui a habilidade de acumular o fármaco no órgão ou tecido alvo seletivamente e quantitativamente, independente do sítio e dos métodos de administração. Idealmente, sob estas condições, a concentração local do fármaco no sítio de ação deve ser alta, enquanto sua concentração em órgãos e tecidos não-alvo deve ser abaixo do nível mínimo para que haja a prevenção de quaisquer efeitos adversos (TORCHILIN, 2000).

No caso das doenças inflamatórias intestinais a terapia convencional inclui a administração de altas dosagens de fármacos anti-inflamatórios e corticosteróides por via oral por um período prolongado. Esta administração oral leva a absorção do fármaco pelo intestino delgado e a uma ação sistêmica, sendo que apenas uma fração do composto ativo atinge a mucosa inflamada do intestino além de provocar efeitos adversos (XU, MENG, PAN, 2004; MEISSNER & LAMPRECHT, 2007; KLEIN & ELIAKIM, 2010). Através do delineamento de sistemas nano- e microestruturados gastrorresistentes, altas concentrações locais do fármaco podem ser alcançadas, com a minimização dos efeitos adversos e também tem sido propostos para melhorar a biodisponibilidade e eficácia de fármacos. O uso de carreadores permite a modificação das propriedades biofarmacêuticas do fármaco sem que ocorra modificação na sua estrutura molecular, sendo interessantes para administração de fármacos que apresentam problemas como: baixa solubilidade aquosa, toxicidade, problemas de estabilidade, baixa biodisponibilidade, dentre outros (CHOURASIA & JAIN, 2003; SONVICO et al, 2006; HAFNER et al., 2009).

A naringenina tem sido amplamente investigada devido as suas inúmeras atividades farmacológicas, incluindo a atividade antiinflamatória. Entretanto, a naringenina é insolúvel em água e este fato é responsável pela sua baixa biodisponibilidade, sendo este um fator limitante para a utilização da naringenina na clínica. Assim, o

aproveitamento deste composto na terapêutica e em especial no tratamento de doenças do cólon necessita da sua incorporação em sistemas de liberação nano- e microestruturados gastrorresistentes (YEN et al., 2009; AMARO et al., 2009).

Partículas compostas da interação iônica entre lecitina e quitosana tem sido propostas para o desenvolvimento de sistemas nano- e microestruturados e envolvem interações eletrostáticas entre estes dois compostos. A quitosana é um aminopolissacarídeo linear solúvel em ácido através da protonação dos grupamentos $-NH_2$ resultando num polissacarídeo com alta densidade de carga positiva. A quitosana é capaz de interagir com as lecitinas, que são misturas de fosfolipídeos vegetais, principalmente a fosfatidilcolina combinados com outras substâncias como triglicerídeos e ácidos graxos. Esta interação resulta na precipitação de nano- e micropartículas (RINAUDO, 2006; CHUAH et al., 2009; AMIDI, MASTROBATTISTA, JISKOOT, HENNINK, 2010; SENYIGIT et al., 2010).

Neste capítulo será descrito o desenvolvimento dos complexos de lecitina e quitosana encapsulando a naringenina bem como seu doseamento, caracterização físico-química e ensaios de captura celular.

2.2 Materiais

2.2.1 Matérias-primas

Estreptomicina GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA)
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
Lecitina de Soja 45% de fosfatidilcolina (Lipoid, Alemanha)
Lecitina de Soja 100% de fosfatidilcolina (Lipoid, Alemanha)
Naringenina 95% (Sigma Aldrich, Alemanha)
Penicilina GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA)
Quitosana de Alto Peso Molecular (Sigma Aldrich, Alemanha)
Quitosana de Baixo Peso Molecular (Sigma Aldrich, Alemanha)
Quitosana de Médio Peso Molecular (Sigma Aldrich, Alemanha)
Quitosana oligossacarídeo (Sigma Aldrich, Alemanha)
Vermelho de Nilo (Sigma Aldrich, Alemanha)

2.2.2 Solventes, soluções e reagentes

Acetato de Sódio Triidratado (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
Ácido Acético Glacial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
Ácido Fosfórico 85% P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)
Ácido Fosfotúngstico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
Álcool Etilico 96% (Synth, São Paulo, Brasil)
Álcool Metílico (JTBaker, EUA)
Dimetilsulfóxido (Synth, São Paulo, Brasil)
DMEM (Sigma Aldrich, Alemanha)
Hidróxido de Sódio (Cromoline, São Paulo, Brasil)
Soro Bovino Fetal GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA)
Tampão Fosfato pH 7,4 (Sigma Aldrich, Alemanha)
Tampão HEPES GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA)

2.2.3 Equipamentos

Agitador Magnético de 6 pontos (Dist, Brasil)
Analisador Termogravimétrico TGA-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão)
Balança Analítica Ohaus Corporation AS 2005 (Nova Jersey, EUA)
Bomba de Vácuo Fisatom (São Paulo, Brasil)
Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão)
Centrifuga Sigma 4K15

Citômetro de Fluxo BD FACSCanto™ II (BD Sciences, EUA)
Cromatógrafo Líquido LC-10A equipado com bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, detector SPD-10AV e sistema controlador SCL-10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japão)
Espectrofotômetro Infravermelho IRPrestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japão)
Evaporador Rotatório Marconi (São Paulo, Brasil)
Fluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Japão)
Granulômetro a Laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido)
Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido)
Microscópio Eletrônico de Transmissão 100 KV JEOL JEM-1011 (Tóquio, Japão)
Microscópio de Fluorescência Olympus BX41 (Nova Iorque, EUA)
Minicentrífuga para Eppendorf Ministar
Zetasizer Nano ZS Nanoseries (Malvern Instruments, Reino Unido)

2.3 Metodologia

2.3.1 Preparação dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de lecitina e quitosana

As nano- e micropartículas foram preparadas utilizando a técnica de interação iônica descrita por Hafner *et al.* (2009). Brevemente, a lecitina de soja (Lipoid S100-3 ou S45) foi solubilizada em álcool etílico numa concentração de 2,5% (m/v). Separadamente, uma solução de quitosana 1% (m/v) foi preparada utilizando uma solução de ácido acético 1% (v/v) ou água destilada (v/v) como solvente. As nano- e micropartículas foram formadas espontaneamente por meio da adição de 4 mL da solução de lecitina, sob agitação magnética, em 46 mL de solução de quitosana diluída em água destilada, de modo a obter proporções de lecitina/quitosana de 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1. Após a formação das partículas, o pH da suspensão foi ajustado para valores entre 4,5-5,0. As suspensões foram então submetidas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume final para 20 mL e, em seguida, filtradas através de filtro quantitativo de 8 µm. Para obtenção das nano- e micropartículas encapsulando o fármaco, a naringenina (5, 10, 15 e 20 mg) foi previamente dissolvida à solução etanólica de lecitina. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

As variáveis de formulação estudadas foram: a massa molar de quitosana, tipo de lecitina, proporção de lecitina/quitosana e quantidade inicial de naringenina.

2.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naringenina nas nano- e micropartículas

2.3.2.1 Desenvolvimento e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-10AD, degaseificador DGU-14A, detector SPD-10AV (ajustado em 288 nm) e sistema controlador SCL-10Avp. Os experimentos foram executados em coluna de fase reversa Phenomenex (Torrance, CA) Luna C18 (250 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm). O sistema foi operado isocraticamente à 25°C utilizando uma fase móvel constituída de metanol-água (60:40 v/v),

ajustada para pH 2,5 com ácido fosfórico e filtrada em membrana filtrante 0,45 µm. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software CLASS-VP.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado em amostras de suspensões de partículas brancas e contendo naringenina para os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH 2005).

2.3.2.1.1 Especificidade

A avaliação da especificidade do método foi realizada através da análise dos sistemas nano- e microestruturados isentos de naringenina, comparando-se com a resposta produzida por uma solução contendo somente o fármaco. Para o método ser considerado específico nenhum dos demais componentes presentes nas formulações (quitosanas, lecitinas e Eudragit® S100) deve eluir no tempo de retenção do fármaco (SHABIR, 2003).

2.3.2.1.2 Linearidade e intervalo

As curvas padrão foram construídas em triplicata, em dias diferentes, através de diluições adequadas de uma solução metanólica estoque de naringenina na concentração de 1 mg/mL, em fase móvel, para obter soluções com as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 12,0; e 15,0 µg/mL. Gráficos das áreas absolutas versus concentrações foram plotados, e obteve-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, pelo método dos mínimos quadrados. O método é considerado linear se o coeficiente de correlação for >0,999 (SHABIR, 2003).

2.3.2.1.3 Limites de Detecção de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas seguintes equações, respectivamente:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad \text{e} \quad LD = \frac{DP_a \times 10}{IC} ,$$

Onde:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y das três curvas de calibração

IC = inclinação da curva de calibração.

2.3.2.1.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pelos ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi examinada através seis avaliações de cada amostra, no mesmo dia, sob as mesmas condições. A precisão intermediária foi acessada analisando as amostras em triplicata, em três dias diferentes e por três analistas diferentes. Para ambos os ensaios adicionou-se uma alíquota de solução metanólica estoque de naringenina, na concentração de 10 µg/mL, nas amostras isentas de fármaco (S100-3/QS_{5KDa} 1:1, S100-3/QS_{50KDa} 1:1, S45/QS_{5KDa} 1:1 e S45/QS_{50KDa} 1:1), de modo a obter concentração final de 5 µg/mL. O método é considerado preciso para valores de DPR ≤ 5,0 % (BRASIL, 2003).

2.3.2.1.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela adição de quantidades conhecidas de naringenina nas amostras brancas (S100-3/QS_{5KDa} 1:1, S100-3/QS_{50KDa} 1:1, S45/QS_{5KDa} 1:1 e S45/QS_{50KDa} 1:1) contendo 2,5 µg/mL do fármaco. Para cada amostra a solução estoque de naringenina foi adequadamente diluída para a obtenção de soluções finais nas concentrações de 4,0, 5,0 e 6,0 µg/mL equivalentes a 80, 100 e 120% da concentração de trabalho, respectivamente. A exatidão foi calculada como a porcentagem de fármaco recuperada em cada amostra, sendo o método considerado exato com valores de recuperação entre 90 e 110 %.

2.3.2.1.6 Robustez

O ensaio de robustez foi realizado pelo método da adição de padrão, onde as amostras brancas (S100-3/QS_{5KDa} 1:1, S100-3/QS_{50KDa} 1:1, S45/QS_{5KDa} 1:1 e S100-3/QS_{50KDa} 1:1) foram contaminadas com uma solução estoque de 10 µg/mL de naringenina, de modo que a concentração final de fármaco foi de 5 µg/mL. Estas amostras foram

submetidas à análise alterando-se os parâmetros representados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Parâmetros de robustez avaliados na validação do método por cromatografia líquida, para análise da naringenina em nano- e micropartículas.

Parâmetro	Nível Inferior	Nível Superior
Fluxo (mL/min)	0,9	1,1
Comprimento de onda (nm)	286	290
pH fase móvel	2,4	2,6

Os resultados foram avaliados quanto ao teor de fármaco encontrado, tempo de retenção e simetria dos picos.

2.3.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE %) e teor de fármaco

Para determinação da concentração total de naringenina, uma alíquota de 200 μ L das suspensões de nano- e micropartículas foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol. As amostras foram mantidas sob agitação magnética em temperatura ambiente durante 2 horas e, em seguida, foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados em membrana de 0,45 μ m e analisadas conforme descrito no item 2.3.2.1.

A concentração de naringenina no sobrenadante foi determinada após separação das partículas por procedimento de ultrafiltração/centrifugação, usando unidades Microcon[®] com membrana Ultracel YM-100 (100.000 NMWL, Millipore, EUA). Cerca de 500 μ L de suspensão de partículas foram adicionadas nas unidades de filtração, centrifugadas por 30 minutos a 6.200 rpm e o filtrado analisado conforme descrito no item 2.3.2.1.

A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de fármaco e a concentração de fármaco no sobrenadante e o teor de fármaco foi expresso em μ g de naringenina/mL de suspensão.

2.3.3 Caracterização físico-química das nano- e micropartículas

2.3.3.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinadas por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha de um laser HeNe. As amostras foram dispersas em tampão acetato pH 4,5 com auxílio de ultrassom e a configuração de análise pela teoria de Mie foi adotada, usando de índice de refração de 1,59 para todas as amostras analisadas e índice de obscuração entre 10 e 13 %. Os resultados foram expressos como diâmetro médio (d_{4,3}) e diâmetro do volume equivalente a 10 % (d_{10%}), 50 % (d_{50%}) e 90 % (d_{90%}) do volume acumulado. As análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nano- e micropartículas foi determinado por anemometria laser-Doppler utilizando um Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada das amostras em tampão acetato pH 4,5. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética usando a equação de Smoluchowski.

2.3.3.3 Avaliação morfológica das nano- e micropartículas

As suspensões de nano- e micropartículas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando um microscópio JEOL JEM - 1011 – 100 kV (Tóquio, Japão). Gotas das dispoções de nano- e micropartículas previamente diluídas em tampão acetato pH 4,5 foram depositadas em grids de cobre (200 mesh) revestidos com filme de carbono e corados com ácido fosfotúngstico e micrografias foram obtidas com aumentos entre 3.000 e 80.000 vezes.

2.3.3.4 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises termogravimétricas das quitosanas 5 kDa e 50 kDa foram realizadas em termobalança TGA-50 (Shimadzu) sob atmosfera

dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Cerca de 5 mg de amostra foram utilizadas na análise em cadinho de platina. A razão de aquecimento foi de 10 °C/min até 300 °C.

O comportamento térmico das nano- e micropartículas liofilizadas brancas e contendo naringenina e dos compostos puros (lecitinas, naringenina e Eudragit® S100) foram analisados por calorimetria exploratória diferencial utilizando um equipamento DSC-60 da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). Cerca de 2 mg das amostras foram pesados em panelas de alumínio, as quais foram lacradas e submetidas ao aquecimento até 300°C, numa razão de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Uma panela de alumínio vazia lacrada foi utilizada como referência. A análise das quitosanas foi realizada em dois ciclos. Primeiramente as amostras foram aquecidas até 200 °C numa razão de aquecimento de 10 °C/min, resfriadas e re-aquecidas até 300 °C numa razão de 10 °C/min.

2.3.3.5 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR) foram obtidos usando um equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão). Discos de brometo de potássio (KBr) contendo os compostos puros e as nano- e micropartículas liofilizadas foram preparados e as leituras das amostras foram efetuadas entre 4000 e 400 cm^{-1} .

2.3.4 Estudos de captura celular

2.3.4.1 Preparação e caracterização dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de quitosana e lecitina encapsulando o fluorocromo vermelho de Nilo.

As nano- e micropartículas foram preparadas utilizando a técnica de interação iônica descrita por Hafner *et al.* (2009). Brevemente, 4 mL de uma solução etanólica de lecitina de soja 2,5 % (m/v) (Lipoid S100-3) contendo 2 mg de vermelho de Nilo foram adicionados, sob agitação magnética, a 46 mL de solução de quitosana 5 kDa ou 50 kDa, previamente diluída em água de modo a obter proporções de lecitina/quitosana de 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1. Após a formação das partículas o pH da suspensão foi ajustado para valores entre 4,5 e 5,0. As suspensões obtidas foram submetidas à evaporação

sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e ajuste do volume final para 20 mL e filtradas em filtro quantitativo de 8 μm .

2.3.4.2 Determinação do teor de vermelho de Nilo (VN) nas partículas

O teor de vermelho de Nilo foi estimado após determinação do mesmo nas suspensões de micropartículas por espectrofotometria de fluorescência. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi F4500 equipado com célula termostatizada a 25 °C. Ambos os *slits* dos monocromadores foram ajustados a 10 nm e as leituras foram realizadas com comprimento de onda de excitação e emissão de 530 nm e 635 nm, respectivamente. (ALVAREZ-ROMAN et al., 2002).

Para a determinação da concentração total de VN, uma alíquota de 200 μL das suspensões de micropartículas foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 2 horas e em seguida, foram centrifugadas a 3.500 rpm. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados em membrana de 0,45 μm e analisados conforme condições descritas acima.

2.3.4.3 Linearidade do método

Para verificação da linearidade do método, uma solução metanólica de vermelho de Nilo 1,0 mg/mL foi diluída em metanol de modo a obter soluções nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,08; 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluções foram analisadas nas condições descritas acima, e, a partir destes resultados, curvas de concentração de VN versus intensidade de fluorescência foram construídas. As curvas foram analisadas estatisticamente pela análise da regressão linear usando o método dos mínimos quadrados.

2.3.4.4 Caracterização físico-química

2.3.4.4.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinados por difração a laser conforme descrito no item 3.3.1.

2.3.4.4.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nano- e micropartículas foi determinado por anemometria laser-Doppler conforme descrito no item 3.3.2.

2.3.4.3 Estudos de captura por macrófagos

A captura celular das micropartículas foi monitorada por microscopia de fluorescência após incubação das partículas com células de macrófagos murinos J774. Para isso, 500 µL da suspensão de macrófagos foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (cerca de 400.000 células/poço) contendo lamínulas de vidro e incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂, durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas com o meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) pH 7,4 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES. As células foram então incubadas com 200 µL das suspensões de micropartículas contendo VN ou com uma solução do marcador fluorescente livre (não encapsulado), durante 60 e 120 minutos, a 37 °C e sob atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após a incubação, o meio de cultura contido em cada poço foi removido e as células lavadas três vezes com tampão PBS. As lamínulas foram cuidadosamente retiradas da placa e fixadas em lâminas de vidro. A fluorescência associada às células foi avaliada utilizando um microscópio da marca Olympus modelo BX41 com epifluorescência no comprimento de onda de excitação de 530 nm e emissão de 635 nm. Imagens das células foram adquiridas no modo de emissão com objetiva de 40 X, usando o programa Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging.

2.3.5 Análise Estatística

O tamanho médio e o teor de naringenina nas nano- e micropartículas foram submetidos a uma análise estatística de ANOVA seguida do teste t de comparação entre as médias. O valor da diferença mínima significativa entre cada média foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$d.m.s. = t \sqrt{\left(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}\right) \times QMR}$$

onde:

QMR é o quadrado médio do resíduo da ANOVA;

n o número de repetições de cada um dos tratamentos;

t é o valor tabelado ao nível de significância escolhido ($p < 0,05$).

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Preparação dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de quitosana e lecitina.

Diversas técnicas de preparo têm sido propostas para o desenvolvimento de sistemas nano- e microestruturados, dentre elas a técnica de interação iônica. Esta técnica além de simples, evita os problemas associados à toxicidade do uso de materiais não-biocompatíveis, solventes orgânicos em grandes quantidades e tensoativos. A formação das partículas ocorre espontaneamente através das interações eletrostáticas dos polieletrólitos de cargas opostas sob condições moderadas, garantindo que o fármaco encapsulado seja protegido de estresses químicos e físicos durante o processo de fabricação (CHUAH et al., 2009; PARK et al., 2009).

Vários polímeros naturais podem ser empregados na formação de sistemas particulados pelo método de interação iônica. A quitosana foi utilizada como polímero catiônico, pois possui diversas características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, natureza não tóxica, mucoadesividade, seu efeito como promotor de absorção e sua sensibilidade ao pH, o que a torna interessante para o uso em sistemas de liberação colônica de fármacos. As lecitinas foram utilizadas como fosfolípídeos aniônicos, pois são consideradas seguras e biocompatíveis, sendo componentes estruturais da membrana celular (GEORGE & ABRAHAM, 2006; SENYIGIT et al., 2010).

A auto-organização supramolecular das nano- e micropartículas é conduzida pelo comportamento de agregação do componente lipídico e pela interação eletrostática entre a fração carregada negativamente do lipídio e a carga positiva do polissacarídeo (GERELLI et al., 2008).

Hafner *et al.* (2009) sintetizaram nanopartículas de lecitina S100, S75 e S45 encapsulando a melatonina. Foram obtidas partículas de carga superficial negativas, sendo estes valores crescentes da lecitina S100 (-12,4 mV) para a lecitina S45 (-33,3 mV), confirmando, assim, a característica aniônica dessas moléculas. O potencial zeta foi invertido de valores negativos para nanopartículas de lecitina para positivo para as nanopartículas de lecitina/quitosana, especialmente para aquelas preparadas com as lecitinas S75 e S45. Estas foram caracterizadas por um potencial zeta entre +18,1 e +32,7 mV.

Por meio desta técnica, são muitos os fatores que afetam as propriedades finais das partículas e a capacidade de associar fármacos.

Neste trabalho foram testadas quitosanas de diferentes massas molares o tipo de lecitina, a proporção de lecitina/quitosana nas formulações e a quantidade inicial de naringenina. As características físico-químicas das quitosanas estão apresentadas na Tabela 2.2. As lecitinas diferem entre si na sua composição. A lecitina S100-3 possui 100 % de fosfatidilcolina e a lecitina S45 possui 47,6 % de fosfatidilcolina, 16,4 % de fosfatidiletanolamina, 2,5 % de lisofosfatidilcolina, 15 % de ácido palmítico, 3 % de ácido esteárico, 12 % de ácido oléico e isômeros, 5 % de ácido linoléico, 0,1 % de triglicerídeos, 0,1 % de DL- α -tocoferol, 0,1 % de água e 0,6 % de etanol (GERELLI et al., 2008). O efeito desses fatores sobre o tamanho e distribuição granulométrica das partículas e sobre a encapsulação da naringenina foi avaliada.

Tabela 2.2. Características físico-químicas das quitosanas.

Quitosana	Massa Molar (kDa)	Viscosidade (cP) (1% quitosana em 1% ácido acético)	Grau de deacetilação (%)
Oligossacarídeo	5	-	> 90
Baixa Massa Molar	50 – 190	20 – 300	75-85
Médio Massa Molar	190 – 310	200 – 800	75-85
Elevada Massa Molar	>310	800 – 2000	>75

Fonte: www.sigmaaldrich.com.br

2.4.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naringenina nas nano e micropartículas

2.4.2.1 Desenvolvimento e validação da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência

Para obtenção das melhores condições cromatográficas, a fase móvel foi otimizada para obtenção de simetria do pico e sensibilidade adequada do método. O solvente orgânico escolhido foi o metanol, o qual foi testado em diferentes proporções, sendo 60:40 metanol/água a quantidade que resultou em melhor tempo de retenção e melhor simetria do pico. A fase móvel foi acidificada para pH 2,5 para suprimir a ionização dos grupamentos fenol da naringenina. Testes foram realizados com ácido acético e ácido fosfórico, sendo escolhido o segundo, pois promoveu melhor linha de base e melhor resolução dos cromatogramas.

As amostras utilizadas para a validação do método foram as partículas brancas constituídas de S100-3/QS_{5kDa} 1:1, S100-3/QS_{50kDa} 1:1, S45/QS_{5kDa} 1:1 e S45/QS_{50kDa} 1:1, pois estas formulações contêm as duas quitosanas (5 e 50 kDa) e das duas lecitinas (S100-3 e S45) utilizadas.

2.4.2.1.1 Especificidade

A especificidade é a habilidade do método em medir com exatidão a resposta do composto de interesse na presença dos demais componentes da amostra (ICH, 2005).

A figura 2.1 apresenta os cronogramas de especificidade, onde se pode observar que os componentes de formulação não interferiram no pico da naringenina, sendo o método considerado específico.

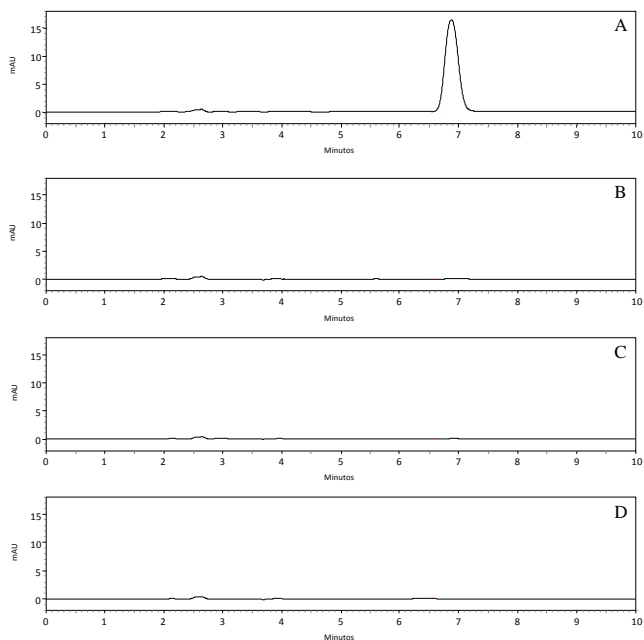


Figura 2.1. Cromatogramas da especificidade do método por cromatografia líquida de alta eficiência. (A) solução de naringenina 4 µg/mL em metanol; (B) amostra S100-3/QS_{5kDa} branca; (C) amostra S45/QS_{50kDa} branca; (D) amostra S100-3/QS_{50kDa} branca com revestimento de Eudragit[®] S100. Condições cromatográficas: Coluna Luna C18 (250 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm); fase móvel: metanol:água 60:40 (pH 2,5); volume de injeção 20 µL; fluxo de 1 mL/min; detecção: 288 nm.

2.4.2.1.2 Linearidade e intervalo

A linearidade é a capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais em uma determinada faixa de concentração do composto de interesse. O intervalo é a faixa entre os níveis superiores e inferiores do analito que são determinados com precisão, exatidão e linearidade utilizando o método desenvolvido. O ICH especifica um mínimo de cinco níveis de concentração, em um intervalo de 80 a 120% da concentração alvo (ICH, 2005; SHABIR, 2005).

As áreas absolutas relativas a cada concentração de naringenina estão apresentadas Tabela 2.3. A curvas foram consideradas lineares no intervalo de 0,1-15,0 µg/mL, com coeficiente de correlação $r = 0,999$. A equação da reta, obtida pelo método dos mínimos quadrados, corresponde a $y = 78950x - 12702$; onde x é a concentração de naringenina e y é a área absoluta do pico (Figura 2.2).

Tabela 2.3. Valores das áreas dos picos da naringenina obtidas em diferentes concentrações.

		Concentração de naringenina (µg/mL) e áreas								
Curva	0,1	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	10,0	12,0	15,0	
1	7437	36699	76468	217493	371079	521432	762155	925906	1194063	
2	7265	35591	74924	214939	373505	526331	756787	934166	1202609	
3	7400	36722	77388	213460	366476	518712	765587	925761	1201898	
Média	7367	36337	76260	215297	370353	522158	761510	928611	1199523	
DP	91	646	1245	2949	3579	3861	4435	4811	4742	
DPR	1,23	1,78	1,63	0,95	0,96	0,74	0,58	0,52	0,40	

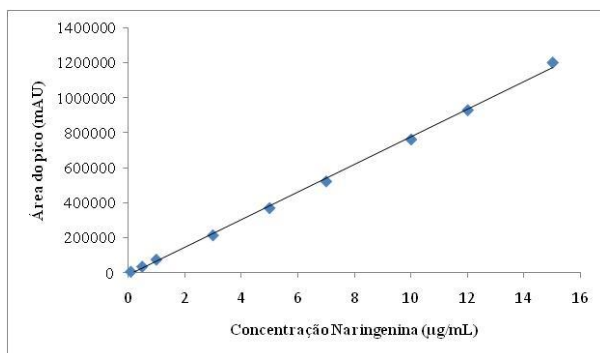


Figura 2.2. Curva de calibração para a naringenina obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.4.2.1.3 Limites de Detecção de Quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005). O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade do fármaco em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005).

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ), a equação da reta da naringenina foi gerada usando os valores de inclinação e intercepto da média dos três gráficos de calibração. A média da inclinação da reta e o desvio padrão das curvas foram de 78950,33 e 1211,94, respectivamente. Os valores calculados para LD e LQ, através das equações descritas no item 3.2.1.3, foram de 0,046 e 0,15 µg/mL, respectivamente.

2.4.2.1.4 Precisão

A precisão é a medida do grau de repetibilidade do método analítico sob condições normais de operação e é expresso como desvio padrão relativo (DPR) para um número estatisticamente significativo de amostras.

A precisão foi avaliada através do ensaio de repetibilidade, onde o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado após seis análises consecutivas das amostras brancas (S100-3/QS_{5kDa} 1:1, S100-3/QS_{50kDa} 1:1, S45/QS_{5kDa} 1:1 e S45/QS_{50kDa} 1:1) contaminadas com quantidade conhecida de fármaco, no mesmo dia e sob as mesmas condições cromatográficas. Os valores de DPR obtidos foram 0,66%, 0,75%, 0,64% e 0,54%, respectivamente.

A precisão intermediária foi analisada em quatro amostras de nano- e micropartículas brancas (S100-3/QS_{5kDa} 1:1, S100-3/QS_{50kDa} 1:1, S45/QS_{5kDa} 1:1 e S45/QS_{50kDa} 1:1), em três diferentes dias (inter-dias), sendo os valores de DPR 0,55%, 0,78%, 1,39% e 0,85%, respectivamente. A precisão inter-analistas foi determinada calculando o DPR para cada amostra por três analistas diferentes, sendo os valores de DPR 0,65%, 0,51%, 0,68% e 1,36%, respectivamente (Tabela 2.4). O método foi considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos foram ≤ 5,0 %.

Tabela 2.4. Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intermediária.

Amostra	Inter-Dias			Inter-Analistas		
	Dia	Rec.* (%)	DPR ⁺ %	Analista	Rec. (%)	DPR %
S100-3/QS _{5kDa} 1:1	1	99,87	0,55	A	94,78	0,65
	2	99,61		B	95,14	
	3	98,81		C	93,92	
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	1	97,63	0,78	A	94,16	0,51
	2	96,31		B	95,13	
	3	96,30		C	94,73	
S45/QS _{5kDa} 1:1	1	103,21	1,39	A	94,90	0,68
	2	103,08		B	95,11	
	3	100,67		C	96,12	
S45/QS _{50kDa} 1:1	1	101,83	0,85	A	97,39	1,36
	2	101,53		B	95,89	
	3	100,20		C	94,78	

*Rec = Recuperação; média da triplicata; ⁺DPR% = desvio padrão relativo.

2.4.2.1.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados nas amostras em análise e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005).

A exatidão foi determinada através de análises em triplicata de três soluções padrão diferentes contendo 1,5, 2,5 e 3,5 µg/mL de naringenina adicionadas às amostras brancas (S100-3/QS_{5kDa} 1:1, S100-3/QS_{50kDa} 1:1, S45/QS_{5kDa} 1:1 e S45/QS_{50kDa} 1:1). Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.5, onde se pode observar valores de exatidão entre 95,68 – 102,68% e DPR entre 0,08 – 1,64%, sendo o método considerado exato para a faixa de aplicação.

Tabela 2.5. Valores experimentais obtidos na avaliação da exatidão.

Amostra	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média obtida* (µg/mL)	DPR % ⁺	Exatidão (%)
S100-3/QS _{5kDa}	1,5	1,45	0,23	96,67
	2,5	2,39	0,14	95,68
	3,5	3,41	1,31	97,30
S100-3/QS _{50kDa}	1,5	1,54	0,81	102,68
	2,5	2,57	0,08	102,68
	3,5	3,38	1,64	96,68
S45/QS _{5kDa}	1,5	1,49	0,08	99,23
	2,5	2,56	1,00	102,54
	3,5	3,48	0,49	99,47
S45/QS _{50kDa}	1,5	1,53	1,60	101,75
	2,5	2,52	0,08	100,67
	3,5	3,47	0,47	99,16

*Média da triplicata; ⁺DPR% = desvio padrão relativo.

2.4.2.1.6 Robustez

A robustez de um método é a medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

As Tabelas 2.6, 2.7 e 2.8 apresentam os valores de teor, tempo de retenção e simetria do pico obtidos na avaliação da robustez do método. Os valores de teor para a alteração do fluxo da fase móvel foram entre 95,31 e 103,16 %; para a variação do comprimento de onda de detecção os teores obtidos foram de 95,96 e 103,43 % e para a alteração do pH da fase móvel entre 96,56 e 103,17 %. O método foi considerado robusto, pois os valores de teor obtidos após alteração dos parâmetros foram compreendidos entre 90 e 110 %.

Tabela 2.6. Variação do fluxo da fase móvel para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.

Fluxo (mL/min)	Amostra	Teor* (%)	DPR ⁺ (%)	Tempo de retenção (min)	Simetria do Pico
0,9	S100-3/QS _{5kDa}	97,68	0,42	8,05	1,04
	S100-3/QS _{50kDa}	96,81	0,79	8,13	1,02
	S45/QS _{5kDa}	100,09	0,37	8,0	1,03
	S45/QS _{50kDa}	99,29	0,32	8,0	1,03
1,1	S100-3/QS _{5kDa}	99,57	0,24	6,4	1,03
	S100-3/QS _{50kDa}	95,91	0,46	6,4	1,00
	S45/QS _{5kDa}	103,16	0,22	6,4	1,04
	S45/QS _{50kDa}	99,64	0,60	6,4	1,03

*Média da triplicata; ⁺DPR = desvio padrão relativo.

Tabela 2.7. Variação do comprimento de onda de detecção para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.

λ (nm)	Amostra	Teor* (%)	DPR ⁺ (%)	Tempo de retenção (min)	Simetria do Pico
286	S100-3/QS _{5kDa}	101,93	0,27	7,20	1,06
	S100-3/QS _{50kDa}	95,96	1,09	7,24	1,07
	S45/QS _{5kDa}	103,43	0,92	7,20	1,03
	S45/QS _{50kDa}	101,67	1,28	7,20	1,04
290	S100-3/QS _{5kDa}	101,05	0,32	7,20	1,03
	S100-3/QS _{50kDa}	97,01	0,32	7,20	1,04
	S45/QS _{5kDa}	100,30	0,43	7,21	1,02
	S45/QS _{50kDa}	102,45	1,08	7,20	1,02

*Média da triplicata; ⁺DPR = desvio padrão relativo.

Tabela 2.8. Variação do pH da fase móvel para avaliação da robustez do método de quantificação da naringenina.

pH Fase Móvel	Amostra	Teor (%)	DPR ⁺ (%)	Tempo de retenção (min)	Simetria do Pico
2,4	S100-3/QS _{5kDa}	98,08	0,45	7,43	1,0
	S100-3/QS _{50kDa}	96,61	0,26	7,50	0,99
	S45/QS _{5kDa}	102,69	0,45	7,48	1,02
	S45/QS _{50kDa}	97,40	0,87	7,42	1,01
2,6	S100-3/QS _{5kDa}	102,87	0,11	6,93	1,09
	S100-3/QS _{50kDa}	96,56	0,43	6,95	1,11
	S45/QS _{5kDa}	104,69	0,14	7,04	1,08
	S45/QS _{50kDa}	103,17	0,23	7,00	1,09

*Média da triplicata; ⁺DPR = desvio padrão relativo.

2.4.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação de naringenina nas nano- e micropartículas

Para a avaliação da capacidade das nano- e micropartículas de lecitina/quitosana em associar a naringenina, a concentração de fármaco total e no sobrenadante foi determinada conforme descrito nos itens 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente, usando metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validada. A eficiência de encapsulação foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total do fármaco e a concentração do fármaco no sobrenadante. O teor de fármaco foi expresso com µg de naringenina/mL de suspensão.

Inicialmente, o efeito da quantidade de naringenina (5, 10, 15 e 20 mg) sobre a EE % e o teor do fármaco nas suspensões de nano- e micropartículas foi avaliado. As amostras foram preparadas utilizando a lecitina S100-3 e quitosanas de diferentes massas molares (50 kDa, 190 kDa e 310 kDa); a proporção de lecitina/quitosana foi mantida 5:1 para todas as amostras. Os resultados encontram-se mostrados na Tabela 2.9. Como pode ser observado o teor aumentou em cerca de duas vezes com o aumento da quantidade inicial de naringenina de 5 mg para 10 mg e os valores encontrados mantiveram-se uniformes, independente do tipo de quitosana utilizada. Entretanto, a correlação entre teor e quantidade inicial não foi mais observada quando quantidades maiores do fármaco

foram adicionadas. Por outro lado, os valores de EE % elevados foram obtidos indicando que a naringenina presente nas formulações encontra-se preferencialmente associada às partículas. A naringenina se associa as partículas por meio de interações hidrofóbicas, pois possui baixa solubilidade na fase aquosa externa. Para todas as quantidades de naringenina adicionadas os valores de eficiência de encapsulação foram superiores a 95 % demonstrando que não houve precipitação do fármaco durante o processo de preparo (SONVICO et al., 2006).

Tabela 2.9. Efeito da quantidade inicial de naringenina sobre o teor, recuperação e eficiência de encapsulação de fármaco nas partículas.

Amostra	NAR (mg)	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	Rec* (%)	EE ⁺ (%)
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	5	113,95	45,58	96,67
S100-3/QS _{190kDa} 5:1	5	113,56	45,42	99,18
S100-3/QS _{310kDa} 5:1	5	154,87	61,94	99,28
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	10	244,58	48,91	98,86
S100-3/QS _{190kDa} 5:1	10	245,84	49,17	97,84
S100-3/QS _{310kDa} 5:1	10	248,84	49,61	98,69
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	15	157,35	20,98	96,94
S100-3/QS _{190kDa} 5:1	15	106,65	14,22	95,33
S100-3/QS _{310kDa} 5:1	15	168,13	22,41	97,83
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	20	476,42	47,64	99,29
S100-3/QS _{190kDa} 5:1	20	623,51	62,35	99,42
S100-3/QS _{310kDa} 5:1	20	191,84	27,01	98,73

*Rec = Recuperação; ⁺EE = Eficiência de Encapsulação

Após a seleção da quantidade inicial de naringenina a ser utilizada no desenvolvimento dos sistemas nano- e microestruturados, novos testes foram realizados ainda com o objetivo de avaliar o teor e eficiência de encapsulação da naringenina mediante alteração da composição das formulações. Assim, os estudos subsequentes foram realizados fixando a quantidade inicial de naringenina em 10 mg. Igualmente, foram mantidas a quitosana de 50 kDa e a lecitina S100-3 (100% de fosfatidilcolina) e incluiu-se uma quitosana na forma de oligossacarídeo de massa molecular menor, cerca 5 kDa e a lecitina S45 (45% de fosfatidilcolina). Além da proporção de lecitina/quitosana de 5:1, foram testadas as proporções de 1:1, 10:1 e 20:1. As amostras foram preparadas (n=3) e avaliadas quanto ao teor e eficiência de encapsulação da naringenina e os resultados apresentados na Tabela 2.10.

Tabela 2.10. Efeito da massa molar da quitosana, tipo de lecitina e proporção de lecitina/quitosana sobre o teor, recuperação e eficiência de encapsulação da naringenina nas partículas (n=3).

Amostra	Teor ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	Recuperação (%) \pm DP	EE (%) \pm DP
S100-3/QS _{5kDa} 1:1	302,97 (\pm 27,9)	60,59 (\pm 5,5)	96,87 (\pm 3,2)
S100-3/QS _{5kDa} 5:1	348,36 (\pm 23,4)	69,67 (\pm 4,6)	97,22 (\pm 1,4)
S100-3/QS _{5kDa} 10:1	350,36 (\pm 24,3)	70,07 (\pm 4,8)	97,71 (\pm 1,3)
S100-3/QS _{5kDa} 20:1	386,31 (\pm 33,3)	77,26 (\pm 6,6)	97,73 (\pm 1,6)
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	296,09 (\pm 37,5)	59,21 (\pm 7,5)	97,14 (\pm 0,8)
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	307,70 (\pm 41,2)	61,24 (\pm 8,2)	96,89 (\pm 2,3)
S100-3/QS _{50kDa} 10:1	318,66 (\pm 50,4)	63,73 (\pm 10,0)	96,84 (\pm 2,4)
S100-3/QS _{50kDa} 20:1	307,30 (\pm 42,2)	61,46 (\pm 8,4)	97,54 (\pm 1,5)
S45/QS _{5kDa} 1:1	374,63 (\pm 30,3)	74,92 (\pm 6,0)	97,62 (\pm 1,0)
S45/QS _{5kDa} 5:1	303,22 (\pm 4,3)	60,64 (\pm 0,87)	96,43 (\pm 2,3)
S45/QS _{5kDa} 10:1	269,35 (\pm 21,3)	53,87 (\pm 4,2)	97,49 (\pm 2,4)
S45/QS _{5kDa} 20:1	364,18 (\pm 21,6)	72,83 (\pm 4,3)	96,92 (\pm 1,9)
S45/QS _{50kDa} 1:1	262,41 (\pm 38,2)	52,48 (\pm 7,6)	94,5 (\pm 4,0)
S45/QS _{50kDa} 5:1	304,78 (\pm 45,2)	60,95 (\pm 9,0)	95,86 (\pm 1,5)
S45/QS _{50kDa} 10:1	332,13 (\pm 5,1)	78,36 (\pm 1,0)	96,09 (\pm 0,3)
S45/QS _{50kDa} 20:1	371,84 (\pm 52,0)	74,36 (\pm 10,4)	96,49 (\pm 1,8)

*Quantidade inicial de naringenina foi 10 mg em todas as formulações.

Observou-se que os valores de eficiência de encapsulação se mantiveram acima de 94,5 % para todas as amostras confirmando a associação preferencial da naringenina as partículas, entretanto, os valores de teor variaram de 262,41 a 386,31 $\mu\text{g/ml}$ dependendo da formulação testada. Os teores de naringenina nas amostras foram comparados e analisados por ANOVA seguida do teste *t* de comparação entre as médias. Como pode ser observado na Tabela 2.11, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$ para a massa molar da quitosana e proporção de lecitina/quitosana, demonstrando desta maneira que estes fatores influenciam no teor de naringenina nas nano- e micropartículas.

Tabela 2.11. Análise da variância do teor de naringenina nas nano- e micropartículas.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{crítico}
Quitosana	8.044,5408	1	8.044,5408	7,0625	4,1491
Lecitina	162,0675	1	162,0675	0,1423	4,1491
Proporção LC/QS	16.625,8033	3	5.541,9344	4,8654	4,1491
Quitosana + Lecitina	2.241,3333	1	2.241,3333	1,9677	4,1491
Quitosana + LC/QS	9.565,2692	3	3,188,4231	2,7992	2,9011
Lecitina + LC/QS	7.972,5292	3	2.657,5097	2,3331	2,9011
Quitosana + Lecitina + LC/QS	20.714,8333	3	6.904,9444	6,0621	6,0621
Resíduo	36.449,3533	32	1.139,0423		
Total	101.775,73	47	2.165,4411		

$\alpha = 0,05$.

Através deste teste estima-se que duas médias são estatisticamente diferentes se o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou superior ao valor da d.m.s. Nesta análise, o valor da d.m.s para o teor de naringenina foi de 96,06 $\mu\text{g/mL}$. Comparando-se este valor com as diferenças entre as médias, observou-se que houve diferença estatística entre a amostra S45/QS_{5kDa} 10:1 (269,35 $\mu\text{g/mL}$) e as amostras S45/QS_{5kDa} 1:1 (374,63 $\mu\text{g/mL}$) e S100-3/QS_{5kDa} 20:1 (386,31 $\mu\text{g/mL}$); amostra S45/QS_{50kDa} 1:1 (262,41 $\mu\text{g/mL}$) e as amostras S100-3/QS_{50kDa} 20:1 (386,31 $\mu\text{g/mL}$), S45/QS_{5kDa} 1:1 (374,63 $\mu\text{g/mL}$) e S45/QS_{5kDa} 20:1 (364,18 $\mu\text{g/mL}$) e amostra S45/QS_{50kDa} 20:1 (371,84 $\mu\text{g/mL}$) e as amostras S45/QS_{5kDa} 10:1 (269,35 $\mu\text{g/mL}$) e S45/QS_{50kDa} 1:1 (262,41 $\mu\text{g/mL}$).

2.4.3 Caracterização físico-química das nano- e micropartículas

2.4.3.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

A determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica das nano- e micropartículas foram avaliados pela técnica

de difração a laser. Esta técnica baseia-se no princípio de que as partículas que passam através de um feixe de laser vão dispersar a luz em um ângulo que é diretamente relacionado com o seu tamanho. Na medida em que o tamanho das partículas decresce, o ângulo de dispersão acresce logaritmicamente. A intensidade de dispersão também é dependente do tamanho das partículas e diminui em relação à área do corte transversal das mesmas. Partículas maiores consequentemente dispersam a luz em ângulos estreitos com alta intensidade, enquanto partículas menores dispersam ângulos amplos, porém com baixa intensidade. As distribuições granulométricas são calculadas comparando-se o padrão de dispersão da amostra com um modelo óptico utilizando um processo de inversão matemática. Neste trabalho o método de escolha para a elaboração das curvas de distribuição granulométrica das nano- e micropartículas de lecitina/quitosana foi a teoria de Mie, que prediz as intensidades de dispersão para todas as partículas, pequenas ou grandes, transparentes ou opacas baseiam-se nas seguintes suposições: (a) que as partículas medidas são esféricas; (b) que a suspensão é diluída, de maneira que a luz difundida é medida antes que ela seja re-difundida por outras partículas; (c) que as propriedades ópticas das partículas e do meio circundante sejam conhecidas e (d) que as partículas sejam homogêneas. A teoria de Mie exige o conhecimento do índice de refração da amostra. Na análise das nano- e micropartículas foi utilizado o índice de refração de 1,59, referente ao poliestireno, pois as amostras analisadas são constituídas de polímeros (www.malvern.com).

Inicialmente, foram realizados ensaios visando avaliar o efeito da massa molar da quitosana e da proporção de lecitina/quitosana sobre o tamanho e distribuição granulométrica das partículas. Nesta etapa do trabalho, as quitosanas de baixa (50 – 190 kDa), média (190 – 310 kDa) e elevada (> 310 kDa) massas molares e proporções de lecitina/quitosana de 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1 foram testadas, mantendo-se fixa o tipo de lecitina empregada (lecitina S100-3). Os resultados obtidos encontram-se demonstrados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12. Efeito da massa molar da quitosana e da proporção de lecitina/quitosana no diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo 10 mg de naringenina.

Amostra	Diâmetro (μm)				
	d10%	d50%	d90%	Span	d4,3
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	2,58	7,19	17,57	2,08	14,28
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	3,43	8,18	16,80	1,63	9,88
S100-3/QS _{50kDa} 10:1	4,29	9,02	16,90	1,39	9,89
S100-3/QS _{50kDa} 20:1	3,82	7,69	14,06	1,33	8,36
S100-3/QS _{190kDa} 1:1	1,38	5,80	70,19	11,85	25,41
S100-3/QS _{190kDa} 5:1	2,94	7,00	16,38	4,98	10,13
S100-3/QS _{190kDa} 10:1	2,35	4,72	9,43	1,49	5,48
S100-3/QS _{190kDa} 20:1	2,77	5,54	10,44	1,38	6,12
S100-3/QS _{310kDa} 1:1	2,03	7,08	115,38	15,99	39,05
S100-3/QS _{310kDa} 5:1	3,17	7,13	14,29	1,55	8,02
S100-3/QS _{310kDa} 10:1	3,29	6,83	13,08	1,43	7,72
S100-3/QS _{310kDa} 20:1	2,70	5,24	9,89	1,37	5,83

Como pode ser observado, os valores de diâmetro médio variaram de 5,48 a 39,05 μm . Adicionalmente, distribuições granulométricas mais amplas foram obtidas quando a mais alta concentração das quitosanas de média e elevada massas molares foram empregadas, sendo esse efeito provavelmente relacionado à maior viscosidade das dispersões aquosas desse polissacarídeo. Nesses sistemas, o efeito da massa molar do polissacarídeo no tamanho das partículas sugere que este polímero está presente na superfície; polímeros de cadeia longa são capazes de se estenderem na superfície, influenciando o raio hidrodinâmico da partícula (SONVICO et al., 2006).

Assim, buscando obter partículas de menor tamanho, as quitosanas de média e elevada massas molares foram descartadas para os estudos subsequentes e novas formulações foram testadas, utilizando as quitosanas de 5 kDa e 50 kDa, lecitina S100-3 e S45 e as proporções de lecitina/quitosana de 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1. As partículas foram preparadas em triplicata e analisadas quanto ao diâmetro médio e distribuição granulométrica. Os resultados são apresentados na Tabela 2.13 e na Figura 2.3 estão demonstradas as curvas de distribuição granulométrica obtidas para diferentes amostras. O eixo y representa o

volume em porcentagem de amostra adicionada para a análise e o eixo x apresenta o tamanho em μm das partículas.

Tabela 2.13. Efeito da massa molar da quitosana e da proporção de lecitina/quitosana sobre o diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo 10 mg de naringenina.

Amostra	Tamanho (μm) \pm DP				
	d10%	d50%	d90%	Span	d4,3
S100-3/QS _{5kDa}	3,02	6,19	14,73	2,01	8,97
1:1	($\pm 0,87$)	($\pm 1,53$)	($\pm 2,74$)	($\pm 0,91$)	($\pm 2,84$)
S100-3/QS _{5kDa}	3,28	5,55	9,17	1,06	5,95
5:1	($\pm 0,17$)	($\pm 0,13$)	($\pm 0,79$)	($\pm 0,15$)	($\pm 0,24$)
S100-3/QS _{5kDa}	3,39	5,50	8,74	0,97	5,84
10:1	($\pm 0,27$)	($\pm 0,53$)	($\pm 0,94$)	($\pm 0,03$)	($\pm 0,57$)
S100-3/QS _{5kDa}	5,14	8,64	14,06	1,03	9,21
20:1	($\pm 0,17$)	($\pm 0,16$)	($\pm 0,35$)	($\pm 0,05$)	($\pm 0,17$)
S100-3/QS _{50kDa}	2,73	5,17	11,36	1,65	6,58
1:1	($\pm 0,18$)	($\pm 0,22$)	($\pm 3,50$)	($\pm 0,66$)	($\pm 1,40$)
S100-3/QS _{50kDa}	3,42	6,22	10,99	1,21	8,08
5:1	($\pm 0,25$)	($\pm 0,52$)	($\pm 1,26$)	($\pm 0,11$)	($\pm 2,82$)
S100-3/QS _{50kDa}	4,05	7,03	11,86	1,79	7,57
10:1	($\pm 0,93$)	($\pm 1,84$)	($\pm 3,43$)	($\pm 1,10$)	($\pm 2,02$)
S100-3/QS _{50kDa}	3,58	5,91	9,44	0,99	6,26
20:1	($\pm 0,30$)	($\pm 0,49$)	($\pm 0,78$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,52$)
S45/QS _{5kDa}	5,02	9,65	17,63	1,30	11,52
1:1	($\pm 0,65$)	($\pm 0,71$)	($\pm 1,58$)	($\pm 0,18$)	($\pm 1,05$)
S45/QS _{5kDa}	5,05	8,00	12,30	0,90	8,40
5:1	($\pm 0,22$)	($\pm 0,37$)	($\pm 0,58$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,38$)
S45/QS _{5kDa}	3,55	6,81	14,32	1,51	6,79
10:1	($\pm 0,21$)	($\pm 0,95$)	($\pm 6,80$)	($\pm 0,76$)	($\pm 0,14$)
S45/QS _{5kDa}	1,57	3,99	14,67	3,86	4,95
20:1	($\pm 1,32$)	($\pm 1,54$)	($\pm 5,54$)	($\pm 2,55$)	($\pm 0,57$)
S45/QS _{50kDa}	0,09	0,32	13,76	41,80	4,92
1:1	($\pm 0,005$)	($\pm 0,06$)	($\pm 3,55$)	($\pm 4,02$)	($\pm 2,17$)
S45/QS _{50kDa}	0,09	0,26	8,25	30,88	5,79
5:1	($\pm 0,01$)	($\pm 0,04$)	($\pm 1,50$)	($\pm 1,89$)	($\pm 2,57$)
S45/QS _{50kDa}	0,08	0,19	3,40	17,21	1,56
10:1	($\pm 0,01$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,85$)	($\pm 1,87$)	($\pm 1,08$)
S45/QS _{50kDa}	1,89	3,71	8,23	1,70	5,78
20:1	($\pm 0,16$)	($\pm 0,36$)	($\pm 1,11$)	($\pm 0,15$)	($\pm 1,57$)

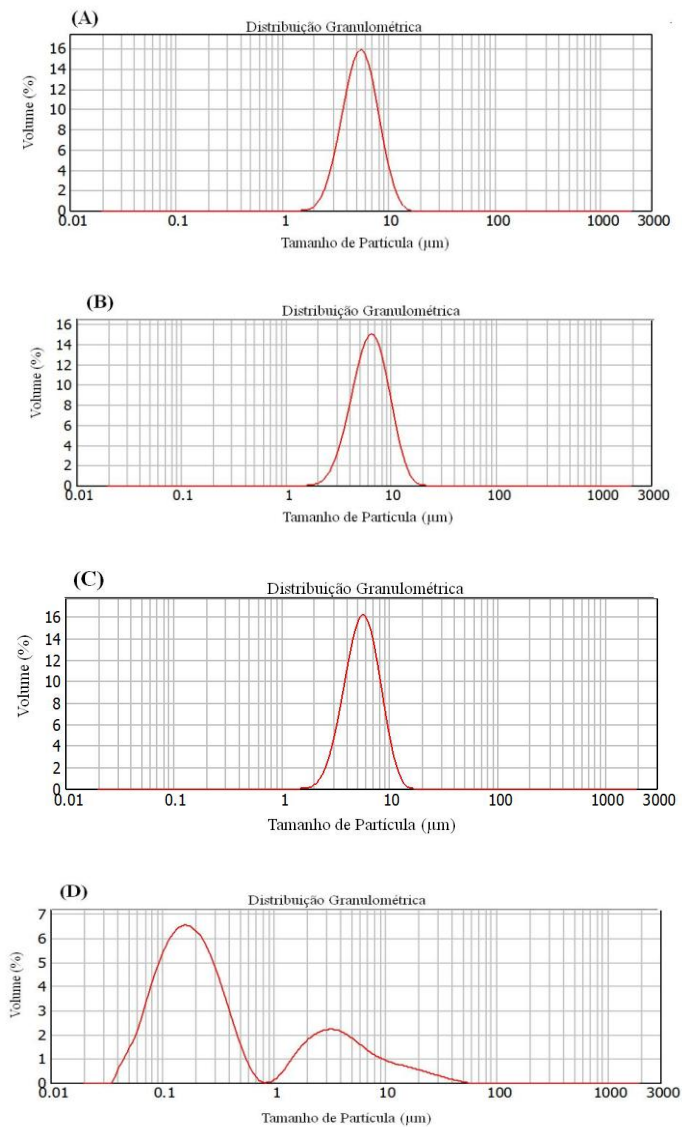


Figura 2.3. Gráficos de distribuição granulométrica para: (A) S100-3/QS_{50kDa} 10:1; (B) S45/QS_{5kDa} 5:1; (C) S100-3/QS_{5kDa} 5:1 e (D) S45/QS_{50kDa} 10:1.

Como pode ser observado na Tabela 2.13, os parâmetros de formulação testados pareceram afetar o diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas. Os valores de Span, relacionados com a uniformidade de tamanho, foram baixos para as formulações usando a lecitina S100-3 e ambas as quitosanas 5 kDa e 50 kDa e lecitina S45 e quitosana de 5 kDa. Entretanto, a associação da lecitina S45 com a quitosana 50 kDa, conduziu a formação de sistemas mais polidispersos, sobretudo quando maiores concentrações de quitosana foram empregadas nas formulações.

Os valores de diâmetro médio de partículas correspondente a 50 % de distribuição de tamanhos acumulados para cada amostra foram comparados estatisticamente pela ANOVA de três fatores. Como pode ser observado na Tabela 2.14 o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$ para as seguintes fontes de variação: massa molar da quitosana e tipo de lecitina, indicando que estes fatores afetaram significativamente os valores de d50%. Além disso, a presença da interação entre os fatores estudados ocorreu em todos os casos.

Tabela 2.14. ANOVA do tamanho médio das nano- e micropartículas.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{crítico}}$
Quitosana	122,2089	1	122,2089	182,5132	4,1491
Lecitina	54,592	1	54,592	81,5305	4,1491
Proporção LC/QS	3,4262	3	1,1421	1,7056	4,1491
Quitosana + Lecitina	94,052	1	94,052	140,4622	4,1491
Quitosana + LC/QS	22,282	3	7,4273	11,0924	2,9011
Lecitina + LC/QS	13,2176	3	4,4059	6,5799	2,9011
Quitosana + Lecitina + LC/QS	64,5546	3	21,5182	32,1364	32,1364
Resíduo	21,4269	32	0,6696		
Total	395,7601	47	8,4204		

$\alpha = 0,05$.

Para a avaliação de quais valores de d50% são estatisticamente diferentes entre si, foi calculada a d.m.s entre as médias utilizando-se o teste *t* de comparação entre as médias, conforme descrito no item 4.2.2. Nesta análise, o valor da d.m.s para o tamanho das partículas foi de 2,33 μm . Comparando-se este valor com as diferenças entre as médias, observou-se que o maior efeito sobre os valores de d50% ocorreu quando a lecitina S45 e quitosana de 50 kDa foram usados nas formulações, resultando em partículas de diâmetros nanométricos (0,32, 0,26 e 0,19 nm).

Sugere-se que o tamanho tenha sido afetado pela composição da lecitina S45. Os dois tipos de lecitina usadas nesse trabalho diferem no conteúdo de lipídios que contribuem para a carga negativa, ascendendo da S100-3 para a S45 e assim proporcionando a maior interação com a quitosana. Observou-se que as amostras constituídas de lecitina S45, porém com a quitosana de 5 kDa não resultaram em partículas nanométricas. É provável que isso tenha ocorrido pela reduzida massa molar da quitosana na forma de oligossacarídeo, a qual apresenta um menor número de grupamentos amina passíveis de neutralização pela lecitina.

2.4.3.2 Determinação do potencial zeta

A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquire uma carga de superfície, principalmente por ionização dos grupamentos de superfície, ou adsorção de espécies carregadas. Estas cargas de superfície modificam a distribuição dos íons circundantes, resultando numa camada ao redor da partícula. O potencial zeta é medido pela aplicação de um campo elétrico através da dispersão. As partículas vão migrar em direção ao eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta. Esta velocidade é medida utilizando a técnica de anemometria laser Doppler (www.malvern.com).

A Tabela 2.15 apresenta os valores de potencial zeta para algumas das partículas apresentadas na Tabela 2.13. Todas as amostras apresentaram carga positiva em decorrência da presença das quitosanas na superfície das partículas, que não foram completamente neutralizados pelas lecitinas, mesmo quando estas foram utilizadas na mesma concentração ou em concentrações superiores as de quitosana (SONVICO et al., 2006). É possível observar que os valores de potencial zeta para as amostras utilizando a quitosana 50 kDa foram

maiores, variando de +20,7 à +43,4 mV, enquanto as amostras de quitosana na forma de oligossacarídeo (5 kDa) resultaram em valores menores (+18,3 e +17,8 mV). Igualmente, observou-se uma diminuição nos valores de potencial zeta com a alteração da proporção de lecitina/quitosana de 1:1 para 20:1, em decorrência da maior neutralização de cargas proporcionadas pelo aumento da concentração de lecitina nas formulações.

Tabela 2.15. Valores de potencial zeta para partículas contendo 10 mg de naringenina.

Amostra	Proporção LC/QS	Potencial Zeta (mV)
S45/QS _{50kDa}	1:1	+33,1
S45/QS _{5kDa}	1:1	+18,3
S100-3/QS _{5kDa}	1:1	+17,8
S100-3/QS _{50kDa}	1:1	+43,3
S100-3/QS _{50kDa}	5:1	+40,3
S100-3/QS _{50kDa}	10:1	+34,4
S100-3/QS _{50kDa}	20:1	+20,7

2.4.3.3 Avaliação morfológica das nano- e micropartículas

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) conforme descrito no item 3.3.3 podem ser visualizadas na Figura 2.4. Como pode ser observado, partículas preparadas com lecitina S100-3 com a QS 5 kDa apresenta um formato irregular com tendência a formar aglomerados. Regiões mais claras e mais escuras são visualizadas, sugerindo uma falta de homogeneidade do sistema. Esse caráter heterogêneo parece ter sido reduzido quando a lecitina S45 foi empregada, sobretudo com a QS 50 kDa. Para esta amostra, partículas esféricas foram observadas por MET. Entretanto, o tamanho das partículas parecem ser menores que aqueles obtidos nas análises por difração a laser. Isto pode estar relacionado à visualização de apenas uma população de partículas no MET ou a formação de aglomerados durante a medida de diâmetro médio. Gerelli *et al.* (2008) observaram nanopartículas polidispersas e com a presença de clusters de tamanhos variáveis. Os autores sugerem que a existência desses clusters é esperada em sistemas de lipídio/poli-íon; o tamanho e número

umentam à medida que o ponto isoelétrico, pH onde há o equilíbrio entre cargas positivas e negativas dos grupamentos iônicos, é alcançado.

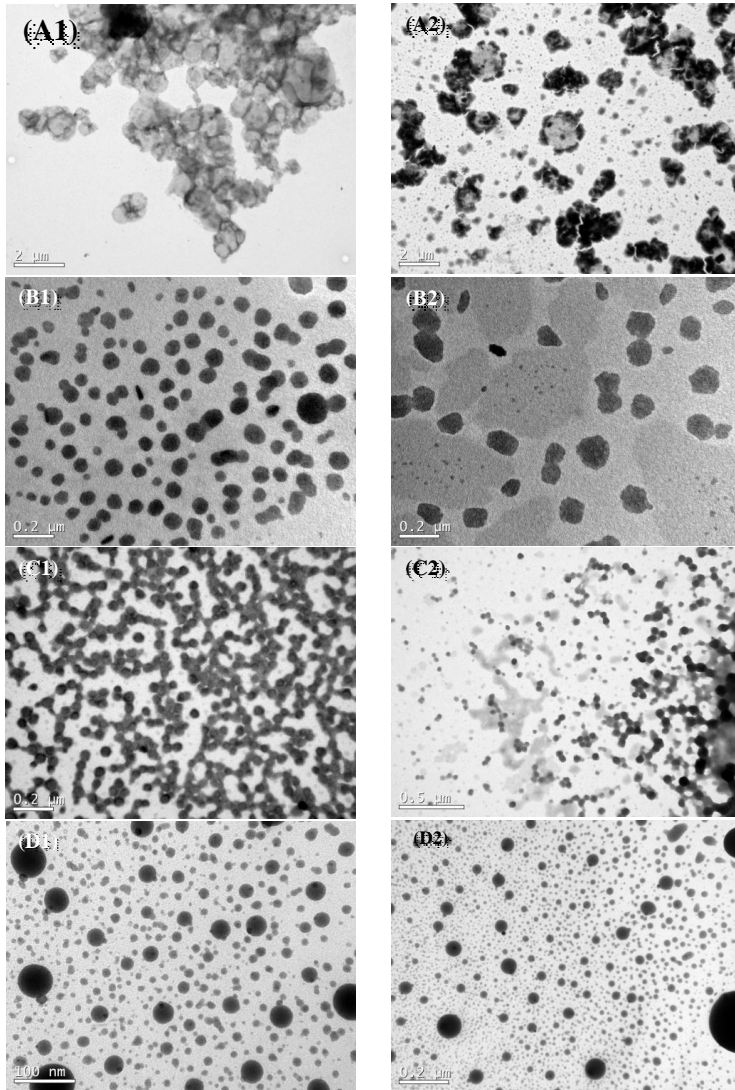


Figura 2.4. Fotomicrografias obtidas por MET das partículas encapsulando naringenina (A1) e (A2) S100-3/QS_{5kDa} 20:1, (B1) e (B2) S100-3/QS_{50kDa} 10:1, (C1) e (C2) S45/QS_{5kDa} 5:1 e (D1) e (D2) S45/QS_{50kDa} 1:1.

2.4.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Inicialmente, as análises termogravimétricas (TGA) e de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas com as quitosanas 5 kDa e 50 kDa puras (Figuras 2.5 e 2.6). As análises de TGA para ambas as quitosanas revelaram perda de massa correspondente a perda de água desses materiais. As curvas termoanalíticas de DSC das quitosanas (Figura 2.6) mostram um evento endotérmico a 167,94 °C e 156,2 °C para QS 5 kDa e QS 50 kDa respectivamente. Após resfriamento e novo aquecimento das amostras, esses eventos não foram mais observados, indicando que eles correspondem a perda de água de cristalização contidas nessas moléculas, devido a presença de grupamentos NH₂ e OH livres (CERVERA et al., 2004; ARSLAN, HAZER, YOON, 2006).

As curvas termoanalíticas de DSC obtidas para a lecitina S100-3 e para a naringenina exibiram eventos endotérmicos a 74,85 °C e 252,12 °C, respectivamente, correspondendo à fusão desses compostos. A lecitina S45 não exibiu evento endotérmico característico de fusão (Figura 2.7) (SEMALTY et al., 2010).

As curvas termoanalíticas obtidas por DSC das partículas preparadas a partir da lecitina S100-3 e QS 50 kDa em diferentes proporções estão apresentadas na Figura 2.8. Ocorreu um deslocamento do evento endotérmico correspondente a fusão da lecitina S100-3 para valores mais baixos. Endotermas em 177,91 °C e em 204,33 °C foram observadas nas amostras S100-3/QS_{50kDa} 10:1 naringenina e S100-3/QS_{50kDa} 20:1 naringenina, sugerindo o deslocamento da endoterma de perda de água de cristalização da quitosana. Nas amostras S100-3/QS_{50kDa} 1:1 branca, S100-3/QS_{50kDa} 1:1 naringenina e S100-3/QS_{50kDa} 5:1 naringenina este evento endotérmico foi menos pronunciado, porém também correspondente a perda de massa de água da quitosana.

As curvas termoanalíticas obtidas por DSC das partículas preparadas a partir da lecitina S100-3 e QS 5 kDa e lecitina S45 e QS 5 kDa estão apresentadas nas Figuras 2.9 e 2.10. Na Figura 2.9 ocorreu um deslocamento do evento endotérmico correspondente a fusão da lecitina S100-3 para valores mais baixos. Nas amostras contendo naringenina (Figuras 2.9b e 2.10b) observou-se o evento endotérmico deslocado de perda de água de cristalização da quitosana, em 189,69 °C e 182,07 °C, respectivamente. Nas amostras brancas (Figuras 2.9a e

2.10a) o evento endotérmico da quitosana também foi menos pronunciado.

As curvas termoanalíticas das amostras S45/QS_{50kDa} 1:1 branca e S45/QS_{50kDa} 1:1 naringenina estão apresentadas na Figura 2.11, onde observou-se apenas o evento endotérmico de perda de massa de água da quitosana.

Em todas as amostras contendo a naringenina não foi observado o evento endotérmico correspondente a fusão desse fármaco, comprovando, desta maneira, que quando incorporada nos nano- e microestruturados a naringenina está no seu estado molecular.

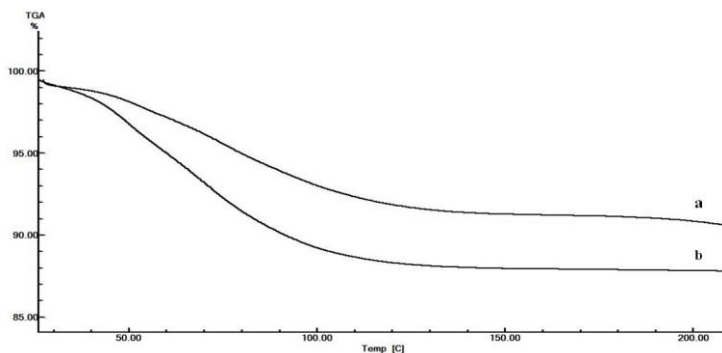


Figura 2.5. TGA das quitosanas de 5 kDa (a) e 50 kDa (b)

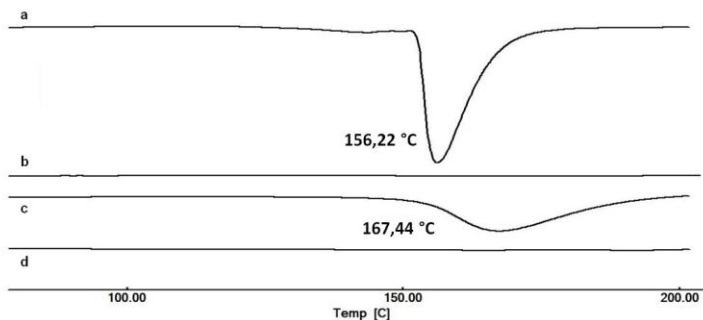


Figura 2.6. Curvas de DSC 50 kDa e 5 kDa antes do resfriamento (a e c) e após resfriamento e re-aquecimento (b e d), respectivamente.

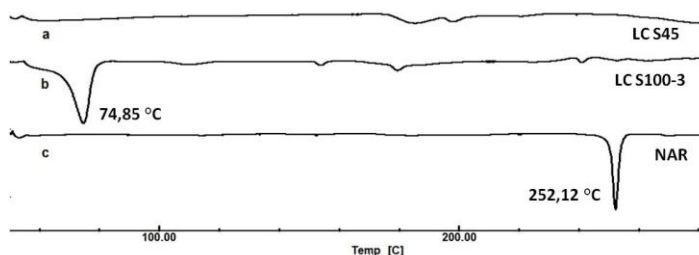


Figura 2.7. Curvas de DSC obtidas a partir: lecitina S45 (a), lecitina S100-3 (b) e naringenina (c).

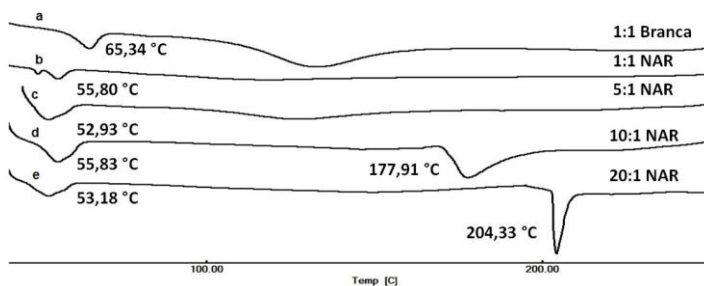


Figura 2.8. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S100-3 e QS 50 kDa em diferentes proporções; 1:1 branca (a), 1:1 NAR (b), 5:1 NAR (c), 10:1 NAR (d) e 20:1 NAR (e).

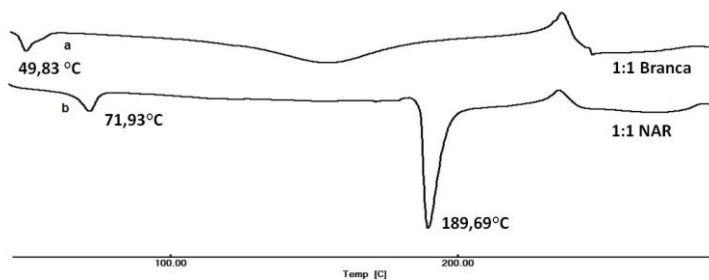


Figura 2.9. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S100-3 e QS 5 kDa; branca (a) e naringenina (b).

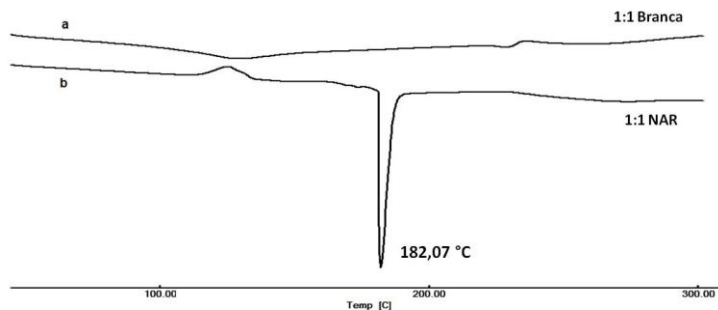


Figura 2.10. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S45 e QS 5 kDa; branca (a) e naringenina (b).

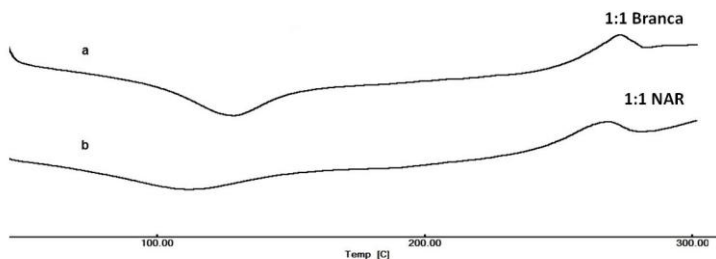


Figura 2.11. Curvas de DSC obtidas a partir das nano- e micropartículas de lecitina S45 e QS 50 kDa; branca (a) e naringenina (b).

2.4.3.5 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR)

Com o objetivo de verificar a presença de interação entre o lipídio, a quitosana e a naringenina, as nano- e micropartículas foram analisadas por FIT-IR.

Os espectros de FIT-IR dos compostos puros e nano- e micropartículas as estruturas químicas da naringenina, quitosana e fosfatidilcolina estão demonstrados na Figura 2.12. A naringenina exibiu bandas características de sua estrutura química como o estiramento OH em 3410 cm^{-1} e o estiramento C=O em 1658 cm^{-1}

(UNSAN, ERDOGDU, GULLUOGLU, 2008). Nos espectros das lecitinas S100-3 e S45 foram observadas bandas em 1731 cm^{-1} , correspondentes estiramento dos grupamentos carbonila dos ácidos graxos e bandas em 1234 cm^{-1} correspondentes ao grupamento fosfato presentes nas moléculas. As quitosanas de 5 kDa e 50 kDa, apresentaram banda característica do grupamento amida em 1653 cm^{-1} e banda em 1561 cm^{-1} correspondente ao grupamento amina protonado devido ao processo de deacetilação parcial da quitina (SARMENTO et al., 2006; SONVICO et al., 2006; DUDHANI, KOSARAJU, 2010).

Nas nano- e micropartículas observou-se um deslocamento da absorção do grupamento fosfato das lecitinas de 1234 cm^{-1} para 1248 cm^{-1} e deslocamento de absorção dos grupamentos amina das quitosanas de 1561 cm^{-1} para 1522 cm^{-1} . Desta maneira os resultados sugerem uma complexação iônica efetiva entre o lipídio e o polissacarídeo.

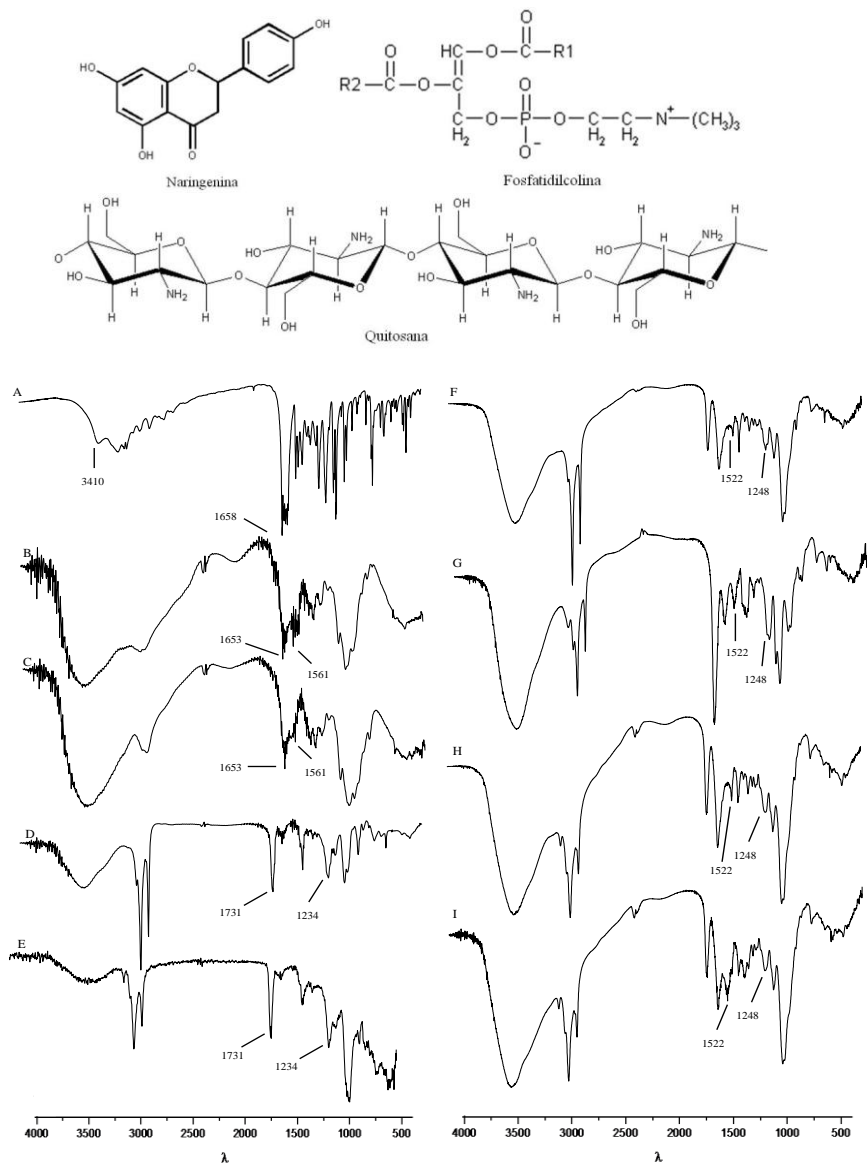


Figura 2.13. Estrutura química da naringenina, fosfatidilcolina e quitosana e espectros de FIT-IR para: (A) Naringenina, (B) Quitosana 5kDa (C) Quitosana 50kDa (D) Lecitina S100-3, (E) Lecitina S45, (F) S100-3/QS_{5kDa} 1:1, (G) S100-3/QS_{50kDa} 1:1, (H) S45/QS_{5kDa} 1:1 (I) S45/QS_{50kDa} 1:1.

2.4.4 Estudos de captura pelos macrófagos

2.4.4.1 Preparo e caracterização dos sistemas nano- e microestruturados à base de complexos de quitosana e lecitina encapsulando o fluorocromo vermelho de Nilo.

O vermelho de Nilo (Figura 2.14) é um corante pobremente solúvel em água, porém dissolve em uma variedade de solventes orgânicos (coeficientes de partição do vermelho de Nilo em solventes orgânicos em relação à água é cerca de 200) e é uma molécula intensamente fluorescente (GREENSPAN, MAYER, FOWLER, 1985).

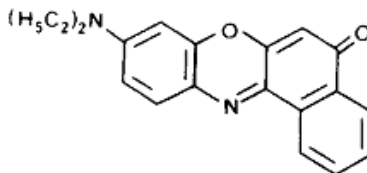


Figura 2.14. Estrutura química do vermelho de Nilo.

Fonte: GREENSPAN, MAYER, FOWLER, 1985.

O vermelho de Nilo foi encapsulado nos complexos de lecitina e quitosana como fármaco modelo para os ensaios de captura celular. As amostras foram preparadas utilizando a lecitina S100-3 e as quitosana de 5 kDa e 50 kDa nas proporções de lecitina/quitosana de 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1. As amostras foram caracterizadas quanto ao tamanho, distribuição granulométrica e potencial zeta e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.16.

Tabela 2.16. Valores de diâmetro, span e potencial zeta das partículas encapsulando o fluorocromo vermelho de Nilo destinadas aos estudos de captura celular.

Amostra	Tamanho (μm)				d4,3	Potencial Zeta (mV)
	d10%	d50%	d90%	Span		
S100-3/QS _{5kDa} 1:1	1,34	2,93	7,12	1,96	4,15	+19,4
S100-3/QS _{5kDa} 5:1	1,52	3,43	7,60	1,76	4,08	+12,9
S100-3/QS _{5kDa} 10:1	1,95	4,31	8,58	1,53	4,85	+12,0
S100-3/QS _{5kDa} 20:1	2,34	6,29	15,35	2,06	7,73	+11,5
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	2,41	7,76	20,52	2,33	16,41	+30,0
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	2,10	5,41	11,78	1,78	7,89	+14,3
S100-3/QS _{50kDa} 10:1	1,85	4,74	10,91	1,91	5,65	+15,1
S100-3/QS _{50kDa} 20:1	1,71	3,94	7,87	1,56	4,41	+14,8

Como pode ser observado na Tabela 2.16 as amostras utilizando a quitosana de 5 kDa resultaram em tamanhos crescentes, a medida em que a proporção de lecitina/quitosana aumentou, variando de 2,93 à 6,29 μm . Para as partículas preparadas com a quitosana de 50 kDa ocorreu o oposto, sendo os tamanhos decrescentes com o aumento da proporção de lecitina/quitosana, de 7,76 à 3,94 μm . O potencial zeta foi positivo para todas as amostras confirmando que a quitosana utilizada no preparo foi suficiente para neutralizar as cargas negativas da lecitina, conforme discutido no item 4.3.2.

As propriedades das partículas como o tamanho, carga de superfície e composição são de grande importância no processo de fagocitose pelos macrófagos. Para que a fagocitose aconteça, as partículas inicialmente precisam entrar em contato com os pseudópodos dos macrófagos e serem internalizadas para o citoplasma pelos lamelipódios. Na literatura existem divergências a respeito do tamanho de partícula máximo capaz de ser fagocitada pelos macrófagos. Apesar de nanopartículas serem mais facilmente internalizadas pelas células, micropartículas até cerca de 10 μm também são susceptíveis à fagocitose. Com relação ao potencial zeta, estudos relatam que a fagocitose de partículas maiores é aumentada se a carga de superfície das partículas é alta tanto para valores positivos quanto negativos (TABATA, INOUE, IKADA, 1996; DESAI et al., 1999; ASHAN, 2002; FOGED et al., 2005).

2.4.4.2 Determinação do teor de vermelho de Nilo nas nano- e micropartículas

As curvas analíticas construídas para o fluorocromo Vermelho de Nilo foram consideradas lineares na faixa de aplicação de 0,005-0,2 µg/mL (Tabela 2.17). Os valores de coeficiente de correlação e equação de calibração foram: $r = 0,999$, $y = 21378x - 7,2542$; onde x é a concentração de Vermelho de Nilo e y é a intensidade de fluorescência obtida (Figura 2.14).

Tabela 2.17. Valores de intensidade de fluorescência para obtenção da curva analítica do fluorocromo Vermelho de Nilo.

Conc. VN (µg/mL)	Intensidade de Fluorescência				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média Curvas	DP
0,005	116,3	108,2	111,2	108,6	2,5
0,01	198,4	198,8	199,4	198,9	0,5
0,02	406,2	401,1	404,6	404	2,6
0,05	1059	1054	1053	1055,3	3,2
0,08	1708	1706	1704	1706	2,0
0,1	2160	2163	2166	2163	3,0
0,2	4256	4251	4256	4254,3	2,9

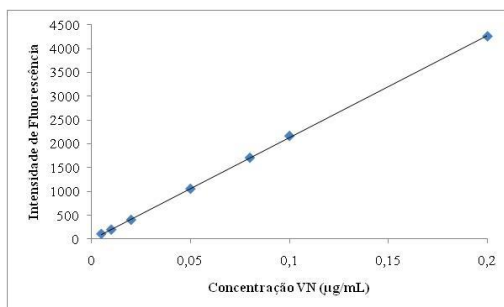


Figura 2.14. Curva analítica do vermelho de Nilo

Após construção das curvas analíticas de vermelho de Nilo, as partículas foram avaliadas quanto ao teor do fluorocromo. Os resultados obtidos variaram de 33,26 até 60,77 µg/mL e estão apresentados na Tabela 2.18.

Tabela 2.18. Valores de intensidade de fluorescência e teor de vermelho de Nilo das micropartículas.

Amostra	Intensidade de Fluorescência	Teor VN ($\mu\text{g/mL}$)
S100-3/QS _{5kDa} (1:1)	1489	34,42
S100-3/QS _{5kDa} (5:1)	1980	45,77
S100-3/QS _{5kDa} (10:1)	1439	33,26
S100-3/QS _{5kDa} (20:1)	2629	60,77
S100-3/QS _{50kDa} (1:1)	1885	43,57
S100-3/QS _{50kDa} (5:1)	2000	46,23
S100-3/QS _{50kDa} (10:1)	1713	39,60
S100-3/QS _{50kDa} (20:1)	1337	54,02

2.4.4.3. Microscopia de Fluorescência

A fisiologia dos tecidos enfermos pode ser alterada por diversas condições patológicas, e podem ser exploradas para a liberação de fármacos. Esta característica fisiopatológica inclui o aumento da permeabilidade vascular em várias condições inflamatórias o que permite o extravasamento de sistemas carreadores de fármacos para estes sítios via efeito EPR (efeito de permeabilidade e retenção aumentados). Conseqüentemente estes sistemas vão ser retidos no espaço extravascular, sendo uma grande parte fagocitada por macrófagos (VASIR, REDDY, LABHASERWAR, 2005; VAN DER HOVEN et al., 2011).

Os macrófagos são as principais células da diferenciação do sistema fagocítico mononuclear, o qual compreende os monoblastos e pró-monoblastos da medula óssea, monócitos periféricos e macrófagos teciduais. Os precursores dos macrófagos são os monócitos, pró-monócitos e monoblastos. Os macrófagos colonizam o fígado (células de kupffer), pulmões (macrófagos alveolares intersticiais), baço, linfonodos, timo, intestino, medula, cérebro, tecido conectivo e cavidades serosas. Os macrófagos desempenham funções críticas na defesa do hospedeiro contra diversos agentes infecciosos, incluindo bactérias, viroses, protozoários e parasitas (AHSAN et al., 2002).

Mais especificamente, sabe-se que os macrófagos e células dendríticas possuem funções importantes na regulação das imunorespostas no trato gastrointestinal como células apresentadoras de antígeno. As células M, as quais existem no epitélio associado aos folículos (EAF) revestindo os folículos linfóides das placas de Peyer,

capturam várias macromoléculas, bactérias, vírus, e protozoários, e os transportam para as áreas foliculares para a fagocitose pelos macrófagos. Diversos estudos indicam o envolvimento dos macrófagos e das células dendríticas na doença inflamatória intestinal ativa. Além do mais, células T CD4⁺ também possuem importante papel na fisiopatologia dessas doenças inflamatórias (NAKASE et al., 1999; LAMPRECHT et al., 2001).

Sistemas nano- e microestruturados fluorescentes são as ferramentas mais utilizadas para avaliar a fagocitose intestinal tanto quali- quanto quantitativamente. O uso de marcadores permite a melhor visualização das partículas nas células ou tecidos, proporcionando um aumento na sensibilidade em experimentos quantitativos (DELIE, 1998). Os sistemas microestruturados encapsulando o fluorocromo Vermelho de Nilo foram avaliados qualitativamente quanto a sua captura celular após 1 e 2 horas de incubação em cultura de macrófagos murinos J774 (Figura 2.15, 2.16 e 2.17). A fluorescência vermelha nas micrografias confirma o acúmulo intracelular de vermelho de Nilo. Observou-se uma igual ou maior fluorescência após 2 horas, tanto após incubação das células com o vermelho de Nilo livre, quanto após a incubação com as partículas. Entretanto, um aumento no tamanho e alteração da morfologia dos macrófagos pode ser observado após a incubação com as partículas, indicando que estas células foram ativadas pela presença das mesmas, ocorrendo a captura celular. Desta maneira, é possível prever que os sistemas nano- e microestruturados estudados, quando em contato com a mucosa colônica inflamada, seriam fagocitados pelos macrófagos existentes no sítio de inflamação, permanecendo por um maior tempo no local de ação e assegurando uma maior eficácia terapêutica do fármaco encapsulado.

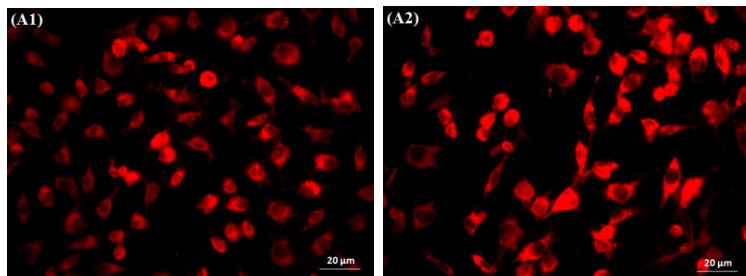


Figura 2.15. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com vermelho de Nilo livre: (A1) uma hora de incubação e (A2) duas horas de incubação.

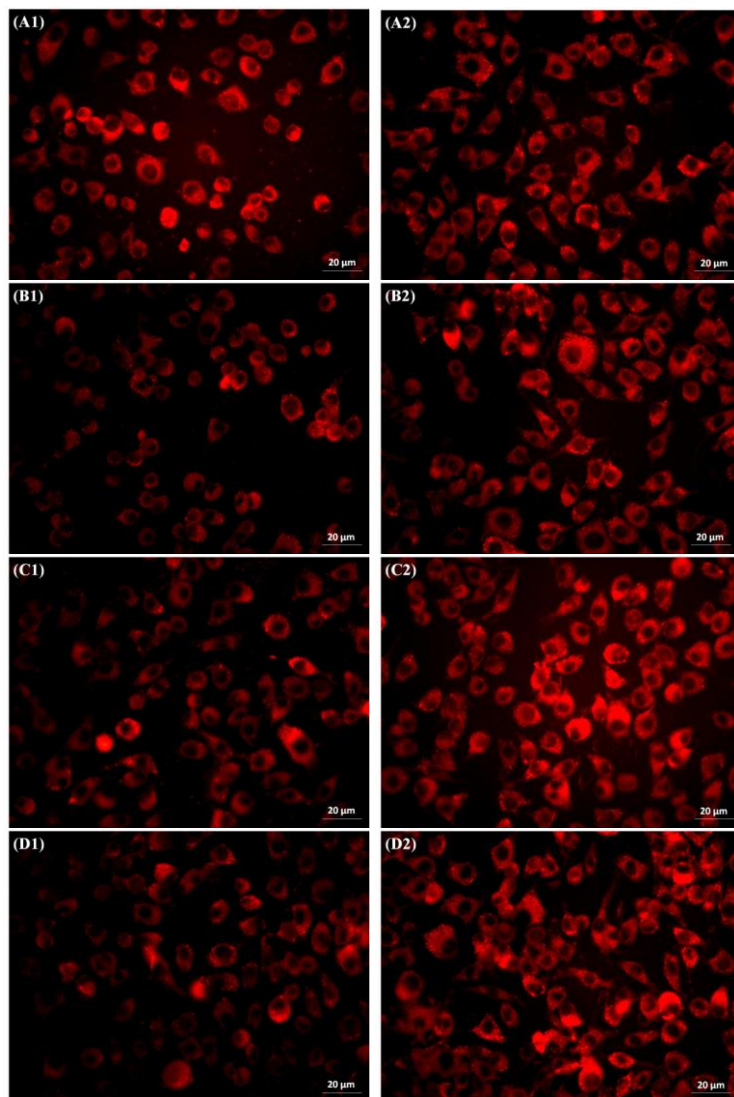


Figura 2.16. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com (A1 e A2) S100-3/QS_{5kDa} 1:1; (B1 e B2) S100-3/QS_{5kDa} 5:1, (C1 e C2) S100-3/QS_{5kDa} 10:1 e (D1 e D2) S100-3/QS_{5kDa} 20:1.

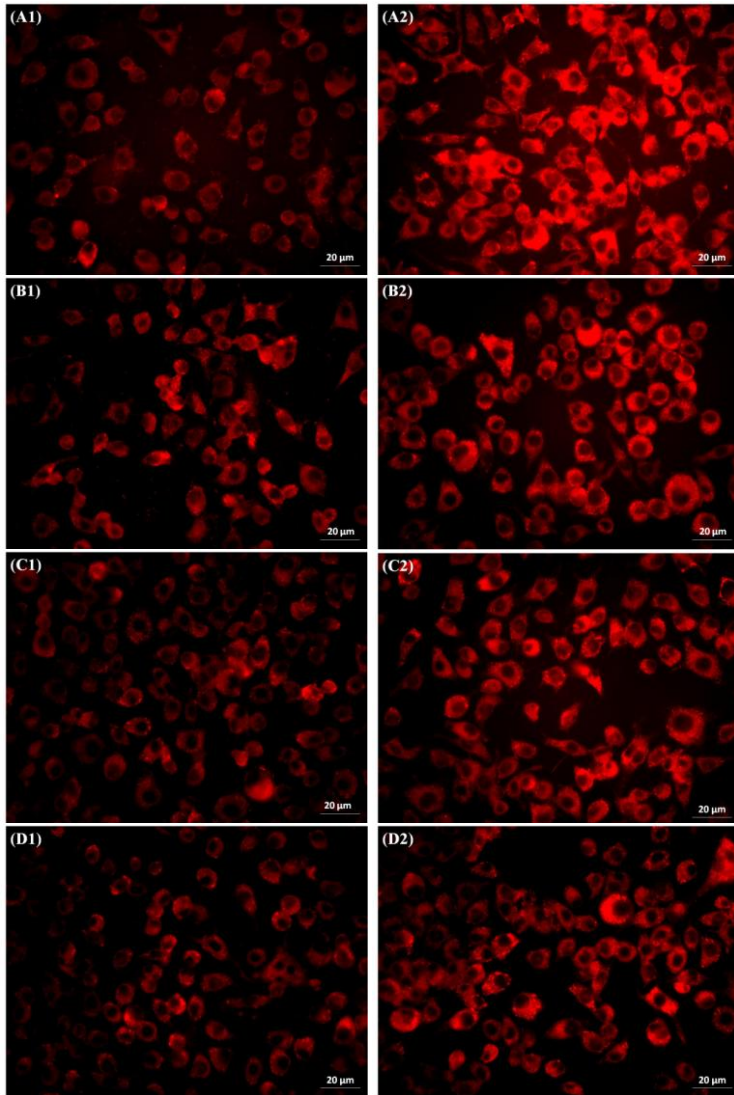


Figura 2.17. Micrografias da cultura de macrófagos murinos J774 incubados com (A1 e A2) S100-3/QS_{50kDa} 1:1; (B1 e B2) S100-3/QS_{50kDa} 5:1, (C1 e C2) S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e (D1 e D2) S100-3/QS_{50kDa} 20:1.

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS DE LECITINA E QUITOSANA
REVESTIDAS COM POLÍMERO ENTÉRICO

3.1 Introdução

A via oral é a rota de preferencial para a administração de medicamentos, devido à facilidade de administração e total controle pelo próprio paciente, juntamente com um alto grau de flexibilidade de dose. Entretanto, devido às diferenças na fisiologia e sítio preferencial de absorção, as formas farmacêuticas devem ser desenvolvidas para alcançar um órgão específico ou até mesmo uma parte de determinado órgão (PINTO, 2010).

A administração de fármacos no cólon é interessante no tratamento de doenças colônicas (colite ulcerativa e doença de Chron) onde altas concentrações locais podem ser alcançadas minimizando os efeitos adversos que ocorrem na liberação de fármacos no trato gastrointestinal superior ou absorção sistêmica indesejada. Para alcançar a liberação colônica específica, diversas técnicas têm sido relatadas nos últimos anos. Essas técnicas se baseiam em condições do ambiente fisiológico, como a variação de pH ao longo do trato gastrointestinal, a degradação enzimática pelas bactérias colônicas e o tempo de trânsito da forma farmacêutica no intestino delgado (CRCAREVSKA, DODOV, GARCINOVA, 2007).

Os sistemas pH-dependentes exploram o fato do pH do TGI humano aumentar progressivamente do estômago (1 – 2, aumentando para 4 durante a digestão) intestino delgado (6 – 7) para o cólon (7 – 8) (CHOURASIA & JAIN, 2003). Estes sistemas baseiam-se geralmente no revestimento da forma farmacêutica com polímeros insolúveis a pH ácido e solúveis a pH neutro ou ligeiramente alcalino. Estes polímeros devem ser capazes de prevenir a liberação do fármaco no estômago e intestino delgado proximal e promovê-la no íleo terminal ou cólon proximal (FREIRE et al., 2006). O Eudragit[®] S100 é um polímero gastrorresistente amplamente utilizado como polímero de revestimento entérico para administração colônica. Este polímero é um copolímero aniônico formado pelo ácido metacrílico e metilmetacrilato (razão 1:2), é insolúvel em ácidos e solúvel em pH acima de 7,0, sendo ideal para a liberação íleo-colônica de fármacos. O Eudragit[®] S100 ioniza-se nas condições de pH elevado do intestino delgado, dissolvendo-se no local e permitindo a liberação do fármaco (RAFFIN et al., 2006; LIU & BASIT, 2010). Assim, buscando obter sistemas destinados à liberação colônica da naringenina, o revestimento das micropartículas de lecitina e quitosana com o Eudragit[®] S100 foi realizado, com base no princípio de que este polímero carregado negativamente poderia interagir com as

partículas apresentando carga superficial positiva. Esse capítulo descreve a preparação e caracterização desses sistemas bem como estudos de dissolução em diferentes meios.

3.2 Materiais

3.2.1 Matérias-primas

Acetato de Sódio Triidratado (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Ácido Maleico (Sigma Aldrich, Alemanha)

Ácido Palmítico (Sigma Aldrich, Alemanha)

Albumina Sérica Bovina (Sigma Aldrich, Alemanha)

Cloreto de Sódio (Sigma Aldrich, Alemanha)

Copolímero do Ácido Metacrílico e Metilmetacrilato 1:2 (Eudragit[®] S100) (Evonik Degussa, Alemanha)

Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

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

Naringenina 95% (Sigma Aldrich, Alemanha)

Quitosana de Baixo Peso Molecular (Sigma Aldrich, Alemanha)

Taurocolato de Sódio (Sigma Aldrich, Alemanha)

Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) (Sigma Aldrich, Alemanha)

3.2.2 Solventes, soluções e reagentes

Ácido Acético Glacial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Ácido Clorídrico 37% P.A. (Biotec, Paraná, Brasil)

Ácido Fosfórico 85% P.A. (Synth, São Paulo, Brasil)

Álcool Etilico 96% (Synth, São Paulo, Brasil)

Álcool Metílico (JTBaker, EUA)

Hidróxido de Sódio (Cromoline, São Paulo, Brasil)

3.2.3 Equipamentos

Agitador Magnético de 6 pontos (Dist, Brasil)

Aparelho de dissolução VARIAN modelo VK7000

Balança Analítica Ohaus Corporation AS 2005 (Nova Jersey, Estados Unidos)

Bomba de Vácuo Fisatom (São Paulo, Brasil)

Centrifuga Sigma 4K15

Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão)

Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão)

Espectrofotômetro Infravermelho IR Prestige-21 (Shimadzu, Japão)

Fluorímetro Hitachi F4500 (Hitachi, Japão)

Liofilizador Terroni (São Paulo, Brasil)

Granulômetro a laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido)

Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6390LV (Tóquio, Japão)

Evaporador rotatório Marconi Modelo MA 120 (São Paulo, Brasil)

Zetasizer Nano ZS Nanoseries (Malvern Instruments, Reino Unido)

3.3 Metodologia

3.3.1 Preparação das micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com Eudragit[®] S100

As partículas obtidas utilizando lecitina 100% de fosfatidilcolina (S100-3) e quitosana 50 kDa nas proporções de lecitina/quitosana 1:1, 5:1, 10:1 e 20:1, contendo naringenina, foram submetidas ao processo de liofilização. Após a secagem, as partículas foram redispersas em 5 mL de uma solução contendo 240 mg de Eudragit[®] S100 pH 9,0. O pH da suspensão foi ajustado para 5,0 com HCl 0,1 N para a precipitação do polímero de revestimento sobre as partículas. Por fim, as partículas foram novamente liofilizadas e armazenadas em dessecador. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

3.3.2 Determinação do teor de naringenina nas micropartículas revestidas com Eudragit[®] S100

Cerca de 50 mg das partículas foram colocados em balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com metanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética, durante duas horas e, em seguida, foi centrifugada a 3.500 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado em membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore, EUA) e analisado quanto à concentração de naringenina, conforme metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validada, nas condições descritas no item 2.4.2.1. O teor de naringenina foi expresso como mg/100 mg de micropartículas. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.3 Caracterização físico-química das nano e micropartículas

3.3.3.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinados por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), conforme descrito em n item 2.3.3.1. As amostras foram dispersas em tampão acetato pH 4,5 com auxílio de ultrassom e a configuração de análise pela teoria de Mie foi adotada, usando o índice de refração de 1,59 para todas as amostras

analisadas e índice de obscuração entre 10 e 13 %. Os resultados foram expressos como diâmetro médio (d_{4,3}) e diâmetro do volume equivalente a 10 % (d_{10%}), 50% (d_{50%}) e 90 % (d_{90%}) do volume acumulado.

3.3.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das partículas foi determinado por anemometria laser-Doppler conforme descrito no item 2.3.3.2. As medidas foram realizadas a 25°C após adição de alíquota de partículas liofilizadas em tampão acetato pH 4,5. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética usando a equação de Smoluchowski.

3.3.3.3 Avaliação morfológica das partículas

As micropartículas revestidas e liofilizadas contendo naringenina foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um microscópio JEOL JSM-6390LV. As partículas foram adequadamente fixadas no porta-amostras sob uma fita de carbono, recobertas com ouro e analisadas quanto a sua morfologia.

3.3.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico das partículas de lecitina e quitosana revestidas com polímero entérico contendo naringenina foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial conforme descrito no item 2.3.3.3.

3.3.3.5 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR)

Para avaliar a presença das interações entre os componentes das formulações, os compostos puros e as partículas revestidas com polímero entérico contendo naringenina foram analisados por espectroscopia de infravermelho conforme item 2.3.3.4.

3.3.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da naringenina a partir das micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com Eudragit® S100

3.3.4.1 Preparo dos meios de dissolução

3.3.4.1.1. Fluido Gástrico Simulado pH 1,2 (FGS)

Em cerca de 500 mL de água foram solubilizados 2 g de cloreto de sódio, adicionados 7 mL de ácido clorídrico e o volume completado com água para 1 L. O pH do meio foi ajustado para 1,2 mediante adição de solução de hidróxido de sódio 1N (USP 32).

3.3.4.1.2 Fluido Intestinal Simulado pH 6,8 (FIS)

Em cerca de 250 mL de água foram solubilizados 6,8 g de fosfato de potássio monobásico, o pH da solução foi ajustado para 6,8 com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 N e o volume completado com água para 1 L (USP 32).

3.3.4.1.3 Fluido Biorrelevante Colônico (FaSSCoF)

Inicialmente, uma solução tampão Tris/maleato foi preparada dissolvendo 5,5 g de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e 8,8 g de ácido maleico em água; o pH da solução foi ajustado para 7,8 com hidróxido de sódio 0,5 N e o volume completado para 1 L com água. Cerca de 450 mL desta solução tampão foi transferida para um balão de fundo redondo, no qual foi adicionado 0,113 g de taurocolato de sódio. Separadamente, 0,222 g de fosfatidilcolina (Lipoid S100-3) e 0,026 g de ácido palmítico foram dissolvidos cada um em 3 mL de diclorometano (totalizando 6 mL) e transferidos para o balão. O diclorometano foi totalmente eliminado por evaporação sob pressão reduzida a 40°C. A solução foi transferida uma proveta o volume foi ajustado para 1 L com tampão Tris/maleato e 3 g de albumina sérica bovina foi adicionada e dissolvida com auxílio de um agitador magnético até obtenção de uma solução levemente turva (VERTZONI et al., 2010).

3.3.4.2 Determinação da naringenina por cromatografia líquida de alta eficiência

A determinação da naringenina no meio de liberação foi realizada por metodologia analítica de CLAE, conforme descrito no item 2.4.2.1. As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-

10AD, degasser DGU-14A, detector SPD-10AV (ajustado em 288 nm), detector DAD SPD-M10AVP e sistema controlador SCL-10Avp. Os experimentos foram executados em modo de fase reversa Phenomenex (Torrance, CA), coluna Luna C18 (250 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm). O sistema foi operado isocraticamente à 25°C utilizando uma fase móvel metanol-água (60:40 v/v), ajustada para pH 2,5 com ácido fosfórico e filtrada em membrana filtrante 0,45 µm. O fluxo de fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software CLASS-VP.

3.3.4.2.1 Preparo das curvas analíticas da naringenina nos meios de dissolução

Para determinação da naringenina em cada um dos meios de dissolução, curvas de calibração foram construídas após análise de soluções padrões do fármaco por CLAE, conforme descrito 3.3.4.2. As soluções padrões foram preparadas mediante a diluição de uma solução de naringenina 1,0 mg/mL de modo a obter soluções nas seguintes concentrações: 0,15; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 µg/mL no fluido gástrico pH 1,2; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0 µg/mL no fluido intestinal simulado pH 6,8; e 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 7,0 µg/mL no fluido biorrelevante colônico. A linearidade do método foi avaliada por meio da análise da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados.

3.3.4.3 Avaliação dos perfis de liberação da naringenina a partir das micropartículas

Os perfis de liberação da naringenina no fluido gástrico simulado pH 1,2, fluido intestinal simulado pH 6,8 e fluido biorrelevante colônico foram obtidos utilizando o aparato II da USP. Brevemente, 100 mg de cada uma das amostras de micropartículas (S100-3/QS_{50KDa} 1:1, S100-3/QS_{50KDa} 5:1, S100-3/QS_{50KDa} 10:1 e S100-3/QS_{50KDa} 20:1) foram colocadas em invólucros de cápsula de gelatina dura transparentes n° 00, e os invólucros foram fechados e colocados em 500 mL de cada um dos meios de dissolução, mantidos na temperatura de 37 ± 0,5 °C, com agitação controlada de 50 rpm. Para a determinação do perfil de liberação da naringenina no fluido gástrico simulado, alíquotas de 10 mL foram retiradas nos tempos 0,5, 1 e 2 horas. No fluido intestinal simulado e fluido biorrelevante colônico as alíquotas foram retiradas nos tempos 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas. Após cada coleta, o

volume removido foi repostado para manutenção das condições *sink*. As alíquotas foram centrifugadas durante 20 minutos a 3.500 rpm, e o sobrenadante foi coletado e analisado quanto à concentração de naringenina por metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validada. A partir dos resultados, curvas de percentual de naringenina liberada *versus* tempo foram construídas. As eficiências de dissolução (ED %) em cada meio foram calculadas pelas áreas sob a curva (ASC) utilizando o método trapezoidal e os valores analisados e comparados estatisticamente pela ANOVA. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1 Preparação e caracterização das micropartículas de quitosana e lecitina revestidas Eudragit[®] S100

3.4.1.1 Determinação do teor de naringenina das partículas entéricas

Os valores de teor para as partículas entéricas estão apresentados na Tabela 3.1. O teor de fármaco foi expresso em mg de naringenina/ 100 mg de liofilizado. Os valores obtidos foram de 1,36 à 1,97 mg de naringenina/ 100 mg de liofilizado.

Tabela 3.1. Valores de teor e eficiência de encapsulação das partículas entéricas.

Amostra	Teor (mg naringenina/100 mg liofilizado)
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	1,36 (± 0,03)
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	1,97 (± 0,05)
S100-3/QS _{50kDa} 10:1	1,95 (± 0,03)
S100-3/QS _{50kDa} 20:1	1,69 (± 0,01)

3.4.1.2 Caracterização físico-química das micropartículas

3.4.1.2.1 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta das partículas

O diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas de lecitina e quitosana revestidas com o polímero entérico estão apresentados na Tabela 3.2 e na Figura 3.1 estão demonstradas as curvas de distribuição granulométrica obtidas para diferentes amostras. Como pode ser observado nesta tabela, os valores de $d_{4,3}$ ficaram compreendidos entre 49,79 e 101,39 μm , indicando o aumento do tamanho da partícula após revestimento. Este aumento no tamanho das partículas pode estar relacionado à obtenção de aglomerados de partículas após revestimento com o polímero entérico e o procedimento de liofilização.

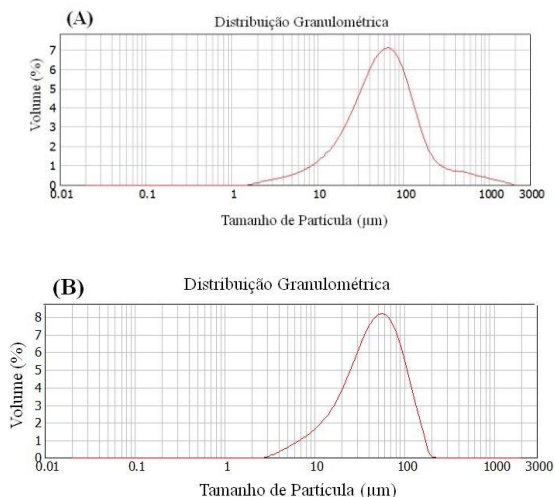


Figura 3.1. Gráficos de distribuição granulométrica para: (A) S100-3/QS_{50kDa} 1:1 entérica e (B) (C) S100-3/QS_{50kDa} 5:1 entérica.

Tabela 3.2. Valores de diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta das micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com Eudragit[®] S100

Amostra	Tamanho (µm)				Span	d _{4,3}	Potencial Zeta (mV)
	d _{10%}	d _{50%}	d _{90%}				
S100/QS _{50kDa} 1:1	15,43	58,70	184,13	2,87	101,39	-19,5	
S100/QS _{50kDa} 5:1	11,20	40,76	103,90	2,27	51,23	-15,7	
S100/QS _{50kDa} 10:1	12,3	41,53	99,61	2,10	49,79	-16,4	
S100/QS _{50kDa} 20:1	13,95	46,15	106,06	1,99	54,06	-19,5	

Os valores de potencial zeta obtidos para as partículas revestidas com Eudragit[®] S100 estão apresentadas na Tabela 3.2. Em todas as amostras observou-se a mudança de carga superficial positiva das partículas nas amostras não revestidas para valores negativos, após adição do polímero de revestimento. A carga negativa, neste caso, é proveniente dos grupamentos carboxílicos dos resíduos do ácido metacrílico (pKa ~4,23) do polímero entérico, indicando que o revestimento das partículas ocorreu de forma efetiva (SHARMA et al., 2011).

4.3.3 Avaliação morfológica das partículas entéricas

A morfologia das partículas revestidas foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme descrito no item 3.3.3. As fotomicrografias obtidas a estão apresentadas na Figura 3.1, onde observou-se que as partículas entéricas são irregulares e que estão depositadas sobre uma matriz.

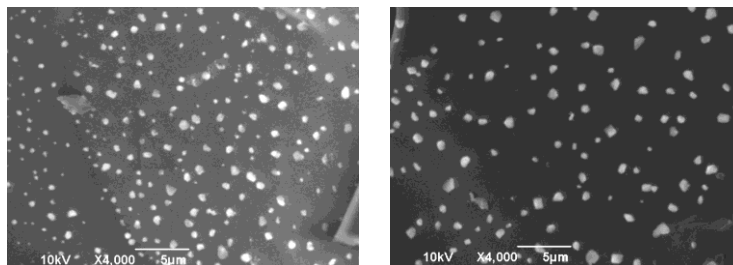


Figura 3.1. Fotomicrografias obtidas por MEV das partículas entéricas S45/QS_{50kDa} 20:1.

3.4.1.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC dos compostos puros utilizados para o preparo das micropartículas revestidas com Eudragit[®] S100 estão apresentadas na Figura 3.3. Como pode ser observado, o Eudragit[®] S100 e a lecitina S100-3 apresentaram endotermas amplas com picos em 195,67 °C e 74,85 °C, respectivamente (Figura 3.3 a e c). A quitosana apresentou endoterma em 167,44 °C correspondente à perda de água de cristalização (Figura 3.3 b) e a naringenina exibiu um evento endotérmico característico de sua fusão a 252,26 °C (Figura 3.3 d) (SEMALTY et al., 2010; SHARMA et al., 2011).

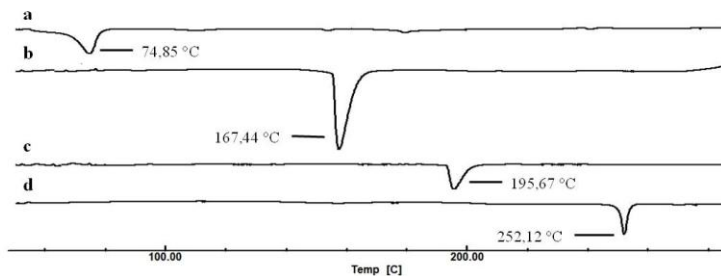


Figura 3.3. Curvas de DSC obtidas para as matérias primas: (a) Lecitina S100-3, (b) Quitosana 50 kDa (c) Eudragit[®] S100 e (d) Naringenina.

A Figura 3.4 apresenta os termogramas obtidos após análise das micropartículas revestidas. Como pode ser observado, eventos endotérmicos em 182,7 °C e 186,27 °C foram obtidos para as amostras S100-3/QS_{50kDa} 1:1 (Figura 3.4, Ia) e S100-3/QS_{50kDa} 20:1 (Figura 3.4, Id), respectivamente, mas não foram observados nas amostras preparadas com a proporção de lecitina e quitosana de 5:1 e 10:1. Esses eventos podem estar associados à perda de água de cristalização da quitosana ou ao deslocamento do evento endotérmico do Eudragit[®] S100. Entretanto, outros experimentos necessitariam ser realizados para confirmar esses resultados. Por outro lado, na Figura 3.4 II pode ser observado o deslocamento do evento endotérmico referente à fusão da lecitina para valores mais baixos evidenciando a presença de interação, conforme discutido em 2.4.3.4.

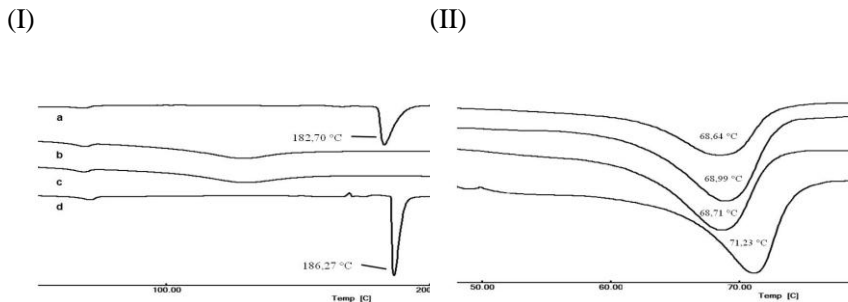


Figura 3.4. Curvas de DSC obtidas para as micropartículas de lecitina e quitosana, revestidas com Eudragit S100; (a) S100-3/QS_{50kDa} 1:1 (b) S100-3/QS_{50kDa} 5:1, (c) S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e (d) S100-3/QS_{50kDa} 20:1.

4.3.5 Espectroscopia de absorção no Infravermelho com transformada de Fourier (FIT-IR)

A espectroscopia de infravermelho das partículas revestidas foi realizada com o objetivo de caracterizar a interação entre o polímero de revestimento e as micropartículas de lecitina/quitosana previamente formadas. A Figura 3.6 apresenta os espectros de infravermelho e dos compostos puros e das micropartículas.

Conforme descrito no item 2.4.3.5, a naringenina exibiu bandas características de sua estrutura química como o estiramento OH em 3410 cm^{-1} e o estiramento C=O em 1658 cm^{-1} (UNSANAN, ERDOGDU, GULLUOGLU, 2008). No espectro da lecitina S100-3 foram observadas bandas em 1731 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento dos grupamentos carbonila dos ácidos graxos e banda em 1234 cm^{-1} correspondente ao grupamento fosfato presente na molécula. A quitosana de 50 kDa apresentou bandas características do grupamento amida em 1653 cm^{-1} e banda em 1561 cm^{-1} correspondente ao grupamento amina protonado devido ao processo de deacetilação parcial da quitina (SARMENTO et al., 2006; SONVICO et al., 2006; DUDHANI, KOSARAJU, 2010).

O Eudragit[®] S100 é um polímero que apresenta grupamentos éster e de ácido carboxílico, portanto a banda de absorção a 1725 cm^{-1} correspondente à vibração assimétrica do grupamento carbonila (RAFFIN et al., 2006; SHARMA et al., 2011).

Nas micropartículas observou-se um deslocamento da banda do grupamento fosfato da lecitina de 1234 cm^{-1} para 1260 cm^{-1} , deslocamento de absorção dos grupamentos amina da quitosana de 1561

cm^{-1} para 1574 cm^{-1} e deslocamento da banda do grupamento COO^- do Eudragit® S100 de 1725 cm^{-1} para 1737 cm^{-1} . Estas mudanças sugerem que além da interação entre lecitina e quitosana previamente discutida, houve a interação destes sistemas com o polímero de revestimento, tornando as partículas gastrorresistentes.

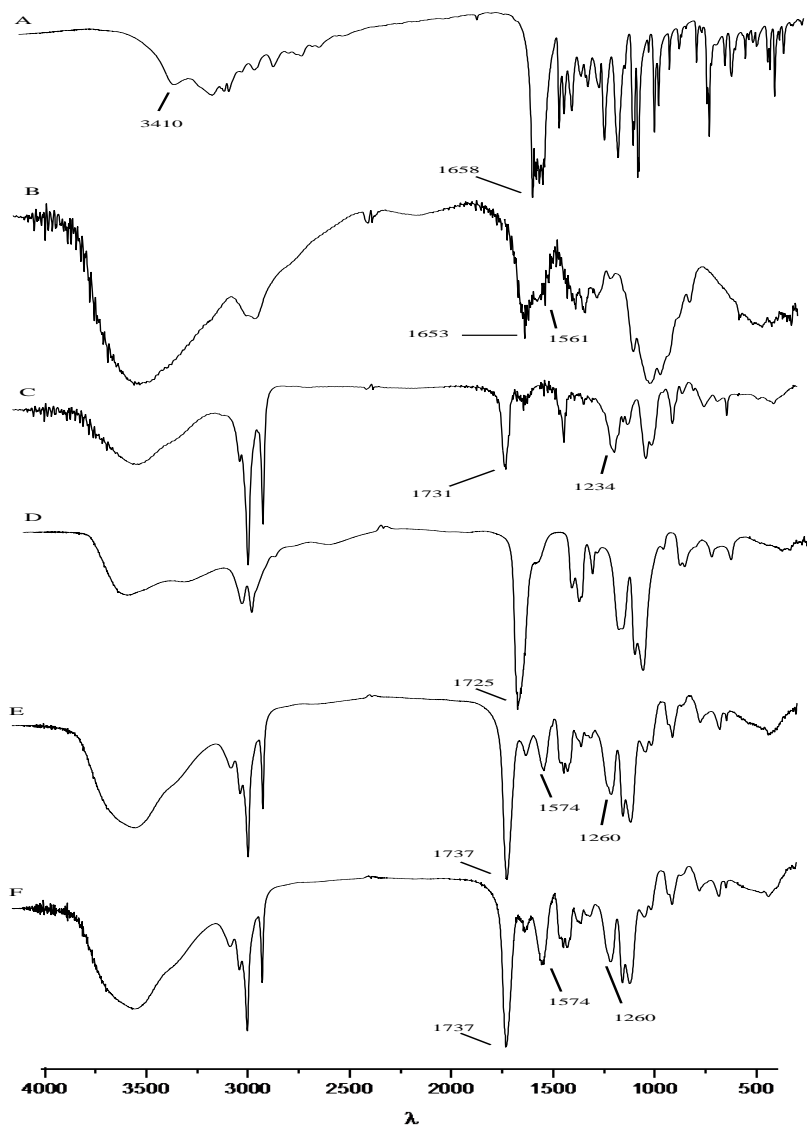


Figura 3.6. Espectros de FIT-IR da (A) Naringenina, (B) Quitosana $\text{QS}_{50\text{kDa}}$, (C) Lecitina S100-3, (D) Eudragit[®] S100, (E) S100-3/ $\text{QS}_{50\text{kDa}}$ 10:1 revestida e (F) S100-3/ $\text{QS}_{50\text{kDa}}$ 20:1 revestida.

3.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da naringenina

Na Figura 3.7 encontram-se mostradas as curvas de calibração da naringenina, nos meios gástrico simulado pH 1,2 (FGS), intestinal simulado pH 6,8 (FIS) e biorrelevante colônico (FaSSCoF) após análise das soluções padrões por CLAE. Os dados obtidos após análise da regressão para as três curvas encontram-se sumarizados na Tabela 3.3. Os resultados mostraram que as curvas de calibração foram lineares, nas faixas de concentração testadas.

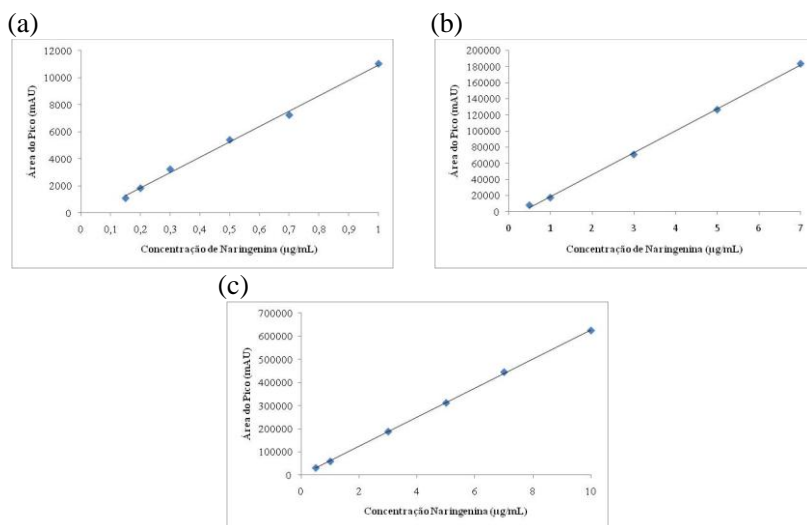


Figura 3.7. Curvas de calibração da naringenina obtidas após análises por CLAE. (a) fluido gástrico simulado pH 1,2 (FGS); (b) fluido intestinal simulado pH 6,8 (FIS); (c) fluido biorrelevante colônico (FaSSCoF).

Tabela 3.3. Resultados obtidos após análise da regressão das curvas de calibração da naringenina nos diferentes meios de dissolução.

	FGS	FIS	FaSSCoF
Faixa de concentração (µg/mL)	0,15-1,0	0,5-7,0	0,5-10,0
Equação da reta	$y = 11353x - 431,45$	$y = 27185x - 8596,9$	$y = 62757x - 882,79$
r^2	0,998	0,999	0,999

Os perfis de liberação da naringenina a partir das micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com Eudragit nos meios gástrico simulado pH 1,2 e intestinal simulado pH 6,8, e no meio biorrelevante colônico estão apresentados na Figuras 3.8 e 3.9, respectivamente. Como pode ser observado, cerca de 8 a 11% da naringenina foi liberada nas duas primeiras horas no FGS, indicando que o revestimento das partículas com Eudragit S100 foi efetivo e conduziu à obtenção de sistemas gastrorresistentes. No FIS pH 6,8 houve uma liberação de cerca de 86 a 90,33% após quatro horas de experimento, estando acima do esperado, pois o pH do meio intestinal simulado é de 6,8. Porém acredita-se que, mesmo que a liberação tenha ocorrido em pH ligeiramente menor que o pH em que o Eudragit® S100 é solúvel (pH >7,0), com as condições de agitação e temperatura podem ter promovido a dissolução dos sistemas desenvolvidos. Por outro lado, no FaSSCoF observou-se a liberação de praticamente 100 % da naringenina após quatro horas, confirmando, desta maneira, que as partículas são capazes de promover a liberação completa do fármaco na região colônica, no local da inflamação.

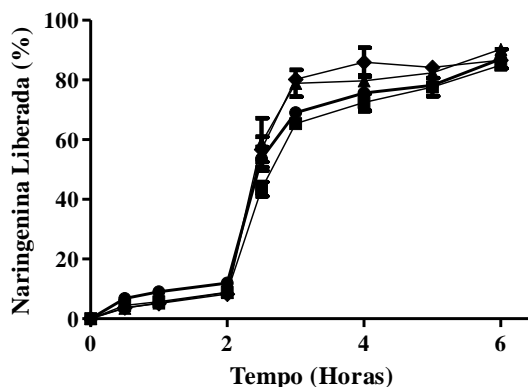


Figura 3.8. Perfis de liberação de naringenina nos meios FGS pH 1,2 (0 – 2 horas) seguido de FIS pH 6,8 (2 – 6 horas) —◆— S100-3/QS_{50kDa} 1:1; —■— S100-3/QS_{50kDa} 5:1; —▣— S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e —▲— S100-3/QS_{50kDa} 20:1.

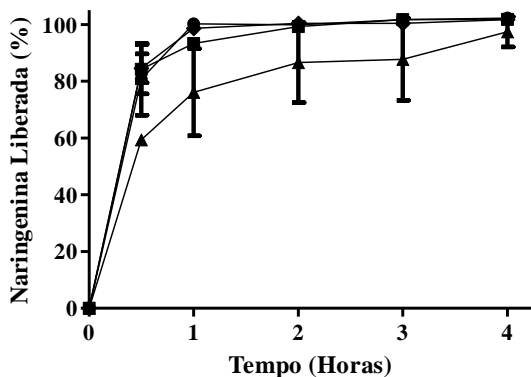


Figura 3.9. Perfis de liberação de naringenina no meio de dissolução FaSSCoF pH 7,8 para as partículas entéricas \blacklozenge S100-3/QS_{50kDa} 1:1; \blacksquare S100-3/QS_{50kDa} 5:1; \bullet S100-3/QS_{50kDa} 10:1 e \blacktriangle S100-3/QS_{50kDa} 20:1.

Para verificar se os perfis de liberação foram significativamente diferentes, os valores de eficiência de dissolução (ED%) para cada amostra foram calculados conforme descrito no item 3.3.4.3 (Tabela 3.4). As ED % foram analisadas e comparadas por ANOVA e os resultados são apresentados na Tabela 3.5. Como pode ser observado, o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor de $F_{\text{crítico}}$ para o meio de dissolução. A diferença estatística para a ED % no meio FGS foi esperada, uma vez que as partículas foram consideradas gastrorresistentes. Porém, também houve diferença estatística na ED% da naringenina no FIS em relação ao FaSSCoF. Isso indica que mesmo as amostras apresentem uma porcentagem alta de dissolução antes da sua chegada no cólon, esta liberação ainda é estatisticamente menor do que a liberação que ocorreria em meio colônico. Por outro lado, a proporção lecitina/quitosana nas partículas não afetou significativamente a taxa de dissolução da naringenina, visto que o valor de $F_{\text{calculado}}$ para esse caso, foi menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$, para um nível de significância de 5%.

Tabela 3.4. Valores de eficiência de dissolução da naringenina obtidos a partir dos perfis de liberação do fármaco nos diferentes meios de dissolução.

Amostra	Eficiência de Dissolução (%) \pm DP		
	FGS	FIS	FaSSCof
S100-3/QS _{50kDa} 1:1	4,90 (\pm 0,09)	75,51 (\pm 1,12)	92,00 (\pm 2,82)
S100-3/QS _{50kDa} 5:1	5,35 (\pm 0,095)	65,53 (\pm 3,09)	89,36 (\pm 1,86)
S100-3/QS _{50kDa} 10:1	8,08 (\pm 1,49)	69,02 (\pm 2,27)	92,29 (\pm 4,21)
S100-3/QS _{50kDa} 20:1	5,08 (\pm 0,6)	73,96 (\pm 3,55)	87,02 (\pm 3,39)

Tabela 3.5. ANOVA da eficiência de dissolução.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{crítico}
Meio Dissolução	44.697,8872	2	22.348,94	624,1705	3,4028
Proporção LC/QS	191,2544	3	63,7515	1,7805	3,0088
Meio Dissolução + Proporção LC/QS	545,0706	6	90,8451	2,5372	2,5082
Resíduo	859,34	24	35,8058		
Total	46.293,5522	35			

$\alpha = 0,05$.

DISCUSSÃO GERAL

Compostos polifenólicos naturais e seus análogos constituem um grupo heterogêneo de metabólitos secundários vegetais conhecidos por apresentar várias atividades biológicas. Estes compostos são classificados quimicamente em ácido fenólicos e análogos, estilbenos, flavonóides e um quarto grupo que inclui as cumarinas, lignanos e taninos (FRESCO et al., 2006). A naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) é uma flavanona amplamente distribuída nas frutas cítricas, tomate, cereja, toranja e no cacau. A naringenina tem demonstrado exibir inúmeras atividades farmacológicas, incluindo atividade antiinflamatória, antioxidante e antitumoral (YEN et al., 2009). Estudos anteriores evidenciaram a atividade antiinflamatória na naringenina em modelo de colite ulcerativa em camundongos induzida por dextrana sulfato de sódio, sendo, desta maneira, um fármaco promissor para o tratamento das desordens inflamatórias intestinais (AMARO et al., 2009).

Entretanto, a atividade farmacológica *in vivo* dos compostos polifenólicos tem sido limitada por diversos fatores. Tais compostos, na sua forma aglicona, exibem baixa solubilidade aquosa, o que limita a sua solubilização nos fluidos biológicos. Além disso, muitos estudos mostraram que os compostos polifenólicos são extensivamente metabolizados pela microflora colônica, durante sua passagem pelo intestino, e pelo fígado, resultando na alteração significativa das espécies encontradas na circulação sistêmica (WALLE et al., 2005; SOOBRAATTEE et al., 2005, YEN et al., 2009).

Diante do exposto, o desenvolvimento de nano- e micropartículas foi proposto neste trabalho, visando a liberação da naringenina na região colônica após administração oral e a melhoria da eficácia terapêutica. Para atingir esse objetivo, esse trabalho explorou a estratégia de liberação retardada do fármaco pela obtenção de uma forma farmacêutica gastrorresistente, associada às propriedades de controle de liberação e mucoadesivas da quitosana. Além disso, nano e micropartículas apresentam potencial de permanecer mais tempo retidas nos tecidos inflamados devido ao efeito EPR (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*) e à capacidade de serem fagocitadas pelas células imunes no sítio da inflamação (VASIR, REDDY, LABHASERWAR, 2005; GEORGE & ABRAHAM, 2006; SENYIGIT et al., 2010; VAN DER HOVEN et al., 2011). As partículas foram obtidas pela técnica de interação iônica da lecitina e quitosana, seguida do revestimento com o Eudragit® S100. A técnica de interação iônica tem recebido grande atenção nos últimos anos devido ao fato de ser um

processo simples e fácil de ser realizado. A formação das partículas ocorre espontaneamente através das interações eletrostáticas dos polieletrólitos de cargas opostas sob condições moderadas, garantindo que o fármaco encapsulado seja protegido de estresses químicos e físicos durante o processo de fabricação (CHUAH et al., 2009; PARK et al., 2009). Como revestimento gastrorresistente foi utilizado o Eudragit[®] S100 (copolímero do ácido metacrílico e metilmetacrilato razão 1:2) o qual é insolúvel em ácidos e solúvel em pH acima de 7,0, sendo ideal para a liberação íleo-colônica de fármacos. O Eudragit[®] S100 ioniza-se nas condições de pH elevado do intestino delgado, dissolvendo-se no local e permitindo a liberação do fármaco (RAFFIN et al., 2006; LIU & BASIT, 2010).

Assim, para melhor compreensão esse trabalho foi dividido em capítulos, o primeiro referente à revisão bibliográfica sobre o tema, o segundo sobre a obtenção de nano- e micropartículas de lecitina e quitosana pela técnica de interação iônica e o terceiro sobre a obtenção de micropartículas de lecitina e quitosana revestidas com o polímero gastrorresistente, incluindo ensaios de dissolução. No primeiro capítulo, o efeito de diferentes variáveis de formulação sobre as características finais das partículas foi estudado. Essas variáveis foram a massa molar da quitosana, o tipo de lecitina e a proporção de lecitina e quitosana nas formulações. Uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada para determinação do teor da naringenina nas partículas, e provou ser um método sensível, linear, preciso, exato e robusto. A eficiência de encapsulação da naringenina nas partículas de lecitina/quitosana foi superior a 94,5 % para todas as amostras, indicando que esse fármaco encontra-se preferencialmente associado às partículas. Entretanto, visto que no pH das formulações a naringenina não apresenta carga, esta associação ocorreu provavelmente por interações hidrofóbica, com os sítios hidrofóbicos da partícula. Por outro lado, o tamanho e o potencial zeta das partículas foram fortemente afetados pela composição das formulações. Entretanto, as fotomicrografias das partículas exibiram tamanhos de partícula menores que aqueles determinados pela técnica de difração a laser, o que pode ser explicado pela tendência que essas partículas apresentam em formar agregados (*clusters*). Estudos de DSC mostraram que a naringenina associada às nano- e micropartículas está no seu estado molecular, devido a ausência da sua endoterma de fusão em 252,12 °C. A interação entre a lecitina e a quitosana foi observada, sobretudo, após análise das partículas por FIT-IR. Finalmente, nesse trabalho foi evidenciado que

partículas de lecitina e quitosana são fagocitadas pelos macrófagos murinos, sendo esta uma característica vantajosa para o tratamento de inflamações do cólon, conforme exposto anteriormente.

Após estudos de formulação iniciais, o revestimento das partículas foi realizado mediante a incubação das mesmas em uma solução de Eudragit® S100 pH 9,0. A técnica de revestimento foi baseada no fato que o Eudragit® S100 é um polímero aniônico e poderia interagir por meio de interações eletrostáticas com a superfície das partículas carregadas positivamente, em decorrência da presença dos grupamentos amino da quitosana na superfície das partículas. Esse efeito foi demonstrado pela alteração dos valores de potencial zeta das formulações. Entretanto, o tamanho das partículas aumentou consideravelmente, devido à formação de agregados. É possível que o revestimento não tenha sido realizado sobre partículas individualizadas, mas sim englobando aglomerados de partículas de lecitina e quitosana. Além disso, a operação de liofilização pode ter afetado a estrutura final das partículas, uma vez que essa etapa não foi realizada com auxílio de agentes crioprotetores.

Os perfis de liberação da naringenina foram obtidos em meios simulado gástrico pH 1,2, simulado entérico pH 6,8 e meio biorrelevante colônico pH 7,8. A liberação da naringenina no FGS foi baixa, mostrando que o revestimento com o Eudragit® S100 foi efetivo e levou à obtenção de partículas gastrorresistentes. No FIS houve um perfil liberação entre 86,64 % e 90,33 % após quatro horas de experimento, estando acima do esperado, pois o pH do meio intestinal simulado é de 6,8. No FaSSCoF observou-se a liberação de praticamente 100 % de naringenina após quatro horas de experimento, confirmando, desta maneira, que os sistemas são capazes de se dissolverem em meio colônico, permitindo a liberação do fármaco no local da ação. A análise estatística dos valores de eficiência de dissolução indicou que a liberação da naringenina foi significativamente diferente nos três meios de dissolução estudados, entretanto, a liberação não foi afetada pela proporção de lecitina/quitosana nas formulações.

O desenvolvimento de formulações de liberação colônica ainda é um desafio para formuladores. Não somente aspectos relacionados à mudança de pH ao longo do TGI devem ser considerados. O movimento de uma forma farmacêutica através do trato gastrointestinal em pacientes com DII também necessita ser entendida. Se o trânsito é muito rápido, particularmente no cólon, a liberação do fármaco pode ser incompleta resultando na perda da eficácia. Da mesma forma, um

trânsito excessivamente lento pode levar a quantidades inadequadas de fármaco alcançando as porções distais do intestino (FRIEND, 1998).

O tempo de esvaziamento gástrico de formas farmacêuticas no estômago é variável inter e intraindividualmente e depende de vários fatores, podendo demorar de alguns minutos até 2 horas, dependendo do momento da administração. O tempo de trânsito no intestino delgado é relativamente constante, sendo de aproximadamente 3 ± 1 hora e não é afetado pelo estado de nutrição ou pela natureza da refeição. O intestino delgado não distingue entre líquido e sólido, ou discrimina sólidos de diferentes dimensões ou densidades, pois o tempo de trânsito nesta região é independente da forma farmacêutica. O tempo de residência de formas farmacêuticas no cólon é um processo descontínuo e consiste em períodos de trânsito rápido separados por várias horas de pouco ou nenhuma progressão. Em indivíduos normais, o tempo de trânsito na região proximal é de cerca de 7 até 11 horas. No colo esquerdo é de cerca de 9 a 11 horas e no colo sigmóide de 22 até 36 horas (FREIRE et al., 2006).

Tanto o tempo de trânsito quanto as variações de pH ao longo do TGI em pacientes com DII pode variar muito daquele apresentado por indivíduos saudáveis. Os valores de pH demonstram uma grande variabilidade inter-individual e alguma dependência nos segmentos do intestino delgado e grosso. Em pacientes com DII (tanto UC quanto CD), o pH no intestino delgado varia de 6,0 a 8,5, na porção terminal do intestino delgado de 7,6 a 9,2, no ceco de 6,3 a 7,4, no cólon direito de 6,3 a 7,8 e no cólon esquerdo de 5,9 a 7,7. No geral, esta variabilidade inter-individual de pH compreende 2 unidades as quais contribuem para a variação da liberação intestinal de fármacos (KLOTZ, SCHWAB, 2005). O tempo de trânsito em pacientes com DII também varia em relação aos indivíduos saudáveis, principalmente devido à inflamação da mucosa e os distúrbios que esta inflamação produz (FRIEND, 2005).

Outro desafio para liberação de fármacos sítio específico é o conhecimento do local no intestino que é acometido pela doença. As duas desordens inflamatórias intestinais, colite ulcerativa e doença de Crohn são diagnosticadas em porções diferentes do TGI (figura 4.1). Estudos indicaram que na UC, os sítios de inflamação se estendem nas regiões mais proximais do cólon na maioria das vezes. Já na CD, o sítio de inflamação predominante é o íleo distal, sendo que apenas 30 % a 40 % dos pacientes possuem um envolvimento colônico significativo (BOTH et al., 1983; FRIEND, 2005).

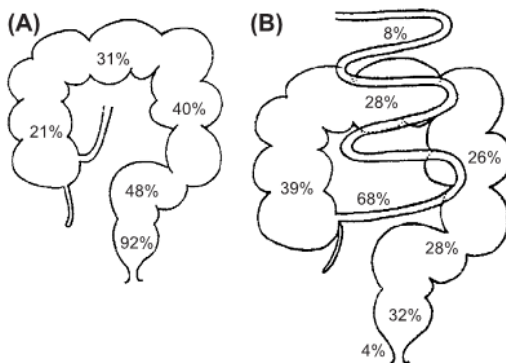


Figura 4.1. Localização de diagnóstico em pacientes com UC (A) e CD (B). Estes valores indicam a porcentagem de pacientes com envolvimento em cada segmento intestinal.

Adaptado de: FRIEND, 2005.

Levando em consideração a variação de pH, o tempo de trânsito e também o fato das duas doenças inflamatórias intestinais acometerem porções diferentes do intestino, é possível concluir através dos ensaios de dissolução que pacientes com CD seriam mais beneficiados pela administração do sistema desenvolvido neste trabalho do que pacientes portadores de UC. Isso pode ser explicado, pois as partículas liberaram cerca de 85 % de naringenina em fluido intestinal simulado, que foi utilizado para mimetizar o meio fisiológico na porção final do intestino delgado (íleo distal), justamente onde a maioria dos pacientes com CD são diagnosticados. Já para os pacientes com UC, esta alta liberação de fármaco antes da chegada da forma farmacêutica no ambiente colônico prejudicaria a eficácia do tratamento. Porém não é possível generalizar esta conclusão afirmando que não haveria benefícios na administração dessas nano- e micropartículas em pacientes com UC, pois os estudos acima mencionados enfatizam que os sítios exatos e a extensão das lesões intestinais e também a grande variabilidade inter-individual na fisiologia do organismo devem ser levadas em conta para o desenvolvimento de qualquer forma farmacêutica de liberação colônica.

CONCLUSÕES

- A preparação de nano- e micropartículas de lecitina e quitosana contendo naringenina pela técnica de interação iônica mostrou ser viável e de simples execução.
- O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do teor de naringenina nas nano- e micropartículas provou ser sensível, linear, preciso, exato e robusto.
- Os valores de eficiência de encapsulação da naringenina nas nano- e micropartículas de lecitina e quitosana foram acima de 94,5%, indicando que o fármaco encontra-se preferencialmente associado às partículas. O teor de naringenina nas suspensões de nano- e micropartículas não revestidas variaram de 262,41 a 386,31 µg/mL.
- Os valores de tamanho de partícula e distribuição granulométrica das nano e micropartículas de lecitina e quitosana obtidos por difração à laser variaram significativamente, dependendo do tipo de quitosana e de lecitina empregados. Valores de potencial zeta evidenciaram carga superficial positiva a qual foi afetada pela massa molar da quitosana e pela proporção de lecitina e quitosana nas formulações. A presença de interações entre a lecitina e quitosana foram visualizados principalmente por FIT-IR. Os estudos de calorimetria exploratória diferencial comprovaram a presença da naringenina nos sistemas no seu estado molecular. As micrografias de microscopia eletrônica evidenciaram a formação de partículas esféricas, com tendência a formar agregados.
- A captura das partículas por macrófagos murinos J774 foi evidenciada por microscopia de fluorescência, após encapsulação do fluorocromo vermelho de Nilo, indicando que as mesmas são passíveis de serem fagocitadas no sítio da inflamação.
- O revestimento das micropartículas de lecitina e quitosana mostrou ser efetivo, sendo evidenciado pela alteração da carga superficial das partículas de valores positivos para negativos. Entretanto, tamanhos maiores de partícula foram verificados, provavelmente devido ao revestimento de agregados. Entretanto, o efeito da liofilização ocasionando a alteração da estrutura final das partículas não foi descartado. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a presença de partículas

esféricas ou irregulares depositadas sob uma matriz. Entretanto a estrutura das partículas não pode ser elucidada por essa técnica. A interação da quitosana com o Eudragit[®] S100 foi verificada por FIT-IR.

- A liberação da naringenina a partir das partículas em fluido gástrico simulado pH 1,2 variou de 8,27 e 11,98 %, confirmando o caráter gastrorresistente das mesmas. Em fluido simulado intestinal pH 6,8 e em fluido colônico simulado pH 7,8, a liberação da naringenina variou de 85 a 90,33 % e de 97,63 a 101,83 %, respectivamente, após 4 horas de experimento. A análise da variância mostrou que a liberação da naringenina foi significativamente diferente, em função do meio de dissolução. Entretanto, a liberação não foi afetada pela proporção de lecitina e quitosana nas formulações.
- A encapsulação da naringenina em nano- e micropartículas demonstrou ser uma estratégia promissora para a melhoria das propriedades do fármaco e o revestimento entérico destes sistemas possibilitou a liberação da naringenina em condições que mimetizam o meio intestinal e colônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S., FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, p.1688-1713, 2006.

AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.100, p.5-28, 2004.

AHSAN, R., RIVAS, I. P., KHAN, M. A., SUAREZ, A. I. T. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulates carriers – liposomes and microspheres – on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release*, v.79, p.29-40, 2002.

ALLEN, T. M., CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, v.303, p.1818-1822, 2004.

ALVAREZ-ROMAN, R., MERINO, G., KALIA, Y. N., NAIK, A., GUY. Skin Permeability Enhancement by Low Frequency Sonophoresis: Lipid Extration and Transport Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.92(6), p.1138-1146, 2003.

AMARO, M.I., ROCHA, J., VILA-REAL, H., EDUARDO-FIGUEIRA, M., MOTA-FILIPPE, H., SEPODES, B., RIBEIRO, M. H. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesized naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Research International*, v.42, p.1010-1017, 2009.

AMIDI, M., MASTROBATTISTA, E., JISKOOT, W., HENNINK, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.59-82, 2010.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,
Resolução n° 899 de 19 de maio de 2003.

ARSLAN, H., HAZER, B., YOON, S. C. Grafting of Poly(3-hydroxialkanoate) and Linoleic Acid onto Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, v.103, p.81-89, 2007.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.56, p.290-299, 2010.

BAMIAS, G., NYCE, M. R., DE LA RUE, S. A., COMINELLI, F. New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Physiology in Medicine*, v.143, p.895-904, 2005.

BASIT, A., BLOOR, J. Perspectives on colonic delivery. Business Briefing: *Pharmaceutical Technology*, p.185-190, 2003.

BAUMGART, D. C., SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Gastroenterology* 2, v.369, p.1641-1657, 2007.

BOTH, H., TORP-PEDERSEN, K., KREINER, S., HENDRIKSEN, C., BINDER, V., Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease on a regional patient group. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v.18, p.987-991, 1983.

BURDA, S., OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.49, p.2774-2779, 2001.

CARTER, M. J., LOBO, A. J., TRAVIS, S. P. L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, v.53 (Suppl V), p.1-17, 2004.

CERVERA, M. F., HEINAMAKI, J., DE LA PAZ, N., LOPEZ, O., MAUNU, S. L., VIRTANEN, T., HATANPAA, T., ANTIKAINEN, O., NOGUEIRA, A., FUNDORA, F., YLIRUUSI, J. Effects of Spray Drying on Physicochemical Properties of Chitosan Acid Salts. *AAPS Pharmaceutical Sciences Technology*, p.1-13, 2001.

CHOURASIA, M. K., JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, v.6(1), p.33-66, 2003.

CHUAH, A. M., KUROIWA, T., ICHIKAWA, S., KOBAYASHI, I., NAKAJIMA, M. Formation of Biocompatible Nanoparticles via the Self-Assembly of Chitosan and Modified Lecithin. *Journal of Food Sciences*, v.74(1), p.N1-N8, 2009.

CONTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins Patologia Funcional e Estrutural, 6^a ed. Rio de Janeiro, 2000, cap 18, p. 733-737.

COOK, N. C., SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, v.7, p. 66-76, 1996.

CRCAREVSKA, M. S., DODOV, M. G., GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonid for delivery to the inflamed colonic mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.68, p.565-578, 2008.

CROFT, K. D. The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids. *Annals New York Academy of Sciences*, p.435-442, 1998.

CUI, Z., QIU, F., SLOAT, B. R. Lecithin-based cationic nanoparticles as a potencial DNA delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v.313, p.206-213, 2006.

DELIE, F. Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery*, v.34, p.221-223, 1998.

DESAI, M. P., LABHASETWAR, V., AMIDON, G. L., LEVY, R. J. Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size. *Pharmaceutical Research*, v.13(12), p.1838-1845, 1996.

DODANE, V., KHAN, M. A., MERWIN, J. R., Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, v.182, p.21-32, 1999.

DUDHANI, A., KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v.81, p.243-251, 2010.

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, 2010.

FOGED, C., BRODIN, B., FROKJAER, S., SUNDBLAD, A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.298, p.315-322, 2005.

FREIRE, A. C., PODCZECK, F., SOUZA, J., VEIGA, F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II – Tipos de sistemas utilizados. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42(3), p.337-355, 2006.

FREIRE, A. C., PODCZECK, F., SOUSA, J., VEIGA. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I – O cólon como local de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42(3), p.319-335, 2006.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.247-265, 2005.

FRIEND, D. R. Review article: issues in oral administration of locally acting glucocorticosteroids for treatment of inflammatory bowel disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v.12, p.591-603, 1998.

FRESCO, P., BORGES, F., DINIZ, C., MARQUES, M. P. M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, v. 26, n. 6, p.747-766, 2006.

GEIER, M. S., BUTLER, R. N., HOWARTH, G. S. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v.115, p.1-11, 2007.

GEORGE, M., ABRAHAM, T. E., Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v.114, p.1-14, 2006.

GERELLI, Y., BARBIERI, S., DI BARI, M. T., DERIU, A., CANTÚ, L., BROCCA, P., SONVICO, F., COLOMBO, P., MAY, R., MOTTA, S. Structure of Self-Organized Multilayer Nanoparticles for Drug Delivery. *Langmuir*, v.24, p.11378-11384, 2008.

GREENSPAN, P., MAYER, E. P., FOWLER, S. D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *Journal of Cell Biology*, v.100, p.965-973, 1985.

HAFNER, A., LOVRIC, J., VOINOVICH, D., GRCIC, J. F., Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterization and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.381, p.205-213, 1009.

HÄMÄLÄINEN, M., NIEMINEN, R., VUORELA, P., HEINONEN, M., MOILANEN, E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, p.1-10, 2007.

HANAUER, S. B. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Inflammatory Bowel Disease*, v.12, p.S3-S9, 2006.

HE, P., DAVIS, S. S., ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.166, p.75-68, 1998.

HEAD, K. A., JURENKA, J. S. Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alternative Medicine Review*, v.8(3), p.247-283, 2003.

HEJAZI, R., AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v.89, p.151-165, 2003.

HENDRICKSON, B. A., GOKHALE, R., CHO, J. H. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15(1), p.79-94, 2002.

HIRAI, S., KIM, Y. I., GOTO, T., KANG, M. S., YOSHIMURA, M., OBATA, A., YU, R., KAWADA, T. Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sciences*, v. 81, p. 1272-1279, 2007.

HO, G. T., LEES, C., SATSANGI, J. Ulcerative Colitis. *Medicine*, v.35(5), p.277-281, 2007.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: methodology, Q2B, 2005.

IRLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperidin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, v.24, p.851-874, 2004.

KLEIN, A., ELIAKIM, R. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals*, v.3, p.1084-1092, 2010.

KLOTZ, U., SCHWAB, M. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.267-279, 2005.

KUMAR, M. N. V. R., MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, p.6017-6084, 2004.

KUMAR, P., MISHRA, B. Colon Targeted Drug Delivery Systems – An Overview. *Current Drug Delivery*, v. 5, p. 186-198, 2008.

LAMPRECHT, A., SCHAFER, U., LEHR, C. M., Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. *Pharmaceutical Research*, v.18(6), p.788-793, 2001.

LAMPRECHT, A., UBRICH, N., YAMAMOTO, H., SCHAFER, U., TAKEUCHI, H., MAINCENT, P., KAWASHIMA, Y., LHER, C. M. Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.299(2), p.775-781, 2001.

LEONARDUZZI, G., TESTA, G., GAMBA, P., POLI, G. Design and Development of Nanovehicle-Based Delivery Systems for Preventive or Therapeutic Supplementation with Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, v.17, p.74-95, 2010.

LIU, Z., JIAO, Y., WANG, Y., ZHOU, C., ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, p.1650-1662, 2008.

LIU, F., BASIT, A. W. A paradigm shift on enteric coating: Achieving rapid release in the proximal small intestine of man. *Journal of Controlled Release*, v.147, p.242-245, 2010.

MEISSNER, Y., LAMPRECHT, A. Alternative Drug Delivery Approaches for the Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97(8), p. 2878-2891, 2008.

MLADENOVSKA, K., CRUAUD, O., RICHOMME, P., BELANIE, E., RAICKI, R. S., VENIER-JULIENNA, M. C., POPOVSKI, E., BENOIT, J. P., GORACINOVA, K. 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.345, p.59-69, 2007.

MOON, Y. J., WANG, X., MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, v.20, p.187-210, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v.385, p.113-142, 2010.

MUELLER, M., HOBIGER, S., JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, v.122, p.987-996, 2010.

PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K., KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.61, p.28-41, 2010.

NAKASE, H., OKASAKI, K., TABATA, Y., UOSE, S., OHANA, M., UCHIDA, K., MATSUSHIMA, Y., KAWANAMI, C., OSHIMA, C., IKADA, Y., CHIBA, T. Development of an Oral Drug Delivery System Targeting Immune-Regulating Cells in Experimental Inflammatory Bowel Disease: A New Therapeutic Strategy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.292(1), p.15-21, 2000.

PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K., KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.61, p.28-41, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastrointestinal tract: From the mouth to the colon. *International Journal of Pharmaceutics*, v.395, p.44-52, 2010.

RAO, S. S. C., READ, N. W., BROWN, C., BRUCE, C., HOLDSWORTH, C. D. Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, v.93, p.934-940, 1987.

RAFFIN, R. P., COLOMÉ, L. M., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.63, p.198-204, 2006.

RANALDI, G., MARIGLIANO, I., VESPIGNANI, I., PEROZZI, G., SAMBUY, Y. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.157-167, 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v.31, p.603-632, 2006.

RODRÍGUEZ, M., VILA-JATO, J., TORRES, D. Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug release to the colonic region. *Journal of Controlled Release*, v.55, p.67-77, 1998.

SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F., RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, v.66, p.1-7, 2006.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology & Hepatology*, v.3(7), p.390-407, 2006.

SATSANGI, J., MORECROFT, J., SHAH, N. B., NIMMO, E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.17(1), p.3-18, 2003.

SEMALTY, A., SEMALTY, M., SINGH, D., RAWAT, M. S. M. Preparation and characterization of phospholipid complexes of naringenin for effective drug delivery. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v.67, p.253-260, 2010.

SENYIGIT, T., SONVICO, F., BARBIERI, S., SANTI, P., COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of Controlled Release*, v.142, p.368-373, 2010.

SINGH, B. N. Modified-Release Solid Formulations for Colonic Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v.1, p.53-63, 2007.

SINHA, V. R., KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.224, p.19-38, 2001.

SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, K., BANSAL, K., DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.274, p.1-33, 2004.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v.987, p.57-66, 2003.

SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease – therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.809-818, 2004.

SHARMA, M., SHARMA, V., PANDA, A. K., MAJUMDAR, D. K. Enteric Microsphere Formulations of Papain For Oral Delivery. *The Pharmaceutical Society of Japan*, v. 131(5), p.697-709, 2011.

SONAJE, K., CHEN, Y. J., CHEN, H. L., WEY, S. P., JUANG, J. H., NGUYEN, H. N., HSU, C. W., LIN, K. J., SUNG, H. W. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, v.31, p.3384-3394, 2010.

SONVICO, F., CAGNANI, A., ROSSI, A., MOTTA, S., DI BARI, M. T., CAVATORTA, F., ALONSO, M. J., DERIU, A., COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v.324, p.67-73, 2006.

SONVICO, F., BARBEIRI, S., ROSSI, A., MOTTA, S., BETTINI, R., DERIU, A., COLOMBO, P. Lecithin-chitosan self-organizing nanoparticles as drug carriers for lipophilic drugs. *XVIth Internacional Workshop on Bioencapsulation*, p.1-4, 2006.

SOBRATTEE, M. A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O. I., BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, v.579, p.200-213, 2005.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. ., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v.70, p.1-20, 2001.

TABATA, Y., INOUE, Y., IKADA, Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. *Vaccine*, v.14(17/18), p.1677-1685, 1996.

THAKRAL, N. K., RAY, A. R., MAJUMDAR, D. K. Eudragit S-100 entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p.2691-2699, 2010.

THOMPSON-CHAGOYÁN, O. C., MALDONADO, J., GIL, A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition*, v.24, p.339-352, 2005.

TORCHILIN, V., Drug Targeting. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, v.11, S.2, p.S81-S91, 2000.

TOZAKI, H., KOMOIKE, J., TADA, C., MARUYAMA, T., TERABE, A., SUZUKI, T., YAMAMOTO, A., MURANISHI, S. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 1016-1021, 1997.

UNSANLAN, O., ERDOGDU, Y., GULLUOGLU, T. FT-Raman and FT-IR spectral and quantum chemical studies on some flavonoid derivatives: Baicalein and Naringenin. *Journal of Raman Spectroscopy*, v.40, p.562-570, 2009.

USP 32 – Farmacopéia Americana, 32ª edição, 2009.

VANDAMME, Th. F., LENOURRY, A., CHARRUEAU, C., CHAUMEIL, J-C. The use os polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, v.48, p. 219-231, 2002.

VAN DER BIJL, P., VAN EYK, A. D. Comparative in vitro permeability of human vaginal, small intestine and colonic mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, v.261, p.147-152, 2003.

VAN DER HOVEN, J. M., VAN TOMME, S. R., METSELAAR, J. M., NUIJEN, B., BEIJNEN, J. H., STORM, G. Liposomal Drug Formulations in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Molecular Pharmaceutics*, 2011.

VAN DER MOOTER, G.; KINGET, R. Oral-colon-specific drug delivery: a review, *Drug delivery*, v.2, p.81-93, 1995 *apud* FREIRE, A. C., PODCZECK, F., SOUSA, J., VEIGA. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I – O cólon como local de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42(3), p.319-335, 2006.

VASIR, J., REDDY, M. K., LABHASETWAR, V. D. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Current Nanoscience*, v.1, p.47-64, 2005.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v.26(5), p.1025-1058, 2008.

VERTZONI, M., DIAKIDOU, A., CHATZILIAS, M., SODERLIND, E., ABRAHAMSSON, B., DRESSMAN, J. B., REPPAS, C. Biorelevant Media to Simulate Fluids in the Ascending Colon of Humans and Their Usefulness in Predicting Intracolonic Drug Solubility. *Pharmaceutical Research*, v.27, p.2187-2196, 2010.

VIJAY, S., SATI, O. P., MAJUMDAR, D. K. Acrylic acid-methyl methacrylate copolymer for oral prolonged drug release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.21, p.2583-2592, 2010.

WALLE, T., BROWNING, A. M., STEED, L. L., REED, S. G., WALLE, K. U. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal Nutrition*, v.135, n. 1, p. 48-52, 2005.

XIA, W., LIU, P., ZHANG, J., CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.170-179, 2011.

XU, C. T., MENG, S. Y., PAN, B. R. Drug therapy for ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 10(16), p.2311-2317, 2004.

YANG, L., CHU, J. S., FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.235, p.1-15, 2002.

YEN, F. L., WU, T. H., LIN, L. T., CHAM, T. M., LIN, C. C. Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCL₄-Induced Acute Liver Failure. *Pharmaceutical Research*, v.26(4), p., 2009.

YOO, J. W., GIRI, N., LEE, C. H. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. *Pharmaceutical Sciences*, v.403, p.262-267, 2011.

WATTS, P. J., BARROW, L., STEED, K. P., WILSON, C. G., SPILLER, R. C., MELIA, C. D., DAVIES, M. C. The transit rate of different-sized model dosage forms through the human colon and the effects of a lactulose-induced catharsis. *International Journal of Pharmaceutics*, v.87, p.215-221, 1992.

www.bioq.unb.br acessado em junho de 2011.

www.evonik.com.br acessado em maio de 2011.

www.malvern.com acessado em junho de 2011.

www.sigmaldrich.com acessado em junho de 2011.