



UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CLARISSA DE MEDEIROS AMORIM KRUEGER

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E N-
CARBOXIMETILQUITOSANA NA INCORPORAÇÃO DO
ANTIOXIDANTE IDEBENONA**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

A Deus por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e conhecer pessoas que me apoiaram.

Dedico esta dissertação aos meus pais (Rauli e Alvaci), ao meu irmão (Gabriel) e ao meu marido (Naikow) que com amor, carinho e companheirismo sempre me apoiaram e nunca me deixaram desanimar. Suas palavras nos momentos mais difíceis foram fundamentais para me dar motivação e força para continuar. Amo vocês.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

*Ao meu inesquecível avô, Sr. Germano (em memória),
figura de grande importância em minha formação
e de quem sinto muitas saudades.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que esteve comigo em todos os momentos, iluminando meus caminhos e abençoando os projetos.

Aos meus **pais**, que nos melhores e piores momentos representaram a poção mágica da esperança.

Ao meu **marido** pelo companheirismo, dedicação e incentivo oferecido antes, durante e, seguramente, por toda a minha vida.

À minha orientadora **Tania Mari Bellé Bresolin** e co-orientador **Rilton Alves de Freitas** pelos conhecimentos adquiridos, credibilidade e atenção dedicada em todos os momentos.

Ao **CNPQ** através da **Rede de Nanoglicobiotecnologia (nanoglicobiotec)** pela oportunidade e concessão de bolsa de estudos.

Aos professores **Angélica Garcia Couto, Clóvis Antonio Rodrigues, Daisy Janice Aguilar Netz, Josiane de Carvalho Vitorino e Ruth Meri Lucinda** pelo tempo dedicado, companheirismo e pela ajuda incondicional.

Aos funcionários **Ana Paula, Aires, Eliziane, Joel, Maria Angélica, Leonardo, Luciana, Núbia, Pedro, Roberta, Rosélia e Vânia** sempre dispostos a ajudar.

Aos **amigos** que estiveram ao meu lado nesta caminhada, durante os momentos de estudo e descontração.

E àquelas **pessoas** que durante o percurso me apoiaram para que eu terminasse com sucesso.

*Aquilo que chamamos de rotina
está repleto de novas propostas
e oportunidades.*

Hoje, em algum lugar, um tesouro o espera.

*Pode ser um pequeno sorriso,
pode ser uma grande conquista.*

Não importa.

*A vida é feita de pequenos
e grandes milagres.*

*Ela está sempre nos testando,
nos oferecendo combates,
que nos educam e glorificam.*

*Descubra a alegria de ser uma surpresa para
você mesmo. Afinal,
a melhor maneira de servir a Deus é indo ao
encontro de seus próprios sonhos.*

(Paulo Coelho)

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E N-CARBOXIMETILQUITOSANA NA INCORPORAÇÃO DO ANTIOXIDANTE IDEBENONA

Clarissa de Medeiros Amorim Krueger

agosto/2009

Orientador: Profa Tania Mari Bellé Bresolin, Dra.

Co-orientador: Prof Rilton Alves de Freitas, Dr.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Bioativas

Número de páginas: 129

A Idebenona (IDB) é um fármaco antioxidante, análogo da coenzima Q10 que inibe a peroxidação lipídica, protegendo assim as células e a membrana mitocondrial do dano oxidativo. A IDB tem características lipofílicas e apresenta efeito irritante na pele, sendo um candidato potencial para a incorporação em sistema de liberação modificada, que preserve a atividade do fármaco, protegendo-o de degradação e diminuindo seus efeitos tóxicos. Dentre os polímeros de interesse na formação de nanopartículas destacam-se a quitosana (QTS) e seu derivado hidrodispersível a N-carboximetilquitosana (N-CMQ). O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar nanopartículas de quitosana e N-carboximetilquitosana contendo o antioxidante IDB. A N-CMQ foi obtida a partir de QTS comercial previamente purificada, utilizando dois processos, o método A, com secagem por *spray dryer* e o método B, com precipitação do derivado em seu ponto isoelétrico e secagem em temperatura ambiente (25 °C), sendo caracterizada por: FTIR, grau de carboximetilação e biocompatibilidade em células L 929, com MTT e Vermelho Neutro como marcadores de viabilidade. A QTS e a N-CMQ (B) foram utilizadas na obtenção de nanopartículas, secas por *spray dryer*. Foram testados vários níveis de concentração do fármaco, caracterizando as nanopartículas obtidas por espalhamento de luz (LS) dinâmico, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), rendimento e teor de IDB incorporada. Foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE para quantificação do fármaco nos sistemas. Foi analisada a dissolução da IDB isolada, N-CMQ 14 e QTS 15, utilizando membrana de diálise de 50 kDa e Tween[®] 80 a 5% (v/v) como meio, em *shaker* a 100 rpm e 37 °C, por 24 h. Foi realizado um estudo de estabilidade das nanopartículas, armazenando-as a 40 °C e 75% de umidade relativa por 60 dias com monitoramento da atividade antioxidante dos sistemas utilizando o método de radical ABTS^{•+}. A reatividade da IDB frente às células L929 foi comparada com a das nanopartículas utilizadas no estudo de estabilidade. A síntese da N-CMQ (A) resultou na co-secagem dos agentes da reação e, embora tenha se mostrado biocompatível e com eficiente derivatização, não foi utilizada devido à falta de homogeneidade e pureza do derivado. A síntese da N-CMQ (B) foi confirmada por FTIR e apresentou grau de carboximetilação de 10,3% com rendimento de 43,4%. A metodologia analítica por CLAE desenvolvida, usando coluna analítica C₁₈, fase móvel metanol:água 80:20, com detecção em 279 nm foi validada com sucesso segundo critérios oficiais e mostrou-se indicativa da estabilidade do fármaco. Foram obtidas 15 diferentes formulações com QTS e com N-CMQ, cujo rendimento variou de 19,5 - 50,6%, para a QTS e 12,8-47,7% para a N-CMQ, com eficiência de incorporação de 43-100%, para a QTS e 41-103% para a N-CMQ, mostrando um aumento da eficiência da

incorporação nas menores concentrações de fármaco utilizadas. Os sistemas apresentaram polidispersão com partículas de diâmetro nanométrico e micrométricos. A análise por MEV revelou partículas esféricas, sendo que as formulações com menor proporção de IDB (31,2 mg) apresentaram melhor revestimento dos cristais do fármaco em relação às formulações com maior quantidade de IDB. A QTS e a N-CMQ retardaram a liberação do fármaco (72% de IDB livre, 43% na N-CMQ e 35% na QTS, em 14 h). Ambos os polímeros promoveram maior estabilidade da IDB, a qual sofreu 60% de degradação, após 45 dias, na forma não incorporada, em comparação com a queda de apenas 6% para a N-CMQ e QTS. As nanopartículas preservaram a atividade antioxidante da IDB incorporada, a qual teve uma queda de cerca de 3%, aproximadamente 40% para o fármaco isolado, após o estudo de estabilidade. Finalmente, ambos os polímeros foram capazes de diminuir a reatividade da IDB frente à células L929, contribuindo para uma irritação menor do fármaco em mucosas. Portanto, foram obtidos com sucesso sistemas nanoparticulados de IDB, para futura incorporação em formas farmacêuticas.

Palavras-chave: Nanopartículas, Quitosana, N-Carboximetilquitosana, Idebenona, Estabilidade, Atividade Antioxidante, Reatividade Celular.

NANOPARTICLES OF CHITOSAN AND N-CARBOXYMETHYLCHITOSAN IN THE INCORPORATION OF ANTIOXIDANT IDEBENONE

Clarissa de Medeiros Amorim Krueger

august/2009

Orientador: Tania Mari Bellé Bresolin

Co-orientador: Rilton Alves de Freitas

Area of study: Natural products and bioactive substances

Number of pages: 129

Idebeneone (IDB) is an antioxidant drug, coenzyme Q10 analog, which inhibits lipid peroxidation, thus protecting the cells and the mitochondrial membrane from oxidative damage. The IDB has lipophilic characteristics and causes irritation in the skin, being a potential candidate for incorporation in a modified release system, which preserves the activity of the drug, protecting it from degradation and reducing its toxic effects. Among the polymers of interest in the formation of nanoparticles are chitosan (QTS) and its water-dispersive derivative, N-carboxymethylchitosan (N-CMQ). The objective of this work is to obtain IDB nanoparticles, using a feasible technique that could be scaled up. The N-CMQ was obtained from previously purified commercial QTS, and was characterized by FTIR, degree of carboxymethylation and biocompatibility in the L929 cells, with MTT and Neutral Red as a marker of viability. The QTS and N-CMQ were used to obtain IDB nanoparticles by spray drying. The nanoparticles obtained were analyzed by dynamic light scattering (LS), Electron Microscopy Scanning (EMS), yield, and incorporated IDB content. An analytical method was developed and validated by HPLC, to quantify the drug in the systems. The *in vitro* drug delivery was analyzed using the dialysis membrane of 50 kDa and Tween 80[®] at 5% (v/v) as a dissolution medium, on a shaker, at 100 rpm and 37°C, for 24 h. A stability study of the nanoparticles was carried out, storing them at 40°C and 75% relative humidity for 45 days, with monitoring of the antioxidant activity of the systems by the radical ABTS^{•+} method. The reactivity of the IDB to the L929 cells was compared with that of the nanoparticles. N-CMQ synthesis was confirmed by FTIR, showing a degree of carboxymethylation of 10.3%, with a yield of 43.4%. The analytical methodology developed by HPLC, using a C18 analytical column, mobile phase methanol: water 80:20, with detection at 279 nm, was successfully validated according to official criteria, and proved to be indicative of drug stability. Fifteen different formulations were obtained with QTS and N-CMQ, with yields ranging from 19.5 to 50.6% for QTS, and 12.8 to 47.7% for N-CMQ, and incorporation efficiency (IE) of 43 to 100 % for QTS and 41 to 103% for N-CMQ, showing an increase in IE at lower drug concentrations. The systems showed polydispersion with nanometric and micrometric particles. The analysis by SEM revealed spherical particles, and the formulations with 31.2 mg of IDB showed better coating of the crystals of the drug. The QTS and N-CMQ delayed the dissolution of the drug. Both polymers promoted greater stability of the IDB, which suffered 60% degradation after 45 days, in the free form, compared with a decrease of only 6% for the N-CMQ and QTS nanoparticles. Both polymer systems preserved the

antioxidant activity of the incorporated IDB, which showed a 40% decrease in the free form at the end of the stability study, compared with only 3% in the nanoparticles. Finally, both polymers were capable of reducing the reactivity of the IDB in the L 929 cells, contributing to reducing the irritation caused by the drug in the mucous membranes. Thus, IDB nanoparticles were successfully obtained, for future incorporation into pharmaceutical dosage forms.

Keywords: Nanoparticles, Chitosan, N-Carboximetilquitosana, Idebenone, Stability, Antioxidant Activity, Cell Reactivity.

1 INTRODUÇÃO

Radicais livres são moléculas altamente reativas e, quimicamente, são espécies que contêm elétrons desemparelhados, os quais podem ocasionar dano oxidativo em tecidos e, mais especificamente, em lipídios, proteínas (incluindo enzimas), carboidratos e DNA celulares. Por isso, a diferença entre o balanço de agentes oxidante e antioxidantes, a favor dos oxidantes, é potencialmente perigoso (VENKAT RATNAM et al., 2006), pois os radicais livres (potentes oxidantes) têm relevância sobre: câncer (MCDANIEL et al., 2005a; VENKAT RATNAM et al., 2006), diabetes, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, desordens envelhecimento, neurodegenerativas, e outras (VENKAT RATNAM et al., 2006; PIGNATELO; ITRAVAIA; PUGLISSI, 2006). Nos últimos anos, os antioxidantes ganharam grande importância devido ao seu potencial profilático e terapêutico para estas doenças (VENKAT RATNAM et al., 2006). Entre os fármacos antioxidantes atualmente utilizados com sucesso está a Idebenona (IDB), um análogo da coenzima 10, a qual inibe a peroxidação lipídica, protegendo assim as células e a membrana mitocondrial do dano oxidativo (MCDANIEL et al., 2005a; VENKAT RATNAM et al., 2006).

O *marketing* em torno dos antioxidantes, com a comprovada influência dos radicais livres em doenças crônicas, autoimunes e degenerativas (mal de Parkinson e de Alzheimer), foi muito rápido e logo a indústria farmacêutica passou a utilizar antioxidantes e seus análogos em cosméticos (BUCHALLA, 2006). Como cosméticos para uso tópico, os antioxidantes otimizam a capacidade antioxidante das células da derme (MCDANIEL et al., 2005a; VENKAT RATNAM et al., 2006). Os antioxidantes, para uso tópico, revelam ainda, um eficiente caminho para um sistema de proteção cutâneo e podem representar uma estratégia para a diminuição do dano causado pela radiação ultra-violeta e pelo estresse oxidativo. O uso tópico ainda possibilita diminuir a toxicidade sistêmica e ao mesmo tempo, restringe o efeito terapêutico em um tecido específico (CASAGRANDE et al., 2006). A IDB e a Coenzima Q10, são pouco absorvidas por via oral (VENKAT RATNAM et al., 2006), o que oportuniza seu uso tópico para atingir diferentes camadas da pele ou a absorção sistêmica.

Razões como a baixa solubilidade e a fotosensibilidade de certos antioxidantes, como a Coenzima Q10, precursora da IDB (PULEO et al., 2004; VENKAT RATNAM et al., 2006), justificam a busca por sistema de liberação modificada (MUHRER et al., 2005) contendo este antioxidante. Tal sistema deve facilitar a veiculação do fármaco em meio aquoso, promover maior absorção ou passagem através de barreiras fisiológicas e, também, proporcionar condições para a manutenção da estabilidade do mesmo, na formulação e no meio fisiológico. Estes sistemas apresentam grande impacto na terapêutica, significando um aumento na absorção e segurança, pela redução da toxicidade de medicamentos ou de cosméticos (VENKAT RATNAM et al., 2006). Neste sentido, a nanotecnologia é uma ferramenta que pode propiciar maior proteção ao fármaco, alterar a sua liberação, além de direcioná-lo a sítios alvos.

Felício et al. (2007) obtiveram nanopartículas com derivados da quitosana, como a N-carboximetilquitosana (N-CMQ) e N-CMQ acetilada. As modificações na estrutura foram identificadas por ressonância magnética de ^{13}C (RMN ^{13}C), a espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourrie (FTIR) e a formação de centros hidrofóbicos foi detectada usando fluorescência e sonda de pireno. Os derivados, especialmente a N-CMQ acetilada, apresentaram forma globular, que foi confirmada por espalhamento de luz estático e dinâmico e microscopia de força atômica, indicando conformação nanoparticulada e com capacidade de incorporar camptotecina, aumentando a sua solubilidade.

A incorporação de IDB em nanopartículas de quitosana e derivados, de forma reprodutível e consistente, em aumento de escala, utilizando técnicas de secagem e obtenção das nanopartículas que produzam um material adequado ao uso industrial, possibilita a incorporação de tais sistemas em diferentes formas farmacêuticas. A veiculação em formas sólidas orais ou injetáveis ou ainda de uso tópico representa um potencial interessante para o desdobramento desta linha de pesquisa. No segundo caso, pode permitir uma maior penetração do fármaco através da pele, viabilizando uma via de aplicação cutânea do fármaco, utilizando um excipiente nacional, obtido a partir de um rejeito industrial da atividade pesqueira, como é o caso dos derivados da quitina e quitosana. Portanto, a QTS e a N-CMQ representam grande potencial na incorporação de fármacos lipossolúveis, como a IDB. Este trabalho pretende desenvolver nanopartículas contendo IDB, por meio de processos que possam ser escalonáveis, como o uso do *spray-dryer* e analisar as características

físicas e químicas dos sistemas, a estabilidade, a liberação do fármaco incorporado, atividade antioxidante e o potencial irritante em mucosas.

2 OBJETIVOS

suprimido

3 EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1 Radicais Livres

Exceto para os organismos anaeróbios, o oxigênio é vital para todos os sistemas vivos. Entretanto, o paradoxo da via aeróbica é que os danos oxidativos ocorrem em sítios biológicos chaves, comprometendo sua estrutura e função (VENKAT RATNAM et al., 2006).

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot$), mas também derivados do oxigênio, que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3) (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006). Portanto, os radicais livres são moléculas altamente reativas ou espécies químicas contendo elétrons desemparelhados que causam estresse oxidativo (VENKAT RATNAM et al., 2006; WU et al., 2007).

ERO podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas de ERO incluem luz ultravioleta (UV), principalmente, nos comprimentos de onda maiores que 280 nm – UVA e UVB, radiação ionizante e agentes químicos (MCDANIEL et al., 2005a). Já as ERO formadas intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular, uma vez que elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares; ERO são também produzidas durante processos patológicos, como, por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória celular (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006).

A pele está constantemente exposta a estes diversos agentes oxidantes e portanto, formadoras de ERO, como a radiação UV, poluentes no ar, além disto, no mundo moderno as pessoas estão expostas a diversas toxinas, que podem ser potentes oxidantes (MCDANIEL et al., 2005a). Portanto, para poder se defender destes agentes danosos, a pele desenvolveu algumas enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas, como, por exemplo, as enzimas

superóxido dismutase (ESO), glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e catalases; proteínas que diminuem a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre, como por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneinas e haptoglobinas; proteínas que protegem processos celulares contra danos oxidativos através de outros mecanismos não enzimáticos, como por exemplo, as proteínas de estresse; moléculas de baixo massa molecular que possuem a capacidade de captar ERO via auto-oxidação, como por exemplo, glutathiona e aquelas que possuem grupo tiol, ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno (BERRA; MENCK; MASCIIO, 2006).

As consequências do estresse oxidativo podem desencadear doenças graves como Alzheimer, diabetes e até mesmo o câncer, conforme Quadro 1, e, se nenhuma forma endógena ou exógena conseguir inativar seus efeitos danosos, as consequências podem ser graves (VENKAT RATNAM et al., 2006).

Quadro 1: Papel dos radicais livres em várias doenças.

Patologias	Papel dos radicais livres na fisiopatologia de doenças
Aterosclerose	Disfunção endotelial mediada por superóxido, ativação de macrófagos.
Infarte do Miocárdio	Culmina com injúria isquêmica por reperfusão e necrose e/ou apoptose de miócitos
Hipertensão	Proliferação de células do músculo liso vascular mediada por ROS, oxidação via NADH/NADPH oxidase e disfunção endotelial
Diabetes	ERO acelera a formação de produtos finais de glicosilação avançada; disfunção endotelial mediada por superóxido
Envelhecimento	Dano celular e anormalidades metabólicas
Câncer	ERO causa mutações genéticas (modificações nas bases piridina e purina) e modificações pós-traducionais levando à interrupção de processos celulares
Doença de Parkinson	ERO media disfunções mitocondriais
Mal de Alzheimer	Formação de produtos finais de glicosilação avançada e peptídeos amilóides; ERO media neurotoxicidade das células do hipocampo e de membranas sinoptossomais
Desordens auto-imunes	ERO media a inflamação e destruição tecidual
Degeneração macular mediada pela idade	Reações fotoquímicas em ambientes ricos em oxigênio do lado externo da retina levam à liberação de agentes citotóxicos (ERO)

Fonte: VENKAT RATNAM et al. (2006).

Outro transtorno relacionado aos radicais livres, especialmente as espécies de oxigênio, se deve a descoberta da sua ação sobre o envelhecimento celular

(GETOFF, 2007). Os radicais livres agem sobre as células, alterando as características moleculares de suas membranas. Normalmente, as células alteradas seriam eliminadas pelo sistema imunológico do organismo. No entanto, quando a quantidade de células alteradas é aumentada pelo excesso de radicais livres e quando, devido ao envelhecimento cronológico do organismo, há diminuição das atividades do sistema imunológico, o organismo não consegue eliminar as células alteradas. Assim, algumas dessas células sobrevivem e começam a funcionar de maneira inadequada, alterando a fisiologia do tecido, do órgão e de todo o organismo. Como essas células podem apresentar alterações genéticas, multiplicam-se desordenadamente, propiciando o aparecimento de tumores, doenças pulmonares, cataratas, entre outras (ALVES et al., 2005).

Apesar destes aspectos prejudiciais os radicais livres são importantes para a defesa do organismo contra agentes estranhos, auxiliam a atividade dos neutrófilos e macrófagos, já que apresentam uma atividade bactericida pela degradação oxidativa dos lipídeos, proteínas e DNA microbianos (ALVES et al., 2005).

3.2 Antioxidantes

Devido aos inúmeros danos causados por ERO e a oxidação, se faz necessário o uso de um grupo de moléculas capazes de neutralizar e anular estes danos. Este grupo de moléculas, que trata diversas doenças, denomina-se antioxidantes.

Os antioxidantes são moléculas que previnem o efeito danoso dos radicais livres contrapondo a sua ação. Eles podem reduzir significativamente o efeito dos oxidantes por que destróem os radicais antes que estes possam reagir com seus alvos biológicos, prevenindo reações e a ativação do oxigênio em produtos altamente reativos (VENKAT RATNAM et al., 2006). Mesmo presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, os antioxidantes atrasam ou anulam a oxidação deste substrato (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A importância no desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende de fatores como: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos (VENKAT RATNAM et al., 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999). A quadro 2 demonstra alguns antioxidantes e sua classificação. Muitos dos antioxidantes descritos no quadro 2, têm sua produção endogenamente, isto incluem enzimas, moléculas de pequeno massa molecular e os cofatores enzimáticos. Entre os antioxidantes não enzimáticos, muitos provêm da dieta como as vitaminas, carotenóides, minerais e os polifenóis, que são a maior classe (VENKAT RATNAM et al., 2006).

Quadro 2: Classificação dos Antioxidantes

Não-Enzimáticos	
Vitaminas	α -tocoferol, ácido ascórbico
Minerais	zinco, selênio
Carotenóides	β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina
Compostos organossulfurados	alho, indóis
Antioxidantes de pequena massa molecular	glutathiona e ácido úrico
Cofatores enzimáticos	CoEnzima Q10
Polifenóis	flavonóides, ácidos fenólicos
Enzimáticos	
Enzimas primárias	Superóxidodismutase-SOD, Catalase, Glutathiona peroxidase
Enzimas secundárias	glutathiona redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase.

Fonte: VENKAT RATNAM et al. (2006).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, segundo Bianchi e Antunes (1999):

- O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente, pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre.
- Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres.

- Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

- Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes.

Normalmente, para a análise de compostos potencialmente antioxidantes, o primeiro ensaio a ser realizado para confirmar o efeito antioxidante são experimentos com sistemas oxidantes clássicos. Para tanto, alguns parâmetros devem ser monitorados durante o processo: (a) as concentrações do ensaio devem ser exatamente as mesmas concentrações efetivas do composto *in vivo*, (b) a análise deve ser ampla em relação à diversidade de espécies oxidantes e também moléculas alvo (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006). Ou seja, não existe um único método que consiga avaliar satisfatoriamente a atividade antioxidante de uma amostra visto que o efeito antioxidante depende da técnica utilizada, do tipo e concentração dos substratos e parâmetros metodológicos como a temperatura e o tempo de ensaio.

Devidos às variáveis dos testes de atividade antioxidante, faz-se necessário a utilização de agentes conhecidamente antioxidantes como controle positivo. Dentre os antioxidantes utilizados como controle positivo pode-se citar o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o Trolox[®] (um derivado hidrossolúvel do α -tocoferol) e a quercetina (flavonóide inibidor da cadeia radicalar da lipoperoxidação) (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

Há muitos ensaios *in vitro*, que utilizam homegeneizado de fígado ou a fração microsomal de ratos ou outros ácidos graxos insaturados solubilizados em solvente orgânico. Estes substratos são utilizados para avaliar os níveis de lipoperoxidação induzida por agentes oxidantes específicos em sistemas lipídicos. Estes ensaios são considerados de primeira linha e representa um importante parâmetro preliminar para se estabelecer o potencial antioxidante (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

O ensaio de lipoperoxidação como teste *in vitro*, para avaliar a capacidade antioxidante se baseia principalmente no malondialdeído (MDA) que é um biomarcador para a avaliação da auto-oxidação da fração lipídica. O MDA ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma um composto colorido que pode ser medido por espectrofotometria simples no comprimento de onda de 535 nm (BARROS;

BRIGAGÃO; MATTEI, 2006). Quanto mais malodialdeído for formado, menos antioxidante é o composto testado.

Bozin et al. (2008) utilizaram este mesmo ensaio para avaliar a atividade antioxidante de extratos obtidos através do alho. Todos os extratos obtiveram capacidade antioxidante entre 28,5% – 98,7%. Mc Daniels et al. (2005) utilizaram esta técnica para comparar o potencial antioxidante de diversas substâncias. Para tanto partiram de uma preparação microsomal. A ldebenona e o ácido lipóico apresentaram o melhor resultado neste teste, ou seja, houve maior proteção contra o estresse oxidativo das membranas lipídicas das células.

Outra metodologia para a determinação *in vitro* de compostos antioxidantes é *TRAP assay* que utiliza o composto 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)-diidrocloreto (AAPH) por possuir uma cinética de decomposição bem definida portanto, é explorada para a geração controlada de radicais peroxil (ROO[·]). Estes tipos de radicais podem ser detectados por quimioluminescência do luminol utilizando um luminômetro. O tempo gasto para que uma concentração da amostra testada consiga extinguir a emissão quimioluminescente é diretamente proporcional à capacidade antioxidante total de interceptação de radicais (ROO[·]) (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006). Esta metodologia foi utilizada por Bozin et al. (2008) para avaliar a capacidade antioxidante de extratos obtidos do alho. Estes autores utilizaram o DPPH ao invés do AAPH, mas a base do ensaio é a mesma. Todos os extratos mostraram atividade antioxidante.

Outra metodologia importante se baseia na geração *in situ* de radicais aniônicos estáveis formados a partir da decomposição do composto (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ABTS²⁻). Estes radicais são formados pela atividade peroxidásica da meta-hemoglobina na presença de H₂O₂ ou pela ação do AAPH ou persulfato de sódio. Se o antioxidante em teste apresentar alguma atividade resulta em um atraso mensurável na formação dos radicais oxidantes. Esta metodologia é conhecida como TEAC e é quantificada por espectrofotômetro em 734 nm (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006) e foi utilizada por Tung et al. (2008) para avaliar os efeitos antioxidantes de extratos de *Acacia confusa bark*. Todos os extratos obtiveram efeitos antioxidantes. Este ensaio também foi utilizado por Fernandes-Orozco et al. (2008) para avaliar a capacidade antioxidante durante a germinação da *Vigna raiata cv. emerald*, *Glycine max cv. juntro*, *Glycine max cv. merit*. Foi utilizado o

persulfato de potássio para gerar os radicais livres. Para a *Vigna radiata* cv. *Emmerald*, o valor de TEAC foi de 27 - 43,5%. Já para a *Glycine max* cv. *juntro* foi de 37,3 - 41,3% e para a *Glycine max* cv. *merit*. Foi de 63,0 - 71,8%, o que mostrou que esta última obteve uma melhor atividade antioxidante.

A última metodologia descrita relacionada com o potencial antioxidante é obtida através da reação redox de íons ferroso para íons férrico, utilizando radicais livres para a redução. Para a quantificação, utiliza-se o tiocianato, que ao reagir com íons férrico, forma um complexo que absorve em espectrofotômetro no comprimento de 500 nm. Este teste denomina-se FRAP e foi utilizado por McDaniels et al. (2005) para comparar a atividade antioxidante de várias substâncias (Idebenona, Ácido lipóico, Tocoferol, Ácido Ascórbico, Quinetin e a Ubiquinona). Neste ensaio a Quinetin e a Idebenona foram as substâncias que mostraram melhor desempenho antioxidante, seguido por tocoferol, ubiquinona, ácido lipóico, ácido ascórbico.

O FRAP, com algumas modificações, também foi utilizado por Feng et al. (2006) para identificar atividade antioxidante na quitosana N-Acetilada. A principal modificação foi a substituição do tiocianato por uma solução de ferrozine e a leitura, em 562 nm. Wang, Hsu e Yin (2008) também utilizaram este mesmo princípio para avaliar extratos de *glossy privet fruit* quanto ao efeito antioxidante, mas ao invés do tiocianato acrescentaram tetrametil murexide e quantificaram em 485 nm. O extrato com a maior atividade antioxidante foi o que continha 50% de etanol como agente extrator.

Enfim, muitos trabalhos científicos enumerando novas substâncias antioxidantes introduzem alterações ou etapas adicionais no procedimento original afim de adequar os métodos aos mais diversificados tipos de substâncias. Portanto, todas as técnicas mencionadas podem ser adaptadas e são de baixo custo, de rápida execução e grande reprodutibilidade (BARROS; BRIGAGÃO; MATTEI, 2006).

3.3 Idebenona

A IDB é uma benzoquinona ou [2-(10-hidroxidecil)-5,6-dimetoxi-3-metilbenzo1,4-quinona] cuja fórmula molecular é $C_{19}H_{30}O_5$, a massa molecular é de 338,44 e seu ponto de fusão é 53 °C (BUDAVARI, 1996). É um análogo da Coenzima Q10 cuja modificação no sítio prenil da benzoquinona, tornou o derivado 100 vezes

mais efetivo como antioxidante do que a Coenzima Q10 (WIELAND et al., 2000). Sua fórmula estrutural está demonstrada na figura 1.

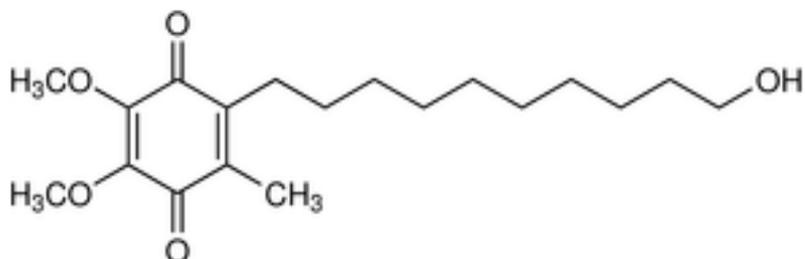


Figura 1: Fórmula estrutural da Idebenona.
Fonte: Pignatello; Itravaia; Puglissi (2006).

A IDB é um pó de cor alaranjada forte e é praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos (BUDAVARI, 1996; MARTIN et al., 2007). A IDB não causou mutagênese em bactérias e ratos e não apresenta imunogenicidade em roedores (GEROMEL et al., 2002). Não é tóxica em humanos (BARKWORTH et al., 1985 apud WIELAND et al., 2000). Após a administração oral, o pico máximo sanguíneo da IDB é alcançado após 3 h e é eliminada sem acúmulo com uma biodisponibilidade de 60% (NAGAOKA, 1987).

Este fármaco tem uma potente ação antioxidante graças à inibição da peroxidação lipídica, pois facilita a convergência de elétrons no ciclo respiratório da mitocôndria, protegendo assim, a célula do dano oxidativo, reduz o consumo de oxigênio e estimula a formação de ATP (MARTIN et al., 2007; PIGNATELLO; ITRAVAIA; PUGLISSI, 2006).

Como aplicação sistêmica pode-se citar seu uso em doenças degenerativas como nas doenças de Parkinson e mal de Alzheimer (ARTUCH et al., 2002; PULEO et al., 2004; MARTIN et al., 2007; MCDANIEL et al., 2005a; PAOLINO et al., 2004; PIGNATELLO; ITRAVAIA; PUGLISSI, 2006; WIELAND et al., 2000). A IDB é considerada um agente ativador do metabolismo central, porém, estudos adicionais foram realizados para a determinação da segurança e eficácia na terapêutica de alterações cognitivas em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico, especialmente idosos (HARTMAN, 2007).

Puglisi et al. (1996) estudaram a inclusão da IDB em ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos contendo 6 a 12 unidades de glucose ligadas entre si por ligações α -1,4 (MEIER; SOLDI; SZPOGANICZ, 2007). Os

complexos (ciclodextrinas-IDB) foram preparados por vários métodos: coprecipitação, granulação úmida e liofilização. Todos os complexos com as ciclodextrinas testados mostraram um aumento significativo na solubilidade em água da IDB em particular a dimetil- β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, conseqüentemente, o complexo apresentou um aumento na dissolução quando comparada à idebenona livre.

Por possuir efeitos citoprotetores, a IDB, é utilizada tanto em doenças tópicas quanto sistêmicas. Como uso tópico pode-se citar a aplicação em áreas pigmentadas pois, devido à inibição da melanogênese, atua como um despigmentante (MARTIN et al., 2007). Estes autores abordaram o emprego de uma emulsão contendo IDB com diluições diferentes com o objetivo de inibir a formação da melanina.

A formação de melanina faz parte da função da pele e protege contra os raios UV, por absorver a radiação. É um pigmento marrom ou negro que dá cor à pele e sua quantidade, nas pessoas, depende da raça e da exposição ao sol. Este pigmento é produzido por células especializadas denominadas de melanócitos, que estão localizados na camada basal e espinosa da epiderme. Possui prolongamentos que se dirigem a superfície da epiderme, mais exatamente nas camadas basal e espinosa onde ocorre um íntimo contato (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; GARCIA, 2001). Nos melanócitos, a enzima tirosinase participa intensamente na produção de melanina. Esta enzima transforma a tirosina em 3,4- diidroxifenilalanina (DOPA), depois age sobre a DOPA, transformando-a em DOPA-quinona (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Segundo Martin et al. (2007) utilizando células derivadas de melanoma humano com capacidade de síntese de melanina, a IDB inibe a síntese de melanina de forma dose-dependente.

McDaniel et al. (2005a) compararam a IDB com outros produtos antioxidantes usados no cuidado para pele (vitamina C, vitamina E, ácido alfa lipóico, kinetin e a ubiquinona – coenzima Q10) em sua capacidade de proteger a pele contra danos resultantes de estresse oxidativo em testes *in vitro* e *in vivo*. Os autores mediram a capacidade de raptar radicais induzido por luz UV e medido por fotoquimioluminescência, conteúdo de NADPH/ADP/Fe⁺³, medindo produtos de oxidação primários e secundários, irradiação com UVB de queratinócitos e avaliação *in vivo*, usando o teste de *sunburn cell-SBC*. Após correlacionar os testes *in vitro* e *in vivo* os autores estipularam um índice global de proteção oxidativa dos produtos e

concluíram que o índice foi de 90, 80, 68, 55, 52 e 41% para a IDB, ácido alfa lipóico, kinetin, ubiquinona, vitamina C e vitamina E, respectivamente, demonstrando a capacidade superior da IDB na proteção contra o estresse oxidativo.

A eficácia clínica da IDB em formulações tópicas a 0,5 e 1,0 % foi estudada por McDaniel et al. (2005b), para o tratamento da pele com danos por radiação solar. O estudo foi realizado em 41 pacientes, do sexo feminino, entre 30-65 anos, que apresentavam danos moderados de pele pelo efeito do sol. As formulações foram aplicadas duas vezes ao dia durante 6 semanas. Foi medida a hidratação da pele por condutância elétrica e fotografia digital ao longo do tratamento. Biópsias da pele foram analisadas, antes e o final do estudo, corando as peças para a detecção de anticorpos usando microscopia de imunofluorescência. As formulações de IDB a 0,5 e 1,0% aumentaram o grau de hidratação da pele em 37%, reduziram as rugas/secura da pele em 23 e 26%, respectivamente, reduziram as linhas finas em 27 e 29%, respectivamente e melhoraram o aspecto geral da pele em 30 e 33%, respectivamente. Em ambas as concentrações houve uma diminuição de Interleucina IL-1b, Il-6 e metaloproteinase MMP-1 e um aumento de colágeno I.

Palumbo et al. (2002) estudaram o efeito antioxidante de IDB em nanocápsulas constituídas por Tween[®] 80 e revestidas com polietil-ciano-acrilato (PECA). Os autores analisaram o efeito biológico em fibroblastos humanos submetidos a diferentes condições de estresse oxidativo (0,5 mM de dietilmaleato por 60 min e H₂O₂ 0,1 mM por 30 min). Foram medidos a produção de ERO, a viabilidade celular e os danos ao DNA nuclear das células. Em ambos os tratamentos, a IDB encapsulada antagonizou o efeito dos agentes oxidantes e o fármaco isolado foi menos efetivo do que a IDB nanoencapsulada, mesmo em baixas concentrações de encapsulação (0,5 μM).

Quanto a aplicação tópica a IDB é comercializada na forma de lipossomas (CAMARGO; SCHOQUI; ALESSANDRI, 2009) e algumas indústrias cosméticas relatam utilizar este fármaco nanoencapsulado, segundo informações dos rótulos. A única formulação farfarmacêutica atualmente comercializada é oral (PALUMBO et al., 2002), como o cerestabour[®] (caixa com 60 comprimidos de 30 mg). Também é comercializado na forma de cápsulas, como suplemento alimentar de forma isolada ou em associações).

As vantagens terapêuticas da IDB encapsulada em lipossomas peguילים foram investigadas por Paolino et al. (2004). Os lipossomas foram feitos com 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-fosfocolina monohidratada/colesterol/1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina sódica/1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (6:2:1:1) sódica, pelo método de evaporação de solvente. Culturas de astrócitos foram usadas para avaliar a eficácia biológica (através da injúria induzida por etanol) e os efeitos tóxicos de IDB livre e em lipossomas, em diferentes concentrações do fármaco (0,5, 5 e 50 μM). Na maior concentração, o fármaco livre e em lipossomas apresentou efeitos tóxicos em uma concentração do fármaco encapsulado 10 vezes inferior ao do fármaco livre, foi capaz de apresentar a maior ação protetora observada, provavelmente, devido à maior biodisponibilidade do fármaco em nível celular.

Pignatello et al. (2004) sintetizaram pró-fármacos de IDB conjugados com ésteres de ácidos lipoamino de cadeia curta, com características tipo membrana que tem a capacidade de aumentar o *uptake* de fármacos por penetração através de membranas e barreiras biológicas. Estes autores observaram que dois dos homólogos sintetizados (com 1 e 2 carbonos na cadeia alquílica) apresentaram efeito antioxidante (sequestro de ânions superóxido e como inibidor de lipoperoxidação) igual ou superior à da IDB livre. Estes autores estudaram a estabilidade destes conjugados e observaram que a hidrólise do conjugado ocorre via enzimática, por meio de esterases do fígado e do soro, sendo a velocidade de hidrólise proporcional ao tamanho da cadeia alquílica.

Não há dados disponíveis na literatura acerca de estudos de estabilidade da IDB, porém, quanto ao seu análogo precursor, Kwon et al. (2002) verificaram que a coenzima Q10 demonstrou maior estabilidade frente à temperatura e radiação UV, quando encapsulada em nanopartículas poliméricas de polimetilmetacrilato em relação a uma dispersão aquosa de coenzima Q10 e em formulações com base oleosa. As formulações foram expostas a uma lâmpada de UVA (320-400 nm) por 144 minutos e, ao final, a coenzima Q10 foi quantificada por CLAE. A porcentagem estável de coenzima Q10 encapsulada foi de 48% enquanto que na não encapsulada foi de 35% ao final do teste.

Hsu et al. (2003) prepararam e caracterizaram nanopartículas contendo CoQ10 utilizando, para a fabricação, a formação de uma microemulsão como precursor. Esta microemulsão foi preparada utilizando Tween[®] 20 e Brij[®] 78. Os autores observaram

que a concentração dos tensoativos influenciou no tamanho das partículas. O estudo *in vitro* em macrófagos de rato mostrou uma incorporação das nanopartículas 4 vezes maior em relação ao fármaco isolado. As nanopartículas foram submetidas a um teste de dissolução utilizando membrana de diálise 50 kDa e solução de Tween[®] 80 a 5% como meio de dissolução. A dissolução ocorreu quase 80% nas primeiras 50 h e o restante se manteve por até 250 h, o que o autor considerou uma dissolução rápida inicialmente e um período longo de dissolução lenta. Porém, os autores não mostraram curva controle com o fármaco isolado, o que dificulta a interpretação dos dados.

Em virtude da fotosensibilidade reportada para o análogo precursor, a Coenzima Q10 (PULEO et al., 2004; VENKAT RATNAM et al., 2006) e da baixa solubilidade e a baixa biodisponibilidade da IDB é um potencial candidato para veiculação em um sistema de liberação modificada (MUHRER et al., 2005), como por exemplo utilizando nanopartículas.

3.4 Nanopartículas

A nanotecnologia é uma ciência que consiste na produção de sistemas com dimensão de 10 nm a 1000 nm, enquanto que partículas maiores são chamadas micropartículas. Tais partículas podem ser constituídas de polímeros biocompatíveis, isto é, que possuem a capacidade de se degradar *in vivo* em fragmentos menores podendo assim ser excretado pelo organismo (SCHAFFAZICK et al., 2003; VENKAT RATNAM et al., 2006; DURAN; AZEVEDO, 2007) e apresentam aplicações importantes na área de química, biologia e farmacêutica, entre outras. A aplicação da nanotecnologia na área das ciências da vida é denominada de nanobiotecnologia. A nanobiotecnologia, na área de farmácia, atua na liberação de fármacos (alterando a biodisponibilidade, promovendo a liberação controlada e o direcionamento do fármaco). A tecnologia de liberação modificada de fármacos representa diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana (DURAN; AZEVEDO, 2007).

O termo nanopartículas é genérico, usado de acordo com o tamanho da partícula a que se refere. As nanopartículas podem ser classificadas em nanopartículas e em nanocápsulas, de acordo com a composição e organização

estrutural (SCHAFFAZICK et al., 2003; BRESOLIN et al., 2003; DURAN; AZEVEDO, 2007) e estão representadas na figura 2.

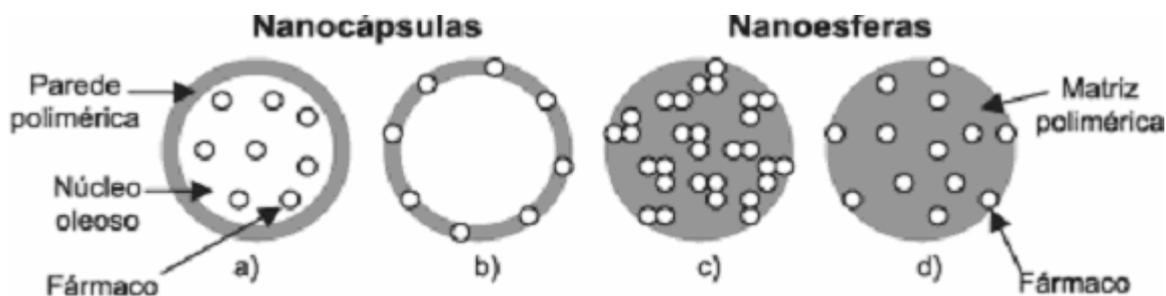


Figura 2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.

- A) Fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas;
- B) Fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas;
- C) Fármaco retido na matriz polimérica das Nanopartículas;
- D) Fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das Nanopartículas;

Fonte: SCHAFFAZICK et al. (2003).

As nanoesferas são constituídas de uma densa matriz polimérica. E o fármaco, portanto, encontra-se homogeneamente disperso ou dissolvido no interior da matriz polimérica. Desta forma, obtém-se um sistema monolítico, que não apresenta um núcleo definido. Já as nanocápsulas, são chamadas de sistema tipo reservatório e, ao contrário do anterior, apresenta núcleo bem definido. Este núcleo pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se em um invólucro polimérico ao redor do núcleo de natureza oleosa (CHAVEZ et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; BRESOLIN et al., 2003; DURAN; AZEVEDO, 2007). Ou seja, a diferença morfológica entre a forma farmacêutica de nanoesferas (sistema polimérico matricial) e nanocápsulas (sistema polimérico do tipo reservatório) é o que designa o sistema (DURAN; AZEVEDO, 2007).

Sistemas particularmente interessantes são as nanopartículas de polímeros biodegradáveis, como os derivados da quitosana. Trata-se de um sistema em que a vetorização do fármaco a sítios-alvo específicos do organismo é claramente identificável, sendo também bastante estável, não sendo reconhecido por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa (dependendo de algumas modificações da superfície) (DURAN; AZEVEDO, 2007).

As nanopartículas tem sido desenvolvidas objetivando diferentes aplicações terapêuticas, podendo ser administrada por diferentes vias, com ênfase para as vias parenteral, oral, pulmonar e oftálmica (SCHAFFAZICH et al., 2003). Além destas diferentes vias, a pele é considerada como uma via favorável para a administração de fármacos devido à aceitação do paciente e à facilidade de administração (LOPES; KANEKO, 2000). A aplicação de produtos farmacêuticos, de uso tópico e sistêmico, na pele têm sido muito utilizada.

As vantagens da utilização de nanopartículas são a incorporação de fármacos com baixa estabilidade diretamente no sítio de ação, de forma específica e com dose otimizada; maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz; diminuição significativa da toxicidade pela redução da dose e maior tempo de permanência na circulação, reduzindo efeitos colaterais. Outra vantagem seria que tais sistemas podem veicular tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (CHAVEZ et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003; DURAN; AZEVEDO, 2007).

A incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas ou poliméricas pode auxiliar especialmente na liberação de fármacos com pouca solubilidade em água e baixa permeabilidade. As nanopartículas podem ser absorvidas no sistema circulatório via trato gastrointestinal através dos canais de Peyer no sistema linfático, o que apresenta uma vantagem em relação à administração via porta, já que evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado e podem proteger o fármaco da degradação no trato gastrointestinal (DELIE, 1998 ; HUSSAIN; JAITLEY; FLORENCE, 2001).

Wu et al. (2005), sintetizaram nanopartículas de QTS contendo glicirrizinato de amônio, utilizando soluções de QTS em ácido acético (1,0; 1,2; 1,44; 1,6; 2,0; 2,5 e 3,0; 4,0 mg/mL), soluções de TPP (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL) adicionadas em 10 mL da solução de QTS. Foi observada a formação: solução, agregados e suspensões opalescentes e, nestas últimas, houve a formação de nanopartículas. As nanopartículas de glicirrizinato de amônio foram formadas pela incorporação de 4 mL de TPP (0,6; 1,0 mg/mL) em 10 mL de QTS (1,44 mg/mL), contendo glicirrizinato de amônio (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 5,0 mg/mL). As nanopartículas tiveram morfologia esférica com diâmetro de 20-80 nm por microscopia de transmissão eletrônica menor que o determinado por espalhamento de luz dinâmico (maior que 120 nm). Quando a

concentração de TPP foi de 1 mg/mL, concentração muito altas de QTS (4 mg/mL), dificultaram a incorporação do fármaco, e concentrações muito baixas de QTS (0,5 mg/mL), resultaram em agregados de grande diâmetro. Para a solução de TPP a 1 mg/mL e soluções de QTS de 1 a 3 mg/mL os autores observaram a formação de suspensões opalescentes as quais formaram nanopartículas. A concentração de 1 mg/mL de QTS conduziu a máxima incorporação do fármaco (80%). O aumento da concentração de glicirrizinato levou à diminuição da eficiência de incorporação.

3.4.1 Métodos de obtenção de nanopartículas

A seleção do método de preparação de nanopartículas depende de diversos fatores, tais como: o tamanho da nanopartícula que se pretende, se o fármaco utilizado é lipo ou hidrossolúvel, se o fármaco é estável frente ao processo de obtenção (por exemplo ao aquecimento), o tipo de polímero, qual a via terapêutica escolhida, pois a via terapêutica está muito relacionada com o tamanho de partícula pretendido (os processos de obtenção convencionais destes sistemas resultam em partículas de tamanho entre 100 e 500 nm) e a toxicidade residual que provém principalmente dos solventes envolvidos no processo (AGNIHOTRI et al., 2004). Há muitos métodos de incorporação de fármacos em nanopartículas, neste trabalho, apenas serão citados os métodos mais comuns.

A emulsificação é um método de obtenção muito simples que consiste em preparar uma solução aquosa do polímero, adicionar o fármaco com um tensoativo e produzir uma emulsificação com agitação vigorosa como representa a figura 3. Como pontos críticos neste método pode-se citar a velocidade de agitação, quanto maior a agitação menor o tamanho das partículas. Outro ponto é a concentração do tensoativo, pois este deve ser suficiente para formar uma emulsão relativamente estável; e ainda a natureza do fármaco que, neste caso, para uma maior eficiência de encapsulação deve ser lipossolúvel (AGNIHOTRI et al., 2004).

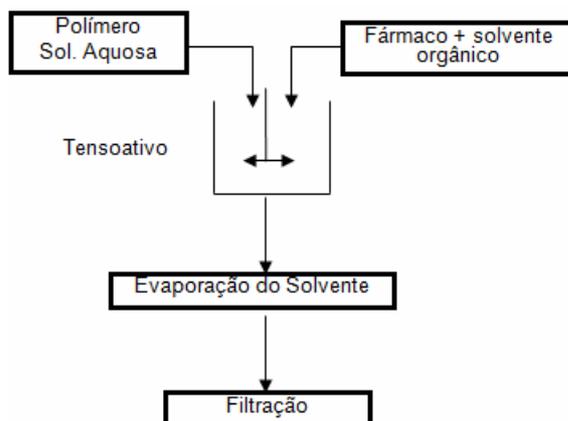


Figura 3: Esquema da emulsificação (método de obtenção de nanopartículas).
Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al. (2004).

Outro método na obtenção de nanopartículas é a emulsificação reticulada, que ocorre da mesma forma que na primeira, mas acrescenta-se um agente reticulante, normalmente o glutaraldeído e portanto, reduz o tamanho das partículas. Os pontos críticos são os mesmos que no anterior, só acrescentando o fato da concentração do agente reticulante influenciar no tamanho (AGNIHOTRI et al., 2004).

Outro método de obtenção de nanopartículas a coacervação-precipitação consiste em produzir uma dispersão aquosa do polímero, acrescentar o fármaco em pó à dispersão do polímero com a ajuda de um compressor. Esta mistura deve ser colocada sobre uma solução alcalina, neste tipo de solução a QTS precipita e ocorre o depósito do polímero sob o fármaco como representa a figura 4 (AGNIHOTRI et al., 2004).

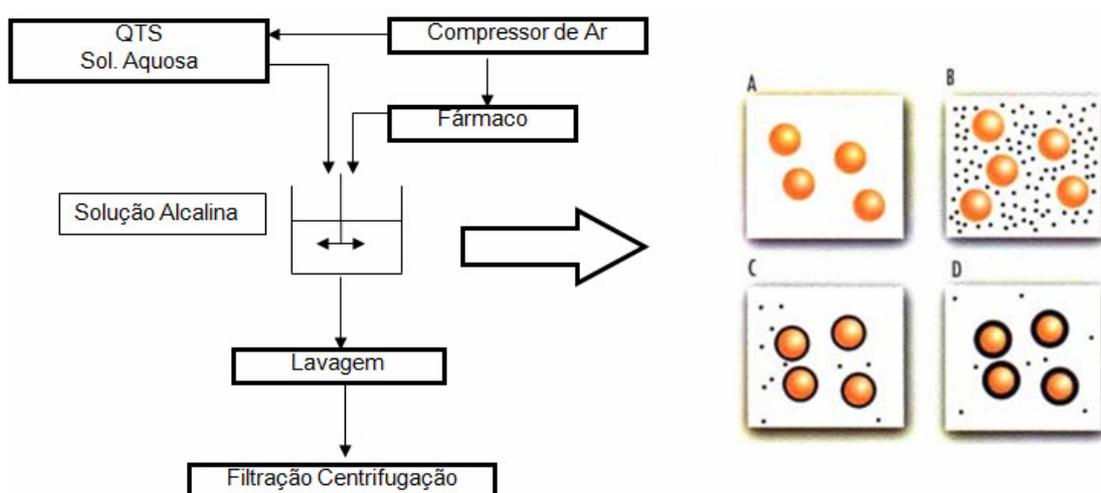


Figura 4: Figura esquemática da coacervação precipitação (método de obtenção de nanopartículas).
Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al. (2004).

No método de atomização por *spray dryer* (figura 5) o fármaco é incorporado juntamente com o polímero, previamente dissolvido ou fundido. A dispersão resultante é atomizada em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas (ótimo para fármacos com ponto de fusão baixo como a IDB (53°C), de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto (BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992; BERMAN; PIERCE; SHU, 2006). O tamanho da partícula, neste método é determinado pelo tamanho do bocal de saída da solução a ser seca, do fluxo de ar, da temperatura de entrada e da pressão de atomização. O método por *spray dryer* é considerado um método simples, rápido e confiável de obtenção de nanopartículas (AGNIHOTRI et al., 2004).

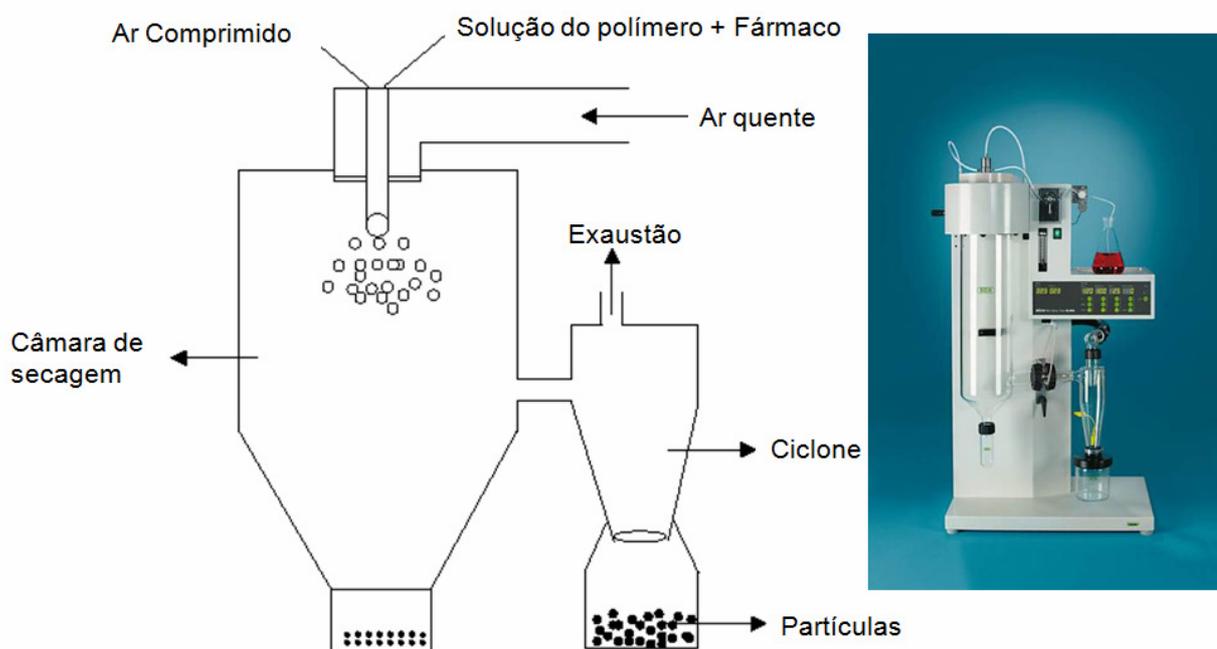


Figura 5: Figura esquemática da utilização do *spray dryer* como método de obtenção de nanopartículas.

Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al. (2004).

Pohlmann et al. (2002) sintetizaram nanopartículas utilizando o *spray dryer* e utilizando como polímeros: poli ϵ -caprolactona e ácido polilático e como fármaco a indometacina. A obtenção das nanopartículas consistiu em duas etapas na primeira preparou-se uma suspensão coloidal (fase orgânica) com os polímeros (1 g), o fármaco (0,150 g), monoestearato de sorbitano (0,766 g), óleo mineral (3,3 mL) e acetona (270 mL). A fase orgânica foi adicionada com agitação moderada a uma solução aquosa constituída por água (530 mL) e polisorbato 80 (0,776 g). Após a nanoprecipitação foi removido o solvente por evaporação. Após a retirada do solvente adicionou-se

Aerosil® a solução foi seca por spray dryer. As nanopartículas apresentaram aproximadamente 70 nm, determinada por *light scattering*. As partículas tiveram morfologia esférica e lisa de acordo com análises por MEV.

Sham et al. (2003) obtiveram nanopartículas formadas por gelatina ou polibutilcianoacrilato através de dois passos. O primeiro passo consistiu em dissolver a gelatina ou polibutilcianoacrilato em água, sob agitação constante e aquecimento. Após a solubilização foi adicionado acetona (25 mL). Ocorreu a precipitação da gelatina, o sobrenadante, que continha as menores moléculas, foi retirado e a solução foi descartada. O sobrenadante foi dissolvido, novamente, em água nas mesmas condições e 75 mL de acetona foi adicionada para provocar a precipitação da gelatina. Uma solução aquosa de ácido clorídrico e sulforhodamina foi gotejada e a solução foi estabilizada por glutaraldeído como agente reticulante. O solvente foi retirado por rotaevaporador. As nanopartículas foram centrifugadas (100.000 x g por 30 minutos). Após foi preparada uma solução de lactose em 75 mL de água, adicionou-se então uma redispersão das nanopartículas e esta solução foi seca por spray dryer. O tamanho das partículas foi de aproximadamente para a gelatina 242 nm e 173 nm para a polibutilcianoacrilato. As partículas tiveram morfologia esférica e lisa de acordo com as análises por MEV.

3.5 Estudos de liberação *in vitro* de fármacos

A liberação do fármaco das nanopartículas ocorre envolvendo três diferentes mecanismos: (a) a liberação do fármaco na superfície das nanopartículas, (b) difusão do mesmo através da matriz maleável, (c) a liberação do ativo por erosão do polímero. Estas etapas estão esquematizados na figura 6 (AGNIHOTRI et al. 2004). A erosão, a difusão e o intumescimento são passos pelos quais os sistemas nanoparticulados podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um destes mecanismos depende, invariavelmente, das propriedades do polímero empregado no sistema. De um modo geral, quando as estruturas entram em contacto com o meio de dissolução podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo de todo o processo de dissolução ou podem sofrer um fenómeno de intumescimento ("swelling") e, posteriormente, de erosão. O passo limitante da velocidade de liberação dos fármacos, a partir deste tipo

de sistema, é a penetração do líquido de dissolução na matriz (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

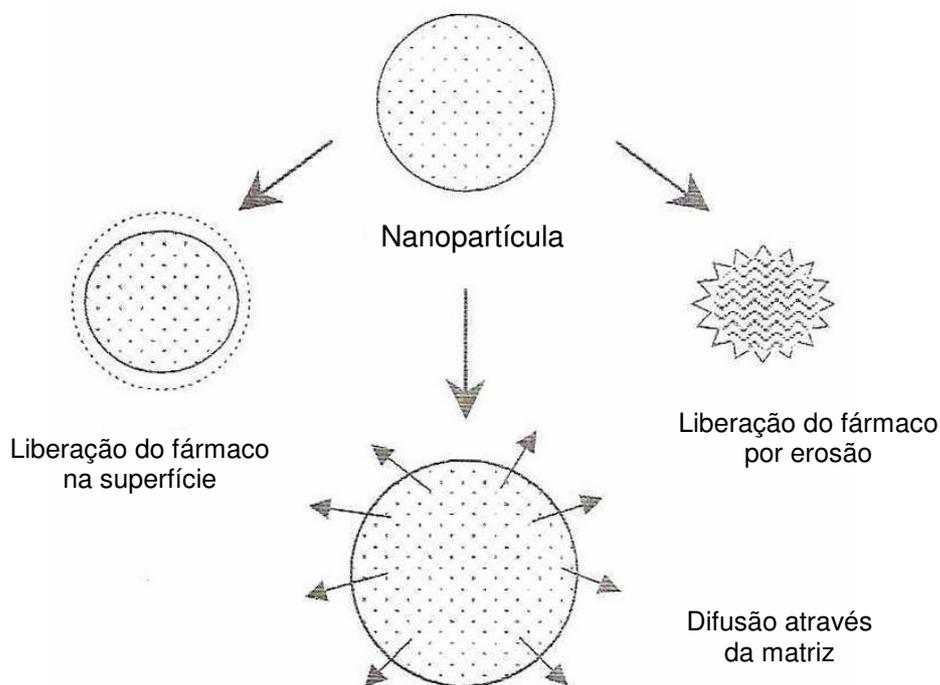


Figura 6: Esquema representativo da dissolução de nanopartículas
Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al. (2004).

Na maioria dos casos, a liberação dos fármacos ocorre através de mais de um mecanismo. Há casos em que a liberação da superfície das nanopartículas ocorre instantaneamente, portanto, é dissolvida logo que ocorra o contato com o meio de dissolução. Este tipo de dissolução leva a um efeito *burst*. Já outras partículas não têm este perfil como exemplo, pode-se citar as partículas preparadas utilizando o *spray dryer*. Inclusive, muitas nanopartículas preparadas utilizando agente reticulante (como o TPP) normalmente não apresentam um efeito *burst* (AGNIHOTRI et al., 2004).

Fármacos liberados por difusão apresentam três passos, primeiramente o solvente penetra dentro do sistema nanoparticulado, o que pode causar intumescimento da matriz. O segundo passo é a conversão do polímero do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para o maleável (AGNIHOTRI et al., 2004). Um polímero, dependendo de fatores como a temperatura, interações termodinâmicas do sistema polímero-água a que está submetido, apresenta-se no estado vítreo ou no estado maleável. A temperatura de transição vítrea varia de

polímero para polímero (COSTA; SOUZA LOBO, 1999). O terceiro passo é a difusão do fármaco durante o intumescimento da matriz polimérica (AGNIHOTRI et al., 2004).

A liberação do fármaco de sistemas nanoparticulados depende de fatores como a presença de agentes reticulantes dos polímeros (como o TPP), a morfologia, o tamanho e a densidade das nanopartículas, a propriedade físico-química do fármaco e a presença de adjuvantes. A dissolução *in vitro* depende de fatores como o pH e polaridade no meio de dissolução, portanto para a realização do ensaio de dissolução é necessário estabelecer condições, como: tipo de agitação, volume e características do meio de dissolução (de acordo com a solubilidade do fármaco) (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; AGNIHOTRI et al., 2004). Além disto, algumas vezes, quando os aparatos para dissolução não possibilitam o ensaio é necessária a utilização de outros como, por exemplo, as membranas de diálise para conter o fármaco. No método de diálise tradicional, o sistema é suspenso em um pequeno volume de fase contínua e separado da solução *sink* pela membrana de diálise. Isto não promove condição *sink* dentro do saco de diálise resultando em um perfil de liberação errônea, controlada por partição (SAARINEN-SAVOLAINE et al., 1997). Entende-se como condição *sink* quando a concentração final do soluto na solução não excede 10% de sua solubilidade no meio de dissolução (AULTON, 2005). Para assegurar esta condição durante o ensaio são usadas estratégias como membranas mais permeáveis (a maioria das membranas utilizadas são as de *cut-off* de 12.000-14.000, mas estas limitam severamente a difusão de fármacos) ou mistura eficiente do meio de dissolução no interior do saco de diálise. Saarinen-Savolaine et al. (1997) testaram a liberação de budesonida complexada com lipossomas utilizando agitação magnética dentro e fora do saco de diálise e observaram que 50% do fármaco difundiu-se do saco em 5 h. Em contrapartida com agitação somente fora do saco de diálise este percentual, somente, foi difundido em 13 h.

3.6 Quitosana e derivados

Entre os biopolímeros com grande potencial para o emprego em sistemas de liberação de fármacos, destacam-se a quitina (QTN) e seus derivados. A QTN é muito abundante na natureza, está presente na casca de crustáceos, o que em regiões litorâneas torna-se um subproduto da atividade pesqueira. A quitosana (QTS), que é

obtida a partir da descetilação alcalina da quitina, é um derivado (LOPES et al., 2005), de baixa toxicidade (DL_{50} de 16 g.kg^{-1} , via oral, em estudos *in vivo*, utilizando camundongos), biodegradável e ausência de alergenicidade (BRESOLIN et al., 2003; ALENCASTRE et al., 2006).

A QTN e a QTS são polímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucosamina em porções variáveis, sendo o último predominante na quitosana (SILVA et al., 2006).

A quitosana é um biopolímero caracterizado como uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, mas, é solúvel em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6,5$), segundo Lopes e colaboradores (2005), onde ocorre a conversão das unidades glucosaminas para a forma solúvel R-NH_3^+ . Em contato com soluções alcalinas ocorre precipitação. Além disto, apresenta ainda a capacidade de formar gel em baixos valores de pH. Sua massa molecular varia entre 3.800 e 2.000.000 daltons e seu grau de desacetilação de 66 a 95% (SINHA et al., 2004).

Uma característica importante da QTS é a possibilidade de modificações estruturais, obtendo-se várias formas de interação química e resistência mecânica. Estas interações químicas intermoleculares podem ser formadas através de várias maneiras, dentre elas o uso de agentes reticulantes (TORRES et al., 2005; GEORGE; ABRAHAM, 2006). A reticulação é uma modificação química que pode ser realizada pela interação do polímero com diferentes substâncias, como o Tripolifosfato (TPP). Este reticulante contém grupos O^- que são reativos e fazem com que haja um entrelaçamento cruzado possibilitando uma aproximação entre duas moléculas de QTS através de uma reticulação iônica. Esta interação pode ser melhor compreendida pela figura 7 (YANG; HUANG; LIN, 2007).

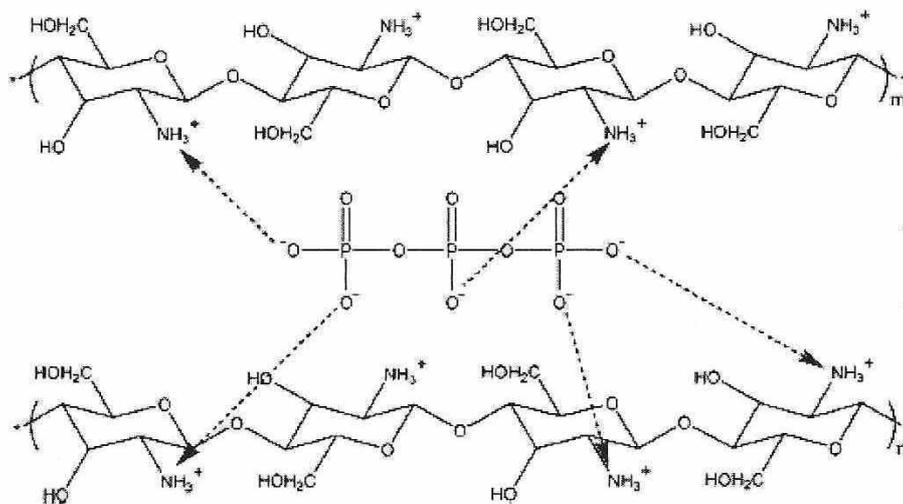


Figura 7: Ilustração da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato.
Fonte: YANG; HUANG; LIN (2007).

Algumas aplicações farmacêuticas da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. Partindo do princípio que derivados de quitina e quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, as aplicações destes polímeros podem aumentar significativamente (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A QTS (figura 8d) pode ser quimicamente modificada por possuir grupamentos amino livres, para obtenção de novos derivados solúveis em água, como a *N*-carboximetilquitosana (N-CMQ) (Figura 8b) que representa grupos acetamidas remascentes (quitina- figura 8 a,c) grupos aminos livres remanescentes da quitosana e grupos carboximetil introduzidos nos grupos amino livres da quitosana.

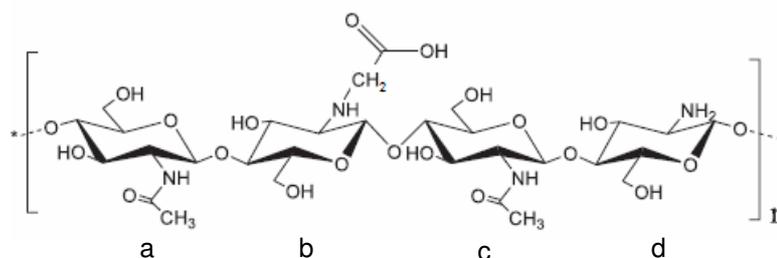


Figura 8: Estrutura molecular da Quitina (a, c), *N*-carboximetilquitosana (b), Quitosana (d).
Fonte: SILVA; SANTOS; FERREIRA (2006).

Para sintetizar a N-CMQ solúvel em água, deve haver uma razão equimolar entre o ácido glioxílico e o grupo amino. Aumenta-se o pH com hidróxido de sódio formando N-(carboximetilideno) quitosana (base de schiff), esta é reduzida com borohidreto de sódio a temperatura ambiente (25 °C) para a obtenção da N-CMQ, um derivado da QTS solúvel em água (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O NIQFAR (Núcleo de Investigação Químico Farmacêuticas), do curso de farmácia da UNIVALI, através de seu grupo de pesquisa em “Tecnologia Farmacêutica e Garantia de Qualidade” vem realizando diversos estudos relacionados à obtenção, caracterização e aplicações de quitosana, quitina e seus derivados. Tais aplicações relacionam-se com o uso de QTN, QTS e seus derivados como suporte cromatográfico, na separação de bioflavonóides de extratos vegetais (RODRIGUES et al., 2000), utilização do complexo QTS-Fe como ligante de fosfato no tratamento da hiperfosfatemia (BURGER et al., 2001) e como possível agente de purificação na remoção de fosfato da água (FAGUNDES; BERNARDI; RODRIGUES, 2000; FAGUNDES et al., 2002), entre outros. Derivados da QTS, especialmente a N-CMQ também têm sido estudados quanto à sua caracterização física-química (MIRANDA et al., 2003) e sua propriedade de formação de filme (MACHADO; FARIAS, 2003). Paralelamente, foram desenvolvidos estudos de avaliação do potencial tóxico agudo (LOPEZ; LOBO; COSTA, 2005) e crônico deste derivado, uma vez que somente os dados toxicológicos da QTS eram conhecidos.

Miranda et al. (2006) fizeram uma comparação da N-CMQ com a quitosana, através de análises cinética da degradação termogravimétricas e demonstraram que a estrutura da N-CMQ possui maior estabilidade térmica e maior resistência mecânica, quando comparada com a quitosana. Estas propriedades são, provavelmente, produzidas pela presença de fibras em ambas as direções horizontal e vertical na N-CMQ, enquanto que a quitosana parece formar fibras unidirecionais. Lamim et al. (2006) demonstraram que é possível produzir filmes flexíveis e rígidos a partir da quitosana e N-CMQ e que a solubilidade destes é dependente do pH, apresentando alta solubilidade em meio aquoso acidificado e baixa solubilidade em pH alcalino.

Felício et al. (2007), observaram a formação de centros hidrofóbicos usando espectroscopia de fluorescência e pireno, como sonda hidrofóbica. A N-CMQ acetilada apresentou forma globular, confirmada por espalhamento de luz e

microscopia de força atômica, indicando uma conformação nanoparticulada e capacidade de incorporar camptotecina, aumentando a solubilidade do fármaco.

3.7 Validação Analítica

A fim de assegurar a confiabilidade dos métodos analíticos empregados na análise da eficiência de incorporação de fármacos em sistemas de liberação modificada, bem como o seu estudo de estabilidade e a análise do perfil de liberação do fármaco a partir do sistema, é imprescindível a sua validação. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2003), os métodos analíticos podem ser classificados em diferentes categorias e a análise pretendida no presente trabalho pode ser enquadrada na categoria II (Testes quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas). Devido ao fato da metodologia ser aplicada no estudo da incorporação de pequenas quantidades de fármaco em nanopartículas e no estudo de dissolução. Baixas concentrações exigem um método com elevada sensibilidade. Conforme esta categoria é necessária a determinação dos seguintes aspectos para a validação do método: Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Exatidão, Limite de quantificação (LQ) e Robustez.

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes com amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (BRASIL, 2003). Em análises cromatográficas, o cálculo da resolução do pico do analito, em relação aos picos adjacentes do cromatograma, é uma medida da especificidade do método, bem como a comparação da análise de amostras, com análise de placebos, a fim de verificar a coincidência no tempo de retenção de algum componente, com o tempo de retenção do analito (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para a avaliação da linearidade, recomenda-se a análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas devem seguir os intervalos de 80 a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99. Deve-se apresentar as curvas obtidas (BRASIL, 2003).

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (no caso de quantificação do principal componente seria 80 a 120% da concentração teórica do teste). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Na análise da precisão do método um dos níveis avaliados é o da repetibilidade, que é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

A exatidão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis, a saber: i) aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência). A comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida; ii) na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Se as

amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual acrescenta-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003). Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI et al., 2004). Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003). A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

Os estudos de estabilidade são uma parte importante no desenvolvimento de um produto e a indústria farmacêutica tem interesse considerável neste tópico e os testes aplicados para avaliar a estabilidade podem ser um fator crítico no desenvolvimento (ALSANTE; MARTIN; BAERTSCHI, 2003).

Para o estudo de estabilidade relacionada ao fármaco, este deve ser submetido a diretas situações de estresse (temperatura- calor seco e úmido, luz UV, hidrólise ácida e alcalina, oxidação) e o cromatograma das amostras degradadas deve ser comparado com o de uma amostra não degradada, a fim de verificar se a metodologia é indicativa de estabilidade do fármaco. Nestes testes se recomenda a monitoração da umidade, oxidação e fotólise, se a substância em teste tiver tendência monitorar, também, a hidrólise e valores de pH quando em suspensões ou soluções (BAKSHI; SINGH, 2000; BAKSHI; SINGH, 2003). Para tanto, o método analítico deve comprovar ser indicativo de estabilidade durante a etapa de validação do mesmo.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AN, N. T.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L. Water-soluble N-carboxymethylchitosan derivatives: preparation, characteristics and its application. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 489-497, fev, 2009.
- ALENCASTRE, J. B.; BENTLEY, M. V. L. B.; GARCIA, F. S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J. L.; MARCHETTI, J. M. A study of the characteristics and *in vitro* permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 69-76, jan/mar, 2006.
- ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S. W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, p. 60-72, fev, 2003.
- ALVES, J. A. N. R.; LUZ J.; GUERRA, K. A.; SANTELLO, L. C.; ZERWES, N.; SANTOS, R. S. A. **Envelhecimento Normal**, p.3-51, Florianópolis, 2005. Trabalho apresentado com parte da avaliação na disciplina: Introdução ao estudo da Medicina II, UFSC.
- ARTUCH, R.; COLOMÉ, C.; VILASECA, M. A.; ARACIL, A.; PINEDA, M. Monitoring of IDB treatment in patients with electrochemical detection. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, p. 63-66, 2002.
- AULTON, M. **Dissolução e solubilidade in Delineamento de formas farmacêuticas**. ArtMed: Porto Alegre, 2005.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Stress degradation studies on Metronidazole and development of a validated Satability-Indicating HPLC assay method. **Pharmaceutical Technology**, p. 148-160, fev, 2003.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Stress tests determine innherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, p. 01-14, abr, 2000.
- BARROS, M. P.; BRIGADAO, M. R. P. L.; METTEI, R. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante de princípios ativos aplicados na profilaxia de doenças neurodegenerativas. IN: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia Fundamento Práticos** Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2006. p.237-255.
- BERMAN, J.; PIERCE, P.; PAGE, P. E. Scale up of spray dry tablet granulation process: Thermodynamic consideration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p.731-755, 1994.
- BERRA, M. C.; MENCK, M. F. C. e MASCIIO, D. P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1340-1344, nov/dez, 2006.
- BIANCHI, P. L. M.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Química Nova**, v. 12, p. 123-130, mai/ago, 1999.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; GORAN, A.; IGIC, R. Phenolic as antioxidants in garlic (*Allivium sativum* L., *Alliaceae*). **Food Chemistry**, v. 111, p. 925-929, 2008.
- BUDAVARI, S. **The index Merk**, 20. ed: Estados Unidos: Merk, p.877, 1996.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Publicado no D.O.U. - **Diário Oficial da União**; 02 de junho de 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Publicado no D.O.U. - **Diário Oficial da União**; 01 de agosto de 2005.

- BRESOLIN, T. M. B.; RODRIGUES, C. A.; ANDREAZZA, I. F.; LUCINDA, R. M.; ANDREAZZA, R. C. S.; FREITAS, R. A.; MOURÃO, S. C. Sistemas de liberação de fármacos. IN: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências Farmacêuticas – Contribuição para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. p.192-214.
- BROADHEAD, S. K.; ROUN, E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, p. 1169-1206, 1992.
- BROUSSIGNAC, P. Chitosan, a natural polymer not well known by the industry. **Chim. Ind. Gén. Chim.**, n.99, p.1241, 1968.
- BUCHALLA, A. P. E lá vem mais um creme anti-rugas. Seu princípio ativo é a idebenona. Custará caro, é lógico. **Revista Veja**, Editora Abril, ago, 2006.
- BURGUER, C.; VALVARENGHI, D.; SANDRI, S.; RODRIGUES, C. A. Cross-linking chitosan-Fe (III), an oral phosphate binder: studies *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, p.29-33, 2001.
- CAMARGO, K.; SCHOQUI, F.; ALESSANDRI, M. **Idebenona lipossomada para despigmentação e ação antioxidante**. Disponível em: <<http://www.alfapress.com.br/secao.asp?i=7&a=18&c=1232>> Acesso: mai 2009.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.; VERRI, W. A. J.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 183-190, 2006.
- CHAVEZ, F.; OLVERA, B. I.; GANEM, A.; QUINTAMAR, D. Liberación de substancias liofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 46, p.349-356, mai, 2002.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J.M. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 59, n. 4, p. 181-190, 1999.
- DELIE, F. Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 221-233, 1998.
- DROGOZ, A.; DAVID, L.; ROCHAS, C.; DOMARD, A.; DELAIR, T. Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring. **Langmuir**, v. 23, p. 10950-10958, 2007.
- DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. **O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas**. Disponível em: < www.comciencia.br>. Acesso em: 20 ago 2007.
- ECVAM DB-ALM: Mtt assay. Protocol 17, p 1-5, 1990.
- ECVAM DB-ALM: Neutral Red Cytotoxicity Assay. Protocol 64, p 1-16, 2007.
- ESMAEILI, F.; NOSSEINI-NASR, M.; RAD-MALEKSHAHI, M.; SAMADI, N.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p.161-167, 2007.
- FAGUNDES, T.; BERNARDI, E. L.; RODRIGUES, C. A. Phosphate adsorption on chitosan-Fe^{III}-crosslinking: batch and column studies. **Journal Liquid Chromatogram & Related Technologies**, v. 24, n. 8, p. 1189-1198, 2001.
- FAGUNDES, T.; COELHO, E. C.; SANTOS, K. F.; RODRIGUES, C. A. Chitosan-Fe(III)-crosslinking (CH-Fe(III)-CL) for pre-concentration of phosphate in simulated seawater. **Journal Liquid Chromatogram & Related Technologies**, v. 25, n. 7, p. 1085-1092, 2002.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FENG, T.; DU, Y.; LI, J.; WEI, Y.; YAO, P. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan in vitro. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 133-138, 2006.

FERNANDEZ-OZOZCO, R.; FRIAS, J.; ZIELINSKI, H.; PISKULA, M. K.; KOZLOWSKA, H.; VIDAL-VALVERDE, C. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. *juntro*, and *Glycine max* cv. *merit*. **Food Chemistry**, v.111, p.622-630, 2008.

FELICIO, S. G. F. P.; SIERAKOWSKI, M. R.; PETKOWITZ, L.; SILVEIRA, J. L. M.; LUBAMBO, A. F.; FREITAS, R. A. **Globular nanoparticles obtained by N-Carboxymethylation of Chitosan**. In: 2nd International conference on Surfaces, Coating and Nanostructured Material, 2007, Algarve/Portugal. Anais eletronicos. Algarve/Portugal: 2007. Disponível em: <http://www.nanosmat.org>. Acesso em: 20 jun 2007.

FELICIO, S. G. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; LUBAMBO, A. F.; FREITAS, R. A. Spherical aggregates obtained from N-carboxymethylation and acetylation of chitosan. **Colloid Polymers Science**, v. 286, p.1387-1394, mai, 2008.

FREITAS, R. A.; DRENSKI, M. F.; ALB, A.M.; REED, W. Characterization of stability, aggregation, and equilibrium properties of modified natural products; the case of carboxymethylated chitosans. **Colloid Polymer Science**, 2009 *in press*.

GARCIA, C. R. O farmacêutico e a proteção solar. **Revista Infarma**, v. 13, n. 11/12, p. 81-86, 2001.

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

GEROMEL, V.; DARIN, N.; CHRÉTIEN, D.; BÉNIT, P.; DELONLAY, P.; ROTIG, A.; MUNNICH, A.; RUSTIN, P. Coenzyme Q10 and IDB in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits. **Molecular Genetics and Metabolism**, p. 21-30, jul, 2002.

GETOFF, N. Anti-aging factors in life. The role of free radicals. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1577-1586, jan, 2007.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, n. 5, mai, 1996.

HARTMAN, I. **Rol de la Idebenone en el tratamiento de las alteraciones cognitivas por accidentes cerebrovasculares isquémicos**. Disponível em: <www.geriatrianet.com>. Acesso em: ago 2007.

HSU, C. H.; CUI, Z.; MUMPER, R. J.; JAY, M. Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors. **Pharmaceutical Science Technonology**, v.32, p. 1-12, 2003.

HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of the uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 107-142, 2001.

INVITTOX; ERGATT-FRAME. Agarose Overlay Assay, Protocolo 31, 1990.

JANES, K. A.; Fresneau; M. P.; Marazuela; Fabra; A. A.; Alonso; M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 1, p. 255-267, 2001.

JANVIKUL, W.; UPPANAN, P.; THAVORNYUTIKARN, B.; PRATEEPASEN, R. SWASDISON, S. Fibroblast interaction with carboxymethylchitosan-based hydrogels. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 943-949, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 427.

- KWON, S. S.; NAM, Y. S. ; LEE, J. S.; KU, B. S. ; HAN, S. H. ; LEE, J. Y. ;CHANG, I. S. Preparation and characterization of coenzyme Q10-loaded PMMA nanoparticles by a new emulsification process based on microfluidization. **Colloids and Surfaces**, p. 95-104, abr, 2002.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p. 244-282, 2007.
- LAMIN, R.; FREITAS, R. A.; RUDEK, E. I.; WILHELM, H. M.; CAVALCANTI, O. A.; BRESOLIN, T. M. B. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: Effect of plasticizers on their physiochemical properties. **Polymer International**, v.55, p. 970-977, 2006.
- LIE, Q; DUNN, T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370-397, 1992.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de liberação modificada:polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, abr/jun, 2005.
- LOPES, S. P.; KANEKO, M. T. Membranas no estudo de permeação cutânea. **Revista Cosmetics & Toiletries**, v. 12, p. 62-67, mar/abr, 2000.
- LOPES, R. R. A.; LAMIM, R.; FREITAS, R. A.; BURGER, C.; BRESOLIN, T. M. B. Estudo de toxicidade oral (dose única) de N-carboximetilquitosana. **Acta Farmaceutica Bonoerense**, p. 242-245, mar, 2005.
- MACHADO, F. P.; FARIAS, F. P. **Efeito da N-carboximetilquitosana sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL-colesterol) e sobre excreção de gordura fecal em ratos adultos**. Monografia (Graduação) – Curso de farmácia, Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI, Itajaí, 2003.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, v. 38, p. 375-400, 2002.
- MARTIN, L. R.; GABRIEL, M. Z.; ELIAS, D. J. M.; HERVOY, I. K. **Use of IDB for the preparation of topically-applied despigmentation composition and corresponding composition**. Disponível em: <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2005065670&wo=2005065670&DISPLAY=STATUS> Acesso em: mai 2007
- MCDANIEL, D. H.; NEUDECKER, B. A.; DINARDO, J. C.; LEWIS, J. A.; MAIBACH, H. Idebenone: a new antioxidant-Part I. Realative assessment of oxidative stress protection capacity compared to commonly known. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p. 10-17, jan, 2005 a.
- MCDANIEL, D. H.; NEUDECKER, B. A.; DINARDO, J. C.; LEWIS, J. A.; MAIBACH,H. Clinical efficacy assessment in photodamage skin of 0,5% and 1,0% idebenone. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p. 167-173, jun, 2005 b.
- MEIER, M. M.; SOLDI, V., SZPOGANICZ, B. **Análise Térmica dos complexos de inclusão entre ciclodextrinas e ácidos graxos de cadeia curta**. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0742-2/index.html> Acesso em: ago 2007
- MIRANDA, M. E. S.; RODRIGUES, C. A.; BRESOLIN, T. M. B.; FREITAS, R. A.; TEIXEIRA, E.; Rheological aspects of N-carboxymethylchitosan in diluted solution. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MIRANDA, M. E. S.; MARCOLLA, C.; RODRIGUES, C. A.; WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; BRESOLIN, T. M. B.; FREITAS, R. A. Chitosan and carboxymethylchitosan I: The role of carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dinamic mechanical properties of its films. **Polymer International**, v.55, p. 961-969, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUHRER, G.; MEIER, U., FUSARO, F.; ALBANO, S.; MAZZOTTI, M. Use of compressed gas precipitation to enhance the dissolution behavior of a poorly water-soluble drug: Generation of drug microparticles and drug-polymer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 69-83, 2005.

NAGAOKA, A. Idebenone. In: SCRIBANE, A. (Ed.) **New cardiovascular Drugs**, Rewie Press: New York, 1987.

PALUMBO, M.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. **Pharmaceutical Research**, p.71-78, 2002.

PAOLINO, D.; IANNONE, M.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PUGLISI, G.; ROTIROTI, D.; FRESTA, M. Tolerability and improved protective action of Idebenone-loaded pegylated Liposomes on Ethanol-induced injury in primary cortical astrocytes. **Journal of Farmaceutic Science**, v. 93, p. 1815-1827, jul, 2004.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN; J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal Pharmaceutics**, v. 57, p.169-172, 1989.

PIGNATELLO, R.; PULEO, A.; AQUAVIVA, R.; DI GIACOMO, C.; VANELLA, A.; PUGLISSI, G. Improved antioxidant activity of lipophilic conjugates of idebenone with short and medium-chain alkylamino acids, STP, **Journal of Farmaceutic Science**, v. 57, p. 343-346, 2004.

PIGNATELLO, R.; ITRAVAIA, V. D.; PUGLISSI, G. A Calorimetric evolution of the interaction of amphiphilic pro drugs of IDB with a biomembrane model. **Journal of Colloid and Interface Science**, p. 626-635, 2006.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTIS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-Dried indometacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal Science**, v. 16, p. 305-312, 2002.

PUGLISI, G.; VENTURA, C. A.; FRESTA, M.; VANDELLI, A. M.; CAVALLARO, G.; ZAPPALÀ, M. Preparation and physico-chemical study of inclusion complexes between idebenone and modified β -cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry**, p. 193-210, 1996.

PULEO, A.; NIEMI, R.; JARVINEN, T.; PUGLISSI, G.; PIGNATELLO, R.; Chemical and enzymatic stability evaluation of lipoamino acid esters of Idebenone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p. 343-346, 2004.

PUSHPAMALAR, V.; LANDFORD, S.J.; AHMAD, M.; LIM, Y. Y. Optimization of reaction condition for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 313-318, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9- 10, p. 1231-1237, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, set/out, 2004.

RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, A. E.; DA SILVA, A. F. S.; CECHINEL FILHO, V.; GUIMARAES, C. L.; YUNES, R. A.; DELLE-MONACHE, F. A. A comparative study of stationary phase for separation of biflavonoids from *Rheedia gardineriana* using column chromatograf. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 55c, p. 524-527, 2000.

- SAARINEN-SAVOLAINEN, P.; JARVINEN, T.; TAIPALE, H.; URTTI, A. Method for evaluation drug release from liposomes in sink conditions. **International Journal Pharmaceutics**, v.159, p. 27-33, 1997.
- SANE, R. T.; FRANCIS, M.; KHATRI, A.; DEVARAJAN, S. High-performance thin-layer chromatographic determination of idebenone in pharmaceutical preparations. **Journal of Planar Chromatography, Modern TLC**, v. 14, n. 6, p. 445-448, 2001.
- SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. C. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, set/out, 2003.
- SCHAFFAZICK, R.S.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsules suspensions and nanocapsules spray-dried powders containing Melatonin. **Journal of Brazil Chemical Science** v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.
- SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WQDHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA R.; BANSAL, K.; DAHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carries for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.274, p.1-33, 2004.
- SILVA, H. S. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, mar, 2006.
- SHAM, J. O. H; ZHANG, Y.; FINLAY, W. H.; ROA, W. H.; LÖBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 457-467, 2004.
- SHU, B.; YU, W.; ZHAO, Y; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 664-669, 2006.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 2ª ed. New York: Wiley, 1997. p. 765.
- TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEOOU, M. M.; SANTANA, C. S. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v 15, p.306-312, 2005.
- TUNG, Y. T.; WU, J. H.; HUANG, C. Y.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confuse* bark. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 509-514, 2008.
- UMBACH, W. **Cosmetics and Toiletries**. English ed. England, 1991. p. 364.
- USP29 / NF 24. **United States Pharmacopeia**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.
- USP31 / NF 26. **United States Pharmacopeia**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.
- VENKAT RATNAM, D.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, p. 189-207, 2006.
- WANG, Q.; HUAN, X.; NAKAMURA, A.; BURCHARD, W.; HALLETT, R. Molecular characterization of soybean polysaccharides: an approach by size exclusion chromatography, dynamic and static light scattering methods. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2637 – 2644, 2005.
- WANG, Z.; HSU, C.; YIN, M. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**, v. 112, p.914-918, 2008.

WEMPE, M. F.; LIGHTNER, J. W.; ZOELLER, E. L.; RICE, P. J. Investigating idebenone and idebenone linoleate metabolism: *in vitro* pig ear and mouse melanocyte studies. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 63-73, 2009.

WIELAND, E.; OELLRICH, M.; BRAUN, F.; SCHUTZ, E. C-fos and c-jun mRNA Expression in pig liver model of ischemia/perfusion: Effect of extended cold storage and antioxidante idebenone. **Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 285-289, jun, 2000.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; SHOUKUAN, F. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 235-245, 2005.

WU, T. H.; YEN, F. L.; LIN, L. T.; TSAI, T. R.; LIN, C. C.; CHAM, T. M. Preparation, phycochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 160-168, 2007.

YANG, C. H.; HUANG, K. S.; LIN, Y. C. Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reactionfor monodisperse TPP-chitosan microparticle. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 124, p. 510-516, 2007.



UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CLARISSA DE MEDEIROS AMORIM KRUEGER

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E N-
CARBOXIMETILQUITOSANA NA INCORPORAÇÃO DO
ANTIOXIDANTE IDEBENONA**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos de obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Tania Mari Bellé Bresolin
Co-orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Itajaí, agosto de 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)