

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARTINHA ANTUNES ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CAPSAICINÓIDES**

**PONTA GROSSA
2013**

MARTINHA ANTUNES ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CAPSAICINOIDES**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sabrina Grassioli

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A447 Almeida, Martinha Antunes
Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides/ Martinha Antunes Almeida. Ponta Grossa, 2013. 104f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biocências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli.

1.Capsaicina. 2.Di-hidrocapsaicina. 3.Liberação Controlada. 4.Micropartículas. 5.Obesidade. I.Farago, Paulo Vitor. II. Grassioli, Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.7

MARTINHA ANTUNES ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO CAPSAICINÓIDES**

Dissertação aprovada em 27 de fevereiro de 2013 como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, pela seguinte banca examinadora.

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Patrícia Mathias Döll Boscardin
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima
Universidade Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2013

Dedico este trabalho aos meus pais, Luís Amaury Antunes dos Santos *in memoriam* e Mirian Antunes dos Santos, por todo apoio e carinho.

Ao meu grande amor e companheiro, Osvaldo Domingues Almeida Junior, pela constância de seu amor, pelas palavras de incentivo, pelo apoio e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Às minhas filhas, Gabrielle e Marinna, que são minha razão de viver, pela paciência, por toda compreensão, por toda ajuda e horas que ficaram comigo no biotério.

A todos os amigos e familiares que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças, para prosseguir e por ter colocado em meu caminho pessoas iluminadas.

Gostaria de agradecer em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, que é uma pessoa extraordinária. Agradeço pela sua amizade, pelo carinho, amplo apoio e dedicação proporcionados no transcorrer desta dissertação. Durante todo o desenvolvimento desse trabalho ele tem sido meu guia e também um horizonte a alcançar. Muito obrigada, Paulo.

A minha co-orientadora, prof. Dra. Sabrina Grassioli, pelos conhecimentos partilhados e pela ajuda na experimentação animal.

Agradeço às professoras Dr^a Josiane de Fátima Padilha de Paula e prof. Dr^a Patrícia Mathias Döll Boscardin, pelas palavras de incentivo e pelas considerações durante a qualificação.

À professora Dr^a Kátia Sabrina Paludo, pelo apoio e dedicação na realização da histologia.

À professora Dr^a Sônia Faria Zawadzki, pelo auxílio na realização das análises térmicas.

Meus agradecimentos às minhas colegas de laboratório, Jéssica Emílio Mendes Bitencourt, Fernanda Malaquias Barboza e Fabíula Franke, obrigada pela amizade, companheirismo e paciência.

Agradeço ainda à atenciosa e competente presença dos profissionais e técnicos envolvidos neste trabalho, em especial, as funcionárias do biotério e à nossa técnica Elizabete Munhoz.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os capsaicinoides apresentam diversas aplicações terapêuticas, entretanto causam elevada pungência quando em contato com a pele e com as mucosas. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo capsaicinoides para a liberação prolongada ao longo do trato gastrointestinal, com o propósito de otimizar o tratamento da obesidade. As formulações foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente, nas concentrações teóricas de 3, 5 e 10% de capsaicinoides. Valores de eficiência de encapsulação acima de 90% foram observados para todas as micropartículas contendo essas vanililamidas. As micropartículas apresentaram formato esférico e superfície lisa. O tamanho foi adequado para uso oral, a fim de permitir uma liberação ao longo do trato gastrointestinal. Não foi verificada a formação de ligações químicas entre o fármaco e o polímero. A microencapsulação promoveu a amorfização do fármaco. As formulações prolongaram a liberação dos capsaicinoides, sem alterar a cinética de liberação (modelo biexponencial). A microencapsulação foi capaz de aumentar a tolerância gástrica da capsaicina e da di-hidrocapsaicina, prevenindo a formação de processos inflamatórios no estômago dos ratos. As micropartículas contendo 5% de capsaicinoides tiveram efeito comparável à ranitidina e ao omeprazol na prevenção de lesões ulcerativas induzidas por etanol. Essa mesma formulação promoveu a redução estatisticamente significativa do índice de Lee, da gordura mesentérica e da gordura retroperitoneal de ratos com obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico. Esses ratos também apresentaram uma melhora expressiva no perfil lipídico e na glicemia, em comparação aos grupos controle. Com base nos resultados experimentais, é possível sugerir que as micropartículas de PCL contendo capsaicinoides são alternativas viáveis para o tratamento da obesidade.

Palavras-chave: Capsaicina. Di-hidrocapsaicina. Liberação Controlada. Micropartículas. Obesidade.

ABSTRACT

Capsaicinoids show several therapeutic uses. However they cause pungency in contact with skin and mucosae. In that sense, the aim of this study was to obtain microparticles of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) containing capsaicinoids for prolonged release through the gastrointestinal tract in order to improve the treatment of obesity. Formulations containing 3, 5 and 10% capsaicinoids were successfully prepared by simple emulsion/solvent evaporation. Values of encapsulation efficiency above 90% were observed for these vanillylamide-loaded microparticles. Microparticles showed spherical shape and smooth surface. The size was suitable for oral use in order to provide a release through the gastrointestinal tract. No chemical bonds were observed between drug and polymer. Microencapsulation led to drug amorphization. Formulations prolonged the release of capsaicinoids without changing the release kinetics (biexponential model). Microencapsulation increased the gastric tolerability of capsaicin and dihydrocapsaicin because it prevented inflammatory processes in the stomach of rats. Microparticles containing 5% capsaicinoids had an effect similar to ranitidine and omeprazole in preventing ulcerative lesions induced by ethanol. This same formulation demonstrated a statistically significant reduction of Lee index, mesenteric fat and retroperitoneal fat in rats with obesity induced by hypothalamic lesion using monosodium L-glutamate. These rats also showed a remarkable improvement in lipid profile and glucose level compared to the control groups. Based on the experimental results, it is possible to suggest that capsaicinoids-loaded PCL microparticles are feasible approaches for the treatment of obesity.

Keywords: Capsaicin. Controlled Release. Dihydrocapsaicin. Microparticles. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas químicas da capsaicina e da di-hidrocapsaicina.....	28
Figura 2	Modelos de estrutura de micropartículas.....	33
Figura 3	Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da PCL.....	36
Figura 4	Fluxograma do trabalho de dissertação.....	41
Figura 5	Cromatogramas obtidos para as formulações MC0 e MC5.....	60
Figura 6	Curva analítica padrão para a determinação dos capsaicinoides obtida por HPLC/UV ($\lambda = 280$ nm) em etanol.....	61
Figura 7	Fotomicrografias dos capsaicinoides (a) e da PCL (b).....	64
Figura 8	Fotomicrografias das micropartículas obtidas por MEV aumento de 1000 X, MC0 (a), MC3 (b), MC5 (c) e MC10 (d).....	64
Figura 9	Difratogramas dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10.....	66
Figura 10	Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10.....	68
Figura 11	Espectros obtidos por FTIR dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10.....	70
Figura 12	Curva de TGA dos capsaicinoides.....	71
Figura 13	Curva de TGA da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10.....	72
Figura 14	Termograma obtido por DSC para os capsaicinoides.....	73
Figura 15	Termogramas obtidos por DSC para a PCL, para a mistura física e para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10.....	74
Figura 16	Perfil de liberação in vitro do fármaco puro e das micropartículas MC3, MC5 e MC10.....	75
Figura 17	Análise histológica dos estômagos de ratos, após o tratamento no modelo de tolerância gástrica.....	79

Figura 18	Aspecto morfológico dos estômagos dos ratos após o tratamento com os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol.....	81
Figura 19	Valores de índice de lesões ulcerativas obtidos para os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol.....	82
Figura 20	Valores de índice de Lee, gordura mesentérica, gordura periepididimal e gordura retroperitoneal encontrados para os grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos.....	84
Figura 21	Valores de glicemia para os grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos controles.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fármacos para o tratamento da obesidade aprovados pela ANVISA (Brasil).....	26
Tabela 2	Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides.....	42
Tabela 3	Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação dos capsaicinoides por HPLC/UV.....	43
Tabela 4	Rendimento obtido para as formulações de micropartículas, a partir do método de emulsão simples/evaporação do solvente....	58
Tabela 5	Teor de água obtido para os capsaicinoides, para a PCL e para as micropartículas.....	58
Tabela 6	Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para o método HPLC/UV.....	62
Tabela 7	Teor de capsaicinoides incorporados nas micropartículas de PCL (mg.g ⁻¹) e eficiência de encapsulação (EE, %)......	63
Tabela 8	Diâmetro médio e span (dispersão granulométrica) para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10, indicando o teor de capsaicinoides incorporado em cada formulação.....	67
Tabela 9	Resultados da modelagem matemática pela equação biexponencial para o fármaco puro e para as micropartículas MC3, MC5 e MC10.....	76
Tabela 10	Valores de índice de lesões ulcerativas (ILU) e de porcentagem de inibição da ulceração verificados para os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol.....	82
Tabela 11	Perfil lipídico dos diferentes grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos controles.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%D	porcentagem de dissolução
>	maior
<	menor
≥	maior ou igual
A/O/A	emulsão múltipla água em óleo em água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A_t	área total
ATG	análise termogravimétrica
B	coeficiente angular
CAP	capsaicinoides
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON	controle
CV%	coeficiente de variação percentual
$d_{(v,10)}$	diâmetro das partículas (10% da distribuição acumulada)
$d_{(v,50)}$	diâmetro das partículas (50% da distribuição acumulada)
$d_{(v,90)}$	diâmetro das partículas (90% da distribuição acumulada)
DM2	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
DSC	calorimetria exploratória diferencial
ED	eficiência de dissolução
EE	eficiência de encapsulação
ft	fração do fármaco dissolvido no tempo t
FTIR	infravermelho com transformada de Fourier
g	grama
H ₂ O	água (controle negativo)
HDL	lipoproteína de alta densidade
HP β -CD	hidroxipropil- β -ciclodextrina
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IL-1 β e IL-6	interleucinas
ILU	índice de lesões ulcerativas

IMC	índice de massa corpórea
LD	limite de detecção
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LQ	limite de quantificação
m.p.	faixa de fusão
m/m	massa/massa
m/V	massa/Volume
MC0	formulação de micropartículas de PCL sem fármaco
MC3	formulação de micropartículas de PCL contendo 3% de CAP
MC5	formulação de micropartículas de PCL contendo 5% de CAP
MC10	formulação de micropartículas de PCL contendo 10% de CAP
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
mg	miligramas
MS	Ministério da Saúde
MSC	critério de seleção do modelo
MSG	L-glutamato monossódico
n	expoente de liberação
n	número de repetições
NF- κ B	fator nuclear kappa B
nm	nanômetros
O/A	emulsão óleo em água
°C	graus Celsius
OME	omeprazol
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	pesquisa e desenvolvimento
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PEG	poli(etileno glicol)
PGA	poli(ácido glicólico)
pH	potencial hidrogeniônico
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA	poli (ácido L-láctico)
PPAR γ	subtipos gama do receptor ativado do peroxissomo
PPAR α	subtipos alfa do receptor ativado do peroxissomo
r	coeficiente de correlação
RAN	ranitidina
SAL	solução salina
<i>span</i>	medida da dispersão granulométrica
t	tempo
TCM	triglicerídeos de cadeia média (ácido cáprico e ácido caprílico)
T_d	tempo no qual 63,2 % do fármaco está dissolvido
T_g	transição vítrea
TG	triglicerídeos
TGA	análise termogravimétrica
T_m	temperatura de fusão
TNF- α	necrose tumoral
TRPV	potencial transitório da subfamília vaniloide
TRPV1	potencial transitório da subfamília vaniloide membro <i>um</i>
Tween [®] 80	polissorbato 80
UV	radiação ultravioleta
UV-Vis	espectrofotometria na região do ultravioleta-visível
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
V/V	volume/volume
XRD	difração de raios X
y	porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t
α e β	constante cinética de dissolução para a equação biexponencial
Δm	variação de massa
μm	micrômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1	Obesidade.....	22
3.2	Capsaicinoides.....	27
3.2.1	Capsaicinoides no tratamento da obesidade.....	29
3.3	Sistemas de liberação modificada de fármacos.....	31
3.3.1	Micropartículas poliméricas.....	32
3.3.1.1	Poli(ϵ -caprolactona).....	35
3.3.2	Sistemas de liberação modificada contendo capsaicinoides.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Materiais.....	40
4.2	Fluxograma experimental.....	40
4.3	Preparação das micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides.....	41
4.3.1	Mistura física.....	42
4.3.2	Rendimento.....	42
4.4	Determinação da umidade.....	43
4.5	Determinação quantitativa.....	43
4.5.1	Validação do método analítico para quantificação dos capsaicinoides presentes nas micropartículas.....	44
4.5.2	Determinação dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas.....	45
4.5.3	Eficiência de encapsulação.....	45
4.6	Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados.....	46
4.6.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	46
4.6.2	Difração de Raios X (XRD).....	46
4.6.3	Tamanho de partícula e dispersão granulométrica.....	46

4.6.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	47
4.6.5	Análise termogravimétrica (TGA).....	47
4.6.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	47
4.7	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	48
4.7.1	Avaliação dos perfis de liberação.....	48
4.8	Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	50
4.8.1	Tolerância gástrica.....	50
4.8.1.1	Animais.....	50
4.8.1.2	Protocolo experimental.....	50
4.8.1.3	Análise histológica.....	51
4.8.2	Atividade antiulcerogênica.....	51
4.8.2.1	Animais.....	51
4.8.2.2	Protocolo experimental.....	51
4.8.2.3	Índice de lesões ulcerativas (ILU).....	52
4.8.3	Efeito das micropartículas de PCL contendo capsaicinoides no tratamento da obesidade.....	52
4.8.3.1	Animais.....	52
4.8.3.2	Protocolo experimental.....	53
4.8.3.3	Obtenção das amostras de sangue.....	54
4.8.3.4	Avaliação da obesidade.....	54
4.8.3.5	Determinação de parâmetros bioquímicos.....	54
4.9	Análises estatísticas.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Rendimento.....	58
5.2	Determinação do teor de umidade.....	58
5.3	Determinação dos capsaicinoides incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação.....	59
5.3.1	Validação do método analítico para quantificação dos capsaicinoides presentes nas micropartículas.....	59
5.3.2	Determinação dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas e eficiência de encapsulação.....	62
5.4	Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados.....	63
5.4.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63

5.4.2	Difração de raios X (XRD).....	65
5.4.3	Tamanho de partícula e dispersão granulométrica.....	67
5.4.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	68
5.4.5	Análise termogravimétrica (TGA).....	70
5.4.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	72
5.5	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	75
5.5.1	Avaliação dos perfis de liberação.....	76
5.6	Ensaio biológico <i>in vivo</i>	77
5.6.1	Tolerância gástrica.....	77
5.6.2	Atividade antiulcerogênica.....	80
5.6.3	Efeito das micropartículas poliméricas de PCL contendo capsaicinóides no tratamento da obesidade.....	83
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90
	ANEXO A	
	Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal.....	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um grave problema de saúde pública, atingindo indivíduos de todas as classes sociais. A massa corporal excessiva causa distúrbios psicológicos, além de uma série de alterações orgânicas. A obesidade relaciona-se com dois fatores preponderantes: a genética e a nutrição irregular. Portanto, existe uma tendência familiar muito relevante para a obesidade, pois filhos de pais obesos têm de 80 a 90% de probabilidade de serem obesos (SILVA *et al.*, 2011).

A obesidade é uma doença multifatorial, complexa e crônica, que aumenta o risco do paciente desenvolver hipertensão, *diabetes* tipo 2 e doenças coronarianas, e continua sendo um grande obstáculo de saúde no mundo industrializado (HWANG *et al.*, 2005). Essa doença é caracterizada por uma inflamação crônica, a inflamação obesidade-induzida, sendo uma condição estritamente associada às alterações acima mencionadas (KANG *et al.*, 2007).

O tratamento da obesidade, por meio da perda de gordura, traz benefícios ao paciente, reduzindo os riscos de morbidade e mortalidade. Mesmo uma diminuição modesta, de cerca de 5 a 10% do peso corporal, já traz benefícios à saúde (WESTERTEP-PLATENGA; SMEETS; LEJEUNE, 2007). Nesse contexto, tem sido observado um rápido crescimento no tratamento terapêutico com fitoterápicos, além do interesse em potenciais efeitos termogênicos de compostos extraídos de plantas, como a cafeína do café, a efedrina do ma-huang, os capsaicinoides das pimentas e as catequinas do chá-verde (CARDOSO *et al.*, 2010).

Os capsaicinoides são metabólitos secundários responsáveis pela pungência das espécies do gênero *Capsicum* L. Esses compostos apresentam propriedades anti-inflamatórias, sendo eficazes para o tratamento de condições crônicas, como artrite, câncer, *diabetes* tipo 2, obesidade e psoríase. Entretanto, a concentração de uso deve ser reduzida, pois são irritantes para os mamíferos, incluindo os humanos, por produzir uma sensação de queimação. Como características físicas, os capsaicinoides são substâncias hidrofóbicas, incolores, inodoras, de aspecto cristalino a graxo (KANG *et al.*, 2007).

Além disso, os capsaicinoides podem aumentar o metabolismo por meio da estimulação do sistema simpático. A ingestão de capsaicinoides diminui a gordura corporal de forma dose-dependente. Os capsaicinoides têm sido investigados para o tratamento de obesidade (HAYMAN; KAM, 2008) com resultados promissores e

interessantes. Entretanto, o uso oral de capsaicionoides pode gerar uma pronta liberação desse fitofármaco, reduzindo o seu potencial farmacológico e podendo causar alguma irritação na mucosa gástrica. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada desse ativo, com o propósito de viabilizar o seu uso terapêutico por via oral.

Publicações em periódicos científicos e patentes envolvendo sistemas de liberação modificada contendo capsaicinoides são escassas. Nesse sentido, foi também verificada a existência de apenas um ativo fitoquímico comercial, denominado Thermo Slim® (microcápsulas contendo a oleoresina de *Capsicum* sp.). Segundo as informações gerais do fornecedor, esse ativo foi desenvolvido para atuar como termogênico e sacietogênico.

Assim, considerando a necessidade de otimizar o potencial terapêutico dos capsaicinoides e a existência de um número insuficiente de estudos científicos que correlacionem o desenvolvimento de micropartículas contendo capsaicinoides com o tratamento da obesidade, o objetivo do presente trabalho foi a obtenção, a caracterização e a avaliação biológica de micropartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo capsaicinoides, visando à liberação modificada no trato gastrointestinal.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Promover a obtenção, a caracterização e a avaliação biológica de micropartículas contendo capsaicinoides (capsaicina e di-hidrocapsaicina) com potencial para o tratamento da obesidade.

2.2 Específicos

- ✓ Obter micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides a partir do poliéster poli(ϵ -caprolactona);
- ✓ Validar o método analítico para quantificação dos capsaicinoides presentes nas micropartículas por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria na região do ultravioleta;
- ✓ Proceder a determinação quantitativa dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas poliméricas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria na região do ultravioleta, avaliando a eficiência de encapsulação dos fitofármacos;
- ✓ Promover a caracterização dos sistemas poliméricos por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos;
- ✓ Avaliar a dissolução *in vitro* do fármaco puro e na forma de micropartículas;
- ✓ Estudar a tolerância gástrica e o potencial antiulcerogênico das micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides;
- ✓ Testar o efeito das micropartículas contendo capsaicinoides em modelo *in vivo* de obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Obesidade

A obesidade é definida como uma enfermidade crônica, não-transmissível, caracterizada pelo excesso de adiposidade corporal em relação à massa magra, a um nível que resulte no comprometimento da saúde, de forma a diminuir a expectativa de vida do indivíduo (FERREIRA *et al.*, 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2003). Primariamente, o excesso de energia é convertido em tecido adiposo, quando o valor calórico ingerido pelo indivíduo é superior ao seu gasto energético (VOLTERA *et al.*, 2008).

Essa doença é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das epidemias do século. Dados epidemiológicos recentes demonstram que o sobrepeso atinge mais de 1,4 bilhão de indivíduos da população adulta mundial, sendo que desses, 500 milhões encontram-se em quadro de obesidade. Adicionalmente, a OMS também relata que o número de indivíduos obesos duplicou a partir de 1980 (OMS, 2013).

No Brasil, de acordo com um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde (MS) em 2011, o sobrepeso afeta 49% da população, com crescimento de 6% entre os anos de 2006 a 2011. Ainda, segundo o governo federal, no mesmo período, o percentual de indivíduos obesos cresceu 5%, sendo que 16% da população brasileira apresenta obesidade atualmente (BRASIL, 2012).

De acordo com a OMS, as projeções futuras são bastante pessimistas, indicando um aumento de 75% nos casos de obesidade em 10 anos (OMS, 2013).

A obesidade apresenta etiologia multifatorial, podendo ter suas causas divididas em dois grandes contextos. Na obesidade exógena, o ambiente e/ou os hábitos de vida, caracterizados por uma grande oferta de alimentos baratos, práticos e com alta concentração energética, aliados, na maioria das vezes, ao sedentarismo, têm sido apontados como responsáveis por 95% dos casos. Com relação à obesidade endógena, há alterações em componentes genéticos, psicológicos, endócrinos e metabólicos, os quais aumentam a velocidade e a intensidade do ganho de peso (CARDOSO *et al.*, 2010; POWER; SCHULKIN, 2008).

Atualmente, os adipócitos são reconhecidos como um tecido responsivo a estímulos nervosos e humorais, como as adipocitocinas, componentes que fazem

parte da regulação do metabolismo energético (BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2007). Nesse grupo, encontra-se a leptina, citocina que, no nível cerebral, sinaliza a saciedade e o tamanho do estoque de gordura corporal, além de agir como um fator sensibilizador da ação da insulina. Pesquisas relatam que, na obesidade, a concentração plasmática de leptina está aumentada, indicando uma resistência a essa adipocitocina (TRAYHURN; WOOD, 2004; GIL-CAMPOS; CAÑETE; GIL, 2004).

Em excesso, o tecido adiposo também é responsável pela criação de um estado inflamatório subclínico, devido à secreção aumentada do fator de necrose tumoral (TNF- α), das interleucinas (IL-1 β e IL-6), entre outros, que possuem a característica comum de induzir a resistência à insulina. Embora seja incerta a causa desse processo inflamatório, a principal hipótese refere-se ao estresse oxidativo em células adiposas, advindo do metabolismo excessivo de ácidos graxos livres, com potencial indução de necrose celular. Em decorrência da necrose celular, mediadores quimiotáticos aos macrófagos são liberados, reforçando, portanto, o estado inflamatório (RABE *et al.* 2008; ZEYDA; STULNIG, 2007; RUDIN; BARZILAI, 2005).

Logicamente, inúmeros outros mecanismos fisiopatológicos têm sido estudados. No entanto, alterações nas adipocitocinas e no estado inflamatório são os mais relatados e proporcionam uma boa compreensão de como o acúmulo excessivo de gordura interfere na homeostasia corporal.

A obesidade está correlacionada à incidência aumentada de várias outras doenças, como aterosclerose e suas complicações (acidente vascular encefálico e infarto miocárdico), hipertensão, alguns tipos de câncer, cálculos biliares, doenças musculoesqueléticas, entre outras (LEITÃO; MARTINS, 2012; BRUCE; BYRNE, 2009).

O aumento da doença arterial coronariana está diretamente associado à dislipidemia na obesidade. O excesso de triglicerídeos, parcialmente metabolizados pelas lipases hepáticas, é convertido em unidades de lipoproteína de baixa densidade (LDL), com elevado potencial aterogênico. Esse risco pode se tornar mais acentuado quando o ganho de peso está acompanhado por redução na atividade física e pela alta ingestão de ácidos graxos saturados. As doenças cardiovasculares ocorrem também pela presença de hiperinsulinemia, a qual aumenta a síntese de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Com o aumento no transporte arterial

de colesterol, ocorre a elevação da síntese de colágeno nas células da parede vascular e da formação de placas de lipídeos nas artérias, associada à diminuição de sua remoção, e consequente predisposição à formação do ateroma (GONZÁLEZ-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011; SCHAFFER, 2003).

A prevalência de hipertensão, em jovens adultos de 20 a 45 anos, é seis vezes maior em obesos do que em não-obesos. Em pacientes obesos, o acúmulo de gordura intra-abdominal resulta em aumento da retenção de sódio pelas células e ativação do sistema nervoso simpático, ocasionando aumento da volemia e vasoconstrição, com consequente aumento da pressão sanguínea (FRANCISCHI *et al.*, 2000).

Além disso, a obesidade favorece a instalação de alterações neuroendócrinas, como *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), infertilidade, deficiência da via tireoidiana e da via adrenocorticotrófica, diminuição da temperatura corporal, dentre outras (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Na obesidade, o indivíduo apresenta uma secreção aumentada de insulina, tanto em condição basal de jejum, como após a sobrecarga de glicose. Esse quadro se instala, basicamente, pela resistência periférica à insulina, uma consequência direta da excessiva adiposidade (KITABICHI *et al.*, 2006; FERRANNINI *et al.*, 2004; BUCHANAN *et al.*, 2002; UNWIN *et al.*, 2002). A função exacerbada da célula β pancreática leva a sua hipertrofia e a sua hiperplasia (GONG; MUZUMDAR, 2012; AHRÉN *et al.*, 2010). Com isso, a captação de glicose pelos tecidos dependentes da insulina permanece, a normoglicemia é mantida, porém à custa da hiperinsulinemia, o que é denominado como um estado pré-diabético (CZECH; TATÓN; PIATKIEWICZ, 2010; PRENTKI; NOLAN, 2006).

Entretanto, de forma crônica, esse perfil adaptativo induz à apoptose da célula β . Os mecanismos responsáveis por essa falência celular envolvem a glicotoxicidade e a lipotoxicidade provenientes do metabolismo energético, alterado pela resistência periférica à insulina. Com a falência celular, a tolerância à glicose não é mantida, a hiperglicemia de jejum é percebida e o DM2 é instalado. O DM2 é diagnosticado quando apenas 25% da massa total de células β permanecem funcionais (CHANG-CHEN; MULLUR; BERNAL-MIZRACHI, 2008; KAHN *et al.*, 2006; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004). Portanto, em pacientes portadores de obesidade grave, a intolerância à glicose ocorre quando um número muito restrito de células β não

consegue manter a hipersecreção, capaz de compensar a resistência periférica à insulina (MARIN, 2007).

A relação entre obesidade e DM2 é tão intensa, que estudos evidenciaram que, para cada unidade de aumento no IMC, o que reflete de 2,7 a 3,6 kg, o risco de desenvolver DM2 aumenta aproximadamente em 12% (NISWENDER, 2010; ASTRUP; FINER, 2000).

O índice de massa corpórea (IMC) é um parâmetro antropométrico útil para classificar o sobrepeso e a obesidade em indivíduos adultos. Esse valor é calculado pela divisão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Em geral, o indivíduo tem sobrepeso quando o valor de IMC está na faixa entre 25-29,9, sendo que o IMC dos indivíduos considerados obesos é $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (HILL; WYATT, 2005). A obesidade mórbida é diagnosticada quando o IMC excede o valor de 40 kg/m^2 (CARDOSO *et al.*, 2010).

Esse método é o mais comumente utilizado, sendo altamente correlacionado com o teor de massa corpórea. Porém, esse valor não fornece informações sobre a composição corporal, ou seja, não indica a quantidade real de gordura corpórea (HILL; WYATT, 2005).

Para classificar a obesidade em animais, é utilizado o índice de Lee, o qual é calculado pela raiz cúbica do peso em gramas do animal, dividido pelo comprimento nasoanal em centímetros (LEE, 1928). Em 1968, esse índice foi padronizado para uso em modelos com roedores, sendo equivalente ao IMC para humanos (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

Os tratamentos farmacológicos disponíveis para a obesidade podem ser efetivos quando associados à dieta e à atividade física, com período de uso de 1 a 2 anos (PADWAL; LI; LAU, 2003). Além disso, a resposta ao medicamento pode variar consideravelmente de paciente para paciente, sendo que um pequeno número, tipicamente 2 a 5%, exibe uma perda de peso estatisticamente maior do que a média, enquanto que uma parcela expressiva não apresenta nenhum efeito ao tratamento (FERNSTROM; FERNSTROM, 2002).

A Tabela 1 sumariza os fármacos mais comumente utilizados para o tratamento da obesidade no Brasil. Os primeiros dois fármacos, orlistat e sibutramina, são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) especificamente para essa indicação (BRASIL, 2011). Os demais, são aprovados

para outras doenças, mas têm sido empregados em estudos clínicos com efeito significativo na perda de peso (KAPLAN, 2005).

Tabela 1 – Fármacos para o tratamento da obesidade aprovados pela ANVISA (Brasil).

Fármacos aprovados pela ANVISA especificamente para a perda de peso ^a			
Fármaco	Dose típica	Classificação	Efeitos adversos
Orlistat	120 mg, 3x ao dia	Inibidor da lipase	má absorção, esteatorreia
Sibutramina ^b	10 – 15 mg/dia	Serotoninérgico/adrenérgico	hipertensão, taquicardia
Fármacos aprovados pela ANVISA para outras indicações			
Fármaco	Dose típica	Indicação primária	Reações adversas
Bupropiona	150 – 300 mg/dia	Depressão	anticolinérgicos, agitação
Metformina	500 – 1000 mg/dia	DM2	diarreia, acidose láctica
Topiramato	50 – 100 mg/dia	Epilepsia	comprometimento cognitivo

^a As anfetaminas (anfepramona, femproporex e mazindol) foram suspensas pela ANVISA em outubro de 2011.

^b A comercialização da sibutramina foi suspensa em diversos países devido ao elevado risco de eventos cardiovasculares.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2011) e KAPLAN (2005)

Dessa forma, é possível observar que as opções farmacológicas para o tratamento da obesidade são limitadas e apresentam diversas reações adversas.

Excluindo-se os fármacos sintéticos amplamente difundidos pela indústria farmacêutica, os quais revelam elevados efeitos colaterais, produtos naturais têm sido hábeis em reduzir ou inibir a adipogênese, com baixa toxicidade. Nesse sentido, são potenciais agentes terapêuticos com importante impacto para a prevenção e o tratamento da obesidade, sobretudo aquela relacionada à outras doenças metabólicas (LIN; DELLA-FERA; BAYLE, 2005).

Os fitofármacos mostram elevado potencial de promoção da saúde dos pacientes obesos e são importantes na prevenção da doença (KRZYZANOWSKA; CZUBACKA; OLESZEK, 2010). Os efeitos antiobesidade desses compostos são mediados pela regulação de várias vias, incluindo a redução da absorção de lipídeos, a modificação na ingestão e no gasto energético, o aumento da lipólise, a diminuição da lipogênese e a redução da diferenciação e da proliferação de pré-adipócitos (GONZÁLEZ-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008).

O uso de associações de fitofármacos na obesidade pode resultar em uma atividade sinérgica, por aumentar a biodisponibilidade e por permitir a ação em vários alvos moleculares, oferecendo vantagens sobre os tratamentos clássicos da obesidade por meio do uso de produtos farmoquímicos isolados (KRZYZANOWSKA; CZUBACKA; OLESZEK, 2010; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008).

Nesse contexto, tem sido observado um rápido crescimento no tratamento terapêutico com fitoterápicos, além do interesse em potenciais efeitos termogênicos de compostos extraídos de plantas, como a cafeína do café, a efedrina do ma-huang, os capsaicinoides das pimentas e as catequinas do chá-verde (CARDOSO *et al.*, 2010).

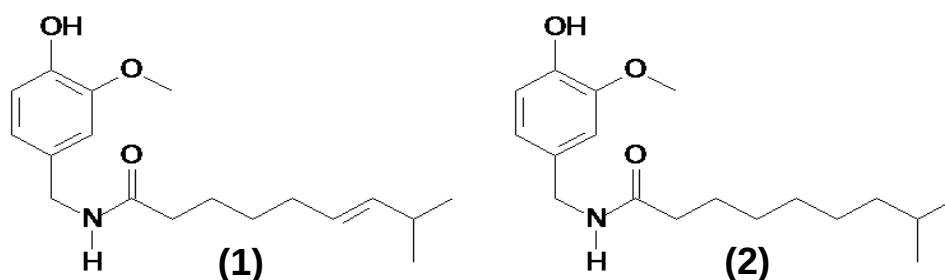
Em particular, estudos têm mostrado que os capsaicinoides têm propriedades anti-inflamatórias e de aumento de metabolismo e, portanto, podem ser usados para o tratamento da obesidade, com resultados promissores (HAYMAN; KAM, 2008).

3.2 Capsaicinoides

Os capsaicinoides são metabólitos secundários responsáveis pela pungência das espécies do gênero *Capsicum* L. Esses compostos estão presentes no tecido placentário que envolve as sementes de pimenta e também, em menor quantidade, na polpa dos frutos. As sementes de pimenta não contêm capsaicinoides, mas os retém durante o processamento (REYES-ESCOGIDO; GONZALEZ-MONDRAGON; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, 2011).

A capsaicina e di-hidrocapsaicina (Figura 1) são os dois mais potentes capsaicinoides e suas moléculas diferem apenas na saturação do grupo acila. A capsaicina, 8-metil-*N*-vanilil-*trans*-6-nonenamida, é o principal capsaicinoide das pimentas e exibe isomeria *cis-trans*, sendo que o isômero *trans* é o mais estável (HAYMAN; KAM, 2008).

Figura 1 – Estruturas químicas da capsaicina **(1)** e da di-hidrocapsaicina **(2)**



Os capsaicinoides produzem efeitos sobre o aparelho gastrointestinal, sistema cardiovascular e respiratório, bem como, sobre o sistema sensorial e de regulação térmica. Estudos indicam que esses compostos são capazes de induzir a oxidação de lipídios e diminuir a ingestão de alimentos (SURESH; SRINIVASAN, 2010).

No entanto, os capsaicinoides são muito irritantes, causando dor e queimação em baixas concentrações sobre a pele, membranas e mucosas. Quando administrados por via oral, induzem aumento de salivação, secreção gástrica, sensação de pungência e distúrbios gastrointestinais, dependendo da dose (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991).

De acordo com estudos em animais e em humanos, a administração oral de capsaicinoides pode aumentar a produção de calor no corpo em curto período de tempo. Segundo Huang *et al.* (2002), em 1997, uma equipe de pesquisa liderada por David Julius, pesquisador da Universidade da Califórnia em São Francisco, mostrou que os capsaicinoides se ligam a uma proteína conhecida como TRPV1.

O canal de cátion do receptor de potencial transitório da subfamília vaniloide (TRPV), membro *um* (TRPV1), é o receptor dos capsaicinoides. O TRPV1 é um canal de cátion não-seletivo que pode ser ativado por uma grande variedade de estímulos exógenos e endógenos, físicos ou químicos. O TRPV1 é o único membro da subfamília vaniloide que é ativado pelos capsaicinoides, uma vez que o camundongo nocaute¹ em TRPV1 demonstra insensibilidade aos capsaicinoides (PARK; LEE; KIM, 2007).

De acordo com Lee *et al.* (2005), os receptores TRPV1 são encontrados principalmente nos neurônios nociceptivos do sistema nervoso periférico, mas eles

¹ Nocaute: técnica genética que consiste em desabilitar a expressão de um gene específico em um organismo

também têm sido descritos em muitos outros tecidos, incluindo o sistema nervoso central. O TRPV1 está envolvido na transmissão e modulação da dor (nocicepção), bem como na integração do estímulo doloroso. A função do TRPV1 é a detecção e a regulação da temperatura corporal. A ativação prolongada desses neurônios pelos capsaicinoides esgota a substância P pré-sináptica, um dos neurotransmissores para dor e calor, acarretando uma posterior sensação de analgesia.

Os capsaicinoides têm sido uma das biomoléculas mais exploradas devido a sua versatilidade farmacológica. Muitos pesquisadores descrevem o uso dos capsaicinoides como agente antioxidante, antiartrítico gastroprotetor, agente anticâncer e analgésico (PRASAD; SHRIVASTAVA; RAVISHANKAR, 2005).

Dados publicados pela *American Association for Cancer Research* sugerem que os capsaicinoides são capazes de suprimir células de câncer de próstata, conduzindo-as ao processo de apoptose celular. Esses estudos foram realizados em tumores formados por culturas de células humanas de câncer de próstata, cultivadas em ratos. Os tumores tratados com capsaicinoides revelaram aproximadamente um quinto do tamanho dos tumores não-tratados. Outros estudos clínicos desenvolvidos no Japão e na China, também apontaram a inibição do crescimento de células leucêmicas com o uso de capsaicinoides (KEISUKE *et al.*, 2004).

Na Tailândia, país no qual o consumo de alimentos picantes é elevado, observou-se uma baixa incidência de casos de câncer colorretal e de estômago, em comparação com o restante da Ásia, incluindo o Japão e a China. No México, onde o emprego também é profuso, foram verificadas baixas taxas dos mesmos tipos de câncer, comparadas às relatadas para os Estados Unidos (WESTERTERP-PLANTENGA; SMEETS; LEJEUNE, 2007).

Os capsaicinoides têm sido investigados para o tratamento da obesidade, com resultados promissores e interessantes. Dados epidemiológicos revelaram que o consumo de alimentos contendo capsaicinoides está associado a uma menor prevalência da obesidade (LEUNG, 2008). No entanto, estudos de longo prazo são limitados, devido à pungência dos capsaicinoides (HAYMAN; KAM, 2008).

3.2.1 Capsaicinoides no tratamento da obesidade

A grande maioria dos trabalhos avaliando o potencial efeito dos capsaicinoides na obesidade foi elaborada com a capsaicina, principal vanililamida das pimentas do gênero *Capsicum*.

A literatura descreve que a capsaicina pode atenuar não somente a inflamação obesidade-induzida, mas também a obesidade relacionada a distúrbios metabólicos e a alterações hepáticas. A capsaicina suprime as respostas inflamatórias induzidas pela obesidade pela redução dos níveis de TNF- α , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e aumenta os níveis de adiponectina no tecido adiposo e no fígado, que são importantes para normalizar a resposta da insulina (KANG *et al.* 2010; KANG *et al.* 2007). Esses efeitos benéficos estão associados com a ação direta da capsaicina sobre os subtipos gama e alfa do receptor ativado do peroxissomo (PPAR γ e PPAR α) e sobre a expressão/ativação de TRPV-1, relacionada à inativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e à ativação de PPAR γ (KANG *et al.* 2010). Além disso, a capsaicina suprime a migração de macrófagos induzida pelo tecido adiposo, reduz a ativação de macrófagos e induz a apoptose de pré-adipócitos (HSU; YEN, 2006).

Em ratos, a capsaicina proporcionou a redução da ingestão de alimentos, o aumento do gasto energético e uma maior oxidação de lipídeos (JOO *et al.*, 2010; DIEPVENS; WESTERTERP; WESTERTERP-PLATENGA, 2007). Nos seres humanos, um aumento significativo no gasto de energia foi observado imediatamente após uma refeição contendo pimenta versus o grupo controle (YOSHIOKA *et al.*, 1995). Além disso, estudos em animais e em humanos demonstraram que a capsaicina ocasiona um aumento da termogênese, por estimulação β -adrenérgica. Em ratos, a capsaicina também promoveu um aumento da secreção de catecolaminas, a partir da medula adrenal (KAWADA *et al.*, 1986). As investigações empregando animais também mostraram que o tratamento com capsaicina estimula a atividade do sistema nervoso simpático, o que sugere que neurônios específicos, sensíveis à capsaicina, estão envolvidos nesse processo (JOO *et al.*, 2010; DIEPVENS; WESTERTERP; WESTERTERP-PLATENGA, 2007; KAWADA *et al.*, 1986). Em um estudo clínico, a administração de capsaicina por 2 semanas, em combinação com o chá-verde, induziu a redução da gordura corporal dos pacientes voluntários (TSI *et al.*, 2003). Em síntese, a administração de capsaicina favorece um aumento na mobilização de lipídeos e uma diminuição da massa do tecido adiposo (DIEPVENS; WESTERTERP; WESTERTERP-PLATENGA, 2007).

No entanto, apesar dessas qualidades, os capsaicinoides são moléculas orgânicas altamente irritantes para os mamíferos, produzindo queimação em qualquer tecido com o qual entram em contato. Dessa forma, a administração oral dos capsaicinoides, sem qualquer modificação farmacotécnica, é inviável, uma vez que eles seriam prontamente liberados no trato gastrointestinal e poderiam provocar danos potenciais à mucosa gástrica. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada contendo essas vanililamidas, com o propósito de viabilizar o uso terapêutico por via oral, visando à liberação prolongada ao longo do trato gastrointestinal e potencializando o efeito farmacológico. Nesse sentido, as micropartículas são formas farmacêuticas interessantes para melhorar as características físicas e mecânicas dos capsaicinoides, podendo assegurar estabilidade, liberação controlada e proteção da mucosa gástrica contra a ação direta desse fitofármaco (JINCHENG; SIHAO, 2010).

3.3 Sistemas de liberação modificada de fármacos

As tecnologias de liberação modificada de fármacos representam uma das áreas mais promissoras da ciência, oferecendo diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Dessa forma, a investigação de sistemas de liberação, que incluem a modulação do processo de dissolução, a redução da toxicidade e o aumento da adesão e da conveniência do paciente, torna-se de extrema importância (RESTANI *et al.*, 2010). Além disso, essas estratégias podem tornar os fármacos mais disponíveis em alvos específicos para produzir um melhor efeito terapêutico (EVANGELISTA, 2006).

O desenvolvimento dessas formas farmacêuticas, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, além de promover o controle da liberação de ativos em sítios específicos, tem sido o objetivo de diferentes pesquisas nos últimos anos. Dentre os principais sistemas utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MAINARDES, 2007). Considerando que o tema proposto ao presente trabalho envolve as micropartículas poliméricas, um maior aprofundamento sobre essa forma farmacêutica de liberação modificada está apresentado na sequência.

3.3.1 Micropartículas poliméricas

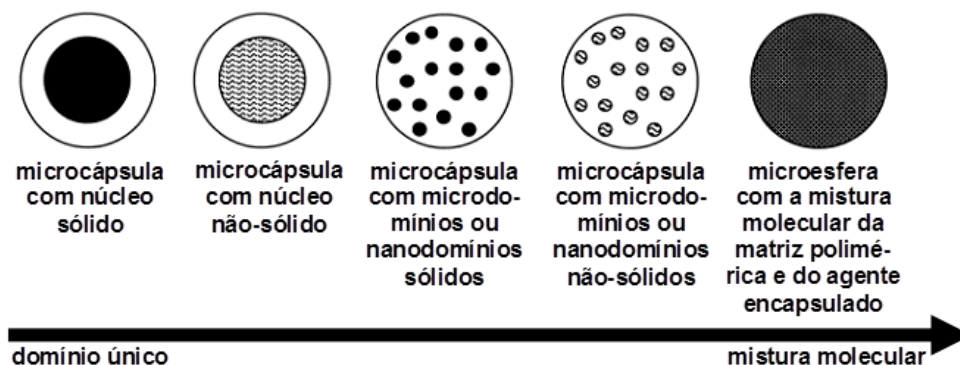
As micropartículas poliméricas têm sido bastante estudadas, pois são capazes de promover a liberação modificada de fármacos a partir de uma ampla variedade de materiais poliméricos e de diversos métodos de obtenção (TRAN; BENOÎTA; VENIER-JULIENNEA, 2011).

A microencapsulação pode permitir a proteção de fármacos sensíveis às condições ambientais, a eliminação de incompatibilidades entre dois ou mais ativos e o mascaramento do sabor desagradável dessas substâncias. As micropartículas são particularmente interessantes no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada. Esses materiais podem ampliar a biodisponibilidade de fármacos presentes em medicamentos de liberação imediata e minimizar possíveis efeitos colaterais (AHMAD *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2007).

O termo micropartícula é resultante do tamanho dessas partículas que apresentam, geralmente, um diâmetro médio entre 1 e 100 μm . Para a obtenção de micropartículas, é possível utilizar diversos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que são capazes de liberar o fármaco por mecanismos de difusão e/ou de degradação (erosão) do material polimérico (GARAY; POCHEVILLE; MADARIAGA, 2010; KISSEL *et al.*, 2006). Normalmente, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos de estruturas, as microesferas e as microcápsulas (Figura 2).

As microesferas são caracterizadas como sistemas matriciais, nos quais o fármaco está homogeneamente disperso no material polimérico. As microcápsulas, no entanto, constituem sistemas reservatórios, nos quais é possível identificar microdomínios diferenciados do fármaco, que podem ser sólidos ou líquidos (SUAVE *et al.*, 2006; KUMAR, 2000).

Figura 2 – Modelos de estrutura das micropartículas (adaptado de BIRNBAUM, BRANNON-PEPPAS, 2003)



O processo de microencapsulação, para ser considerado ideal, deve apresentar como características: rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo, facilidade em transpor para a escala industrial, além de ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e do material encapsulante em questão (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; GIUNCHEDI; CONTE, 1995).

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a obtenção de micropartículas, permitindo uma adequação às características físico-químicas dos diferentes fármacos. A escolha do procedimento mais efetivo na encapsulação de um determinado fármaco depende, basicamente, da hidrofília/lipofília do composto químico em avaliação (OBEIDAT, 2009).

Um sistema polimérico para a liberação de fármacos por via oral pode ser planejado e desenvolvido a partir de várias estratégias de processamento. Para a elaboração de microesferas, o método de emulsão e evaporação do solvente tem sido frequentemente empregado. Isso se deve à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Nesse caso, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução orgânica volátil contendo o polímero. Essa fase orgânica é emulsionada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido da fase interna pelo uso de calor, ou ainda, pela evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela aplicação de pressão reduzida. As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solventes adequados e secas sob condições

apropriadas ou liofilizadas (TRAN; BENOÎTA; VENIER-JULIENNEA, 2011; OBEIDAT, 2009; JAIN, 2000).

Apesar da simplicidade das etapas, a formação de microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se a agitação e a natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de solvatação do polímero e, preferencialmente, de dissolução do fármaco são características desejáveis ao solvente da fase interna. Além desses aspectos, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixa faixa de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação, o fármaco e o polímero também devem ter baixa solubilidade na fase externa (HESLINGA; MASTRIA; ENIOLA- ADEFESO, 2009; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

A eficiência de encapsulação é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração de fármaco inicialmente adicionado na formulação e a concentração presente nas partículas. Dessa maneira, quando o método de emulsão/evaporação do solvente é utilizado, a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por apresentar baixa hidrofília podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão fase orgânica em fase aquosa (O/A). Entretanto, quando fármacos com elevada hidrofília são empregados, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Nesse caso, a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão inversa (A/O), na qual um solvente polar contendo o fármaco e o polímero são emulsionados em uma fase oleosa, como o óleo mineral (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; SHUKLA; PRICE, 1989). Para fármacos hidrofílicos, é possível, ainda, a obtenção de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que a fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e essa emulsão resultante (A/O) é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (OBEIDAT, 2009; WATTS; DAVIES; MELIA 1990; OGAWA *et al.*, 1988). O método de secagem por aspersão ou *spray drying* tem sido também amplamente aplicado na formulação de sistemas microparticulados, pois possibilita a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, como de ativos lipofílicos em emulsão aquosa (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Diferentes materiais poliméricos, com pequena ou nenhuma toxicidade, podem ser empregados na obtenção de micropartículas, nas quais a substância farmacologicamente ativa está dispersa ou dissolvida (OLIVEIRA; LIMA, 2006). Nesse contexto, o poli(metacrilato de metila), o poli(álcool vinílico), a poliacrilamida, o polietilenoglicol, o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), os copolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico (PLGA) e a policaprolactona (PCL) têm sido os biomateriais considerados clássicos e mais comuns à formação de micropartículas contendo fármacos, peptídeos, proteínas e antígenos (CHAKRAPANI, 2006).

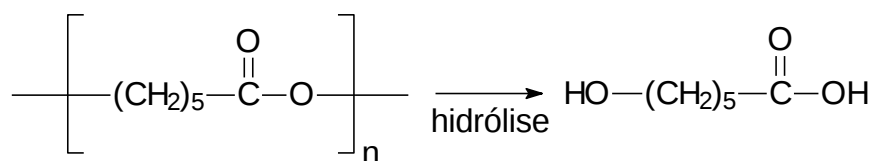
Outros materiais como proteínas (LU; ZHANG; YANG, 2003), polissacarídeos, (KATO; ONISHI; MACHIDA, 2003), lipídeos (REITHMEIER; HERRMANN; GÖPFERICH, 2001) e a quitosana (SUAVE *et al.* 2006) têm sido estudados na liberação controlada, embora com uma frequência menor.

3.3.1.1 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos, de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos. A PCL é um material semicristalino, que forma soluções coloidais em uma grande variedade de solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloro de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Entretanto, tem uma baixa solubilidade em acetona, acetato de etila, 2-butanona, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico. A fusão ocorre entre 59 e 64°C e sua transição vítrea (T_g), geralmente, está entre -70 e -60°C. Sua biocompatibilidade permite diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica (ROA *et al.*, 2010; SINHA *et al.*, 2004).

A PCL é capaz de sofrer degradação por meio de hidrólise das ligações éster da cadeia polimérica, gerando como produto final do processo o ácido ϵ -hidroxicaproico (Figura 3). Entretanto, a degradação da PCL é muito lenta devido a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração de água nas cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a ocorrência dessa reação (NAIR; LAURENCIN, 2007; SINHA *et al.*, 2004).

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da PCL



Fonte: MERKLI *et al.* (1998)

A lenta degradação da PCL em sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos não gera um microambiente ácido, como o produzido pelos polímeros PLA e PLGA. Esse fato é uma vantagem da PCL no desenvolvimento de micropartículas contendo proteínas, uma vez que essas macromoléculas podem desnaturar em função do pH e perder a sua atividade biológica. Outras vantagens relacionadas à PCL, frente aos polímeros PLA e PLGA, são o menor custo e a possibilidade de liberação de fármacos por um período mais prolongado (AL HAUSHEY *et al.*, 2007).

3.3.2 Sistemas de liberação modificada contendo capsaicinoides

Alguns trabalhos recentes têm demonstrado a viabilidade da incorporação de capsaicinoides, em especial, da capsaicina, em diferentes formulações de liberação modificada.

Tyagi *et al.* (2004) elaboraram lipossomas e hidrogéis termossensíveis para a liberação controlada de capsaicina no aparelho urinário, com o propósito de otimizar o tratamento de cistites. Os lipossomas, na forma de vesículas multilamelares, foram preparados na proporção molar de 2:1:1 (fosfatidilcolina, colesterol e capsaicina). O hidrogel foi obtido por meio do emprego do polímero PEG-PLGA-PEG. Em comparação com a solução etanólica a 30% contendo capsaicina, formulação habitual, os lipossomas foram considerados superiores para a administração intravesical da capsaicina, fornecendo eficiência comparável, com menor lesão tecidual. Os hidrogéis também foram considerados uma opção terapêutica segura para a liberação da capsaicina na região da bexiga.

Zi *et al.* (2008) avaliaram a capacidade da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) de influenciar a absorção percutânea da capsaicina através da pele de rato. Uma concentração de 2,2% (m/V) de HP β -CD permitiu a solubilização adequada do

fármaco e apresentou o melhor fluxo de penetração da capsaicina, em concentração de 0,075% (m/V).

Webster *et al.* (2010) desenvolveram um adesivo com elevada concentração de capsaicina (8%) para o tratamento da neuralgia herpética, uma complicação da herpes zoster. Os autores relataram a segurança e a eficácia desse adesivo na redução da dor, aplicado por um período de 60 minutos.

Yamauchi *et al.* (2010) imobilizaram a capsaicina em nanopartículas de sílica funcionalizadas com poli(amidoamina). O produto obtido foi disperso uniformemente em água e apresentou atividade estimulante em nervos sensoriais de camundongos, por meio de dois testes farmacológicos.

Choi *et al.* (2011) relataram a obtenção e a caracterização de nanoemulsões contendo capsaicina pelo método de automontagem camada-a-camada. O tamanho de partícula das nanoemulsões de camada dupla, preparadas com alginato ou quitosana, foram inferiores a 20 nm. A nanoemulsão de camada tripla, obtida a partir da complexação entre os dois biopolímeros, também foi elaborada com êxito e resultou em um tamanho de partícula médio de 16.69 nm. Segundo os mesmos autores, essas nanoemulsões constituem um sistema promissor para uso na produção de alimentos funcionais contendo capsaicina.

Contri *et al.* (2011) nanoencapsularam a capsaicina e a di-hidrocapsaicina, como uma estratégia para controlar a liberação, prolongar o efeito analgésico tópico e reduzir a sensação de ardência e irritação na pele. As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio 153 nm e potencial zeta de 9,62 mV. O pH da suspensão aquosa de nanopartículas foi de 5,72, o que é adequado para a aplicação cutânea. O teor de capsaicinoides foi de 0,5 mg/mL (64% de capsaicina e 33% de di-hidrocapsaicina), com eficiência de encapsulação próxima a 100%. Os perfis de dissolução *in vitro* demonstraram que a liberação da capsaicina e da di-hidrocapsaicina foi prolongada por meio de nanoencapsulação.

Kim *et al.* (2011) desenvolveram formulações de nanopartículas contendo capsaicina. Nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas com capsaicina foram preparadas pelo método de nanoprecipitação. Essas formulações apresentaram tamanho de partícula variando de 153 a 162 nm, eficiência de encapsulação entre 20 e 25% e liberação do fármaco de 5 a 11 dias. Para obter uma liberação mais prolongada, micropartículas de PLLA, PLGA e PCL foram obtidas por emulsão simples/evaporação-extração do solvente. As partículas

de PLLA mostraram um perfil de dissolução mais prolongado, atingindo 1 mês de liberação para as nanopartículas com 800 nm.

Tavano *et al.* (2011) avaliaram niossomas, formulados com uma mistura de Tween® 80 e Span® 80, contendo capsaicina para a sua administração tópica. Os niossomas foram comparados com microemulsões obtidas com a mesma proporção de tensoativos. Os estudos de permeação percutânea da capsaicina, a partir das formulações, foram realizados por meio de células de difusão de Franz. Embora os dois transportadores foram considerados eficazes, os niossomas apresentaram o melhor desempenho em relação às microemulsões, no que diz respeito à absorção transdérmica da capsaicina.

Na área de tecnologia de alimentos, Li *et al.* (2013) obtiveram formulações inovadoras contendo capsaicina, denominadas de *layered noodles*, massa elaborada em diferentes camadas, apreciada pelos consumidores asiáticos. Na fabricação, a capsaicina foi colocada entre duas camadas gastro-resistentes, constituídas por farinha de trigo, proteína isolada de soja e transglutaminase microbiana. O propósito desses produtos foi viabilizar a administração oral da capsaicina, por reduzir a irritação na cavidade oral e no estômago e prolongar a liberação no intestino. As formulações exibiram propriedades de tração e de textura adequadas, retenção elevada da capsaicina e foram aprovados no teste sensorial, em comparação com o controle.

Em termos comerciais, foi verificada a disponibilidade no mercado brasileiro de um ativo fitoquímico denominado Thermo Slim®, formado por microcápsulas contendo a oleoresina de *Capsicum* sp. Segundo as informações gerais do fornecedor, esse ativo foi desenvolvido para atuar como termogênico e sacietogênico por apresentar os capsaicinoides na sua composição.

Dessa forma, considerando o pequeno número de artigos relacionados à liberação modificada dos capsaicinoides, associado à possibilidade de reduzir a irritação resultante da administração oral dessas vanililamidas e de ter uma liberação prolongada ao longo do trato gastrointestinal, surge-se a perspectiva de instituir o uso de micropartículas poliméricas de PCL voltadas à administração oral de capsaicinoides, com potencial efeito no tratamento da obesidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

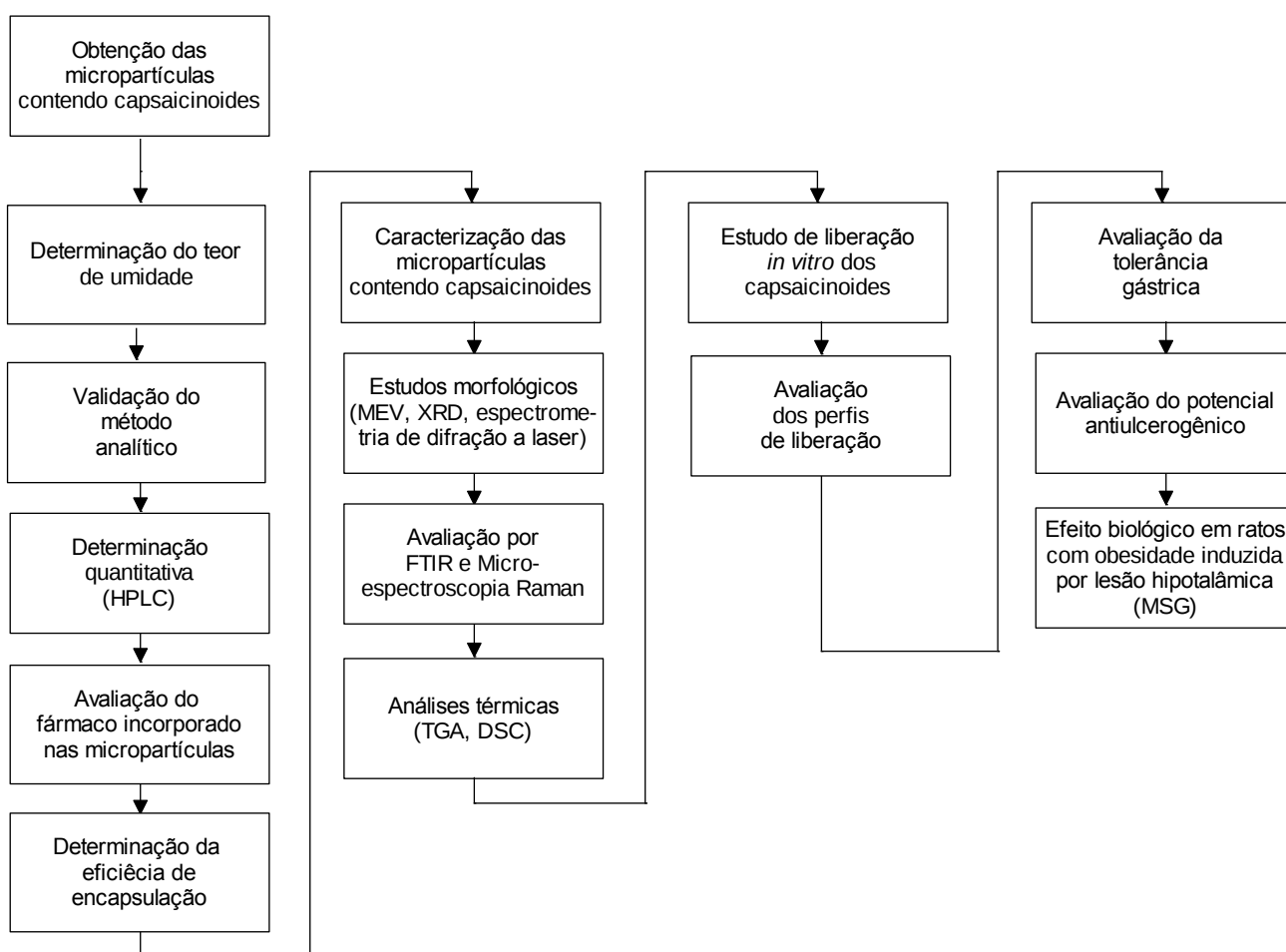
Os capsaicinoides foram adquiridos como uma mistura de 73,1% de capsaicina e 26,9% de dihidrocapsaicina do fornecedor Valdequímica Produtos Químicos (São Paulo, Brasil). Os polímeros poli- ϵ -caprolactona (PCL) ($\overline{M}_w$ 70.000 a 90.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e poli(álcool vinílico) (PVA) ($\overline{M}_w$ 72.000 g.mol⁻¹, 88,5 mol% de hidrólise, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram empregados sem qualquer tratamento prévio. Os demais reagentes e solventes apresentaram grau analítico e, quando necessário, grau HPLC. Água purificada pelo processo de osmose reversa no equipamento TE-4007-10 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) foi empregada para a obtenção das micropartículas. Água ultrapura, obtida por meio do Milli-Q[®] *Ultrapure Water Purification System* (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos), foi utilizada nas análises cromatográficas.

4.2 Fluxograma experimental

Este trabalho iniciou com a obtenção das micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides, nas concentrações de 3, 5 e 10% (m/m), utilizando o polímero biodegradável PCL. Após o cálculo do rendimento do processo de microencapsulação, foi verificada a umidade das micropartículas, frente ao fármaco e ao polímero de partida. Para a determinação quantitativa dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas poliméricas foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco. A validação foi realizada para os parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os sistemas microparticulados foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. A liberação *in vitro* dos capsaicinoides foi estudada a partir dos ensaios de dissolução, sendo que os perfis de liberação foram avaliados por métodos dependentes e independentes. A tolerância gástrica e o potencial antiulcerogênico das micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides foi investigada por meio da administração oral das formulações em ratos,

empregando gavagem gástrica. O efeito biológico das micropartículas contendo capsaicinoides na distribuição dos depósitos de gordura e nos parâmetros bioquímicos de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, LDL-colesterol e glicose, além da tolerância à insulina, foi estudado em ratos com obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico (MSG), frente ao controle. As etapas que compõe o presente estudo estão sumarizadas no fluxograma da Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do presente trabalho de dissertação



4.3 Preparação das micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides

As micropartículas contendo capsaicinoides foram preparadas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico (KANG *et al.*, 2007), empregando PCL como polímero. Os materiais obtidos nas concentrações teóricas de 0, 3, 5 e 10% de capsaicinoides na composição (MC0, MC3, MC5 e MC10, respectivamente) estão descritos na Tabela 2. Todas as formulações foram

desenvolvidas em triplicata, sendo que as micropartículas denominadas MC0 foram elaboradas na ausência do fármaco, como controle negativo.

Os capsaicinoides e o polímero PCL foram dissolvidos em 40 mL de diclorometano. Essa fase orgânica foi adicionada na fase aquosa, sob agitação mecânica de $3.500 \text{ rev.min}^{-1}$ por 5 min, em equipamento Fisatom, modelo 713 (São Paulo, Brasil). A emulsão foi mantida em agitação mecânica de $1000 \text{ rev.min}^{-1}$, a temperatura ambiente, durante 6 h, em capela de exaustão. Transcorrido o tempo para a evaporação do solvente orgânico, as micropartículas foram separadas por centrifugação a $2.000 \text{ rev.min}^{-1}$ durante 10 min, em centrífuga para tubos Bio Eng, modelo BE-4004 (São Paulo, Brasil), e lavadas, por 2 vezes, com água purificada. Os produtos obtidos foram secos em estufa a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (Estufa Quimis, modelo Q-136M4, Diadema, Brasil).

Tabela 2 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides.

Composição	Formulação			
	MC0	MC3	MC5	MC10
Fase aquosa				
Polisorbato 80 (g)	0,25	0,25	0,25	0,25
PVA (g)	4,00	4,00	4,00	4,00
Água purificada (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0
Fase Orgânica				
Capsaicinoides (g)	—	0,06	0,10	0,20
PCL (g)	2,00	1,94	1,90	1,80
Diclorometano (mL)	40,0	40,0	40,0	40,0

4.3.1 Mistura física

A mistura física entre os capsaicinoides e a PCL foi elaborada para uma caracterização comparativa com os materiais microparticulados em estudo. Foi preparada uma mistura física na proporção, em massa, de 1:1 (capsacinoides:PCL) (50% m/m).

4.3.2 Rendimento

O rendimento foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação das micropartículas pela soma das massas do fármaco e do polímero, excluindo os demais componentes, conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \left(\frac{\text{massa de micropartículas}}{\text{massa inicial (PCL+capsaicinoides)}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4 Determinação da umidade

O conteúdo de água presente no fármaco, no polímero e nas micropartículas foi avaliado no analisador de umidade por infravermelho (Bel Engineering, modelo TOP RAY 160, Monza, Itália). Previamente, a termobalança foi calibrada, conforme as indicações do fabricante.

Para cada amostra, uma massa exata, de aproximadamente 1 g, foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105°C, durante um período de tempo variável, até massa constante. O valor em porcentagem referente à perda de massa foi calculado como sendo o teor de umidade da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Determinação quantitativa

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrofotometria no UV, em sistema cromatográfico Merck-HitachiLaChrom, modelo D-7000 (Darmstadt, Alemanha), conforme os parâmetros estabelecidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação dos capsaicinoides por HPLC/UV.

Características analíticas	Descrição
Coluna	LiChrospher [®] RP-18 250 X 4,6 mm, 5 μm
Temperatura do forno	30°C
Fase móvel	água ajustada com ácido acético glacial para pH 4,5:acetonitrila (30:70)
Volume de injeção	20 μL
Fluxo	0,75 mL.min^{-1}
Detecção	UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$)

4.5.1 Validação do método analítico para quantificação dos capsaicinoides presentes nas micropartículas

Previamente, o método de quantificação passou pelo processo de validação analítica. A validação do método analítico por HPLC/UV foi realizada segundo os critérios propostos pelo ICH (*International Conference on Harmonization*) (2005) e resolução R.E. 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada por comparação do cromatograma das micropartículas MC0 (controle negativo) com os cromatogramas das formulações contendo capsaicinoides (MC3, MC5 e MC10), com o propósito de confirmar que nenhum dos excipientes usados na preparação das micropartículas interferiu na quantificação do fármaco.

Para o estudo da linearidade e do intervalo, foram elaboradas três curvas analíticas, com sete níveis de concentração (10, 20, 25, 30, 35, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizando etanol como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, por meio da relação entre o desvio padrão da curva analítica e a sua inclinação, usando os fatores multiplicadores sugeridos pela norma ICH (2005), conforme demonstrado nas Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e B, o coeficiente angular.

Para avaliar a repetibilidade, três concentrações diferentes (10, 30 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas em triplicata, totalizando nove determinações, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intradia. A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em

triplicata, mas realizadas em três dias não-consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida de fármaco ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à solução-amostra, resultando nas concentrações de 22, 32 e $42 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

Para a avaliação da robustez, as concentrações de 10, 30 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, de temperatura e de coluna cromatográfica e avaliadas em triplicata. O fluxo foi modificado de $0,75\text{mL.min}^{-1}$ para 0,65 e $0,85 \text{mL.min}^{-1}$. A temperatura foi alterada de 30°C para 35 e 45°C . A coluna cromatográfica foi trocada pela coluna similar Waters XTerra C18 (250 X 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$). Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão.

As soluções-amostra utilizadas para a avaliação da repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez foram preparadas a partir da formulação MC5.

4.5.2 Determinação dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas

Resumidamente, foi pesada uma massa exata de micropartículas, equivalente a 3 mg de capsaicinoides. Esse material foi disperso em 7 mL de etanol e mantido por 24 h, em agitação magnética ($1000 \text{ rev.min}^{-1}$), empregando o agitador magnético Fisatom, modelo 753A (São Paulo, Brasil). O volume foi completado, em balão volumétrico, com o mesmo solvente, até 10 mL e filtrado por membrana de poli(fluoreto de vinilideno) (Durapore[®], filtro hidrofílico, $0,45\mu\text{m}$ de abertura dos poros, Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Em seguida, o filtrado foi diluído em etanol para uma concentração teórica de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a concentração real do fármaco foi determinada por HPLC/UV em 280 nm. O doseamento foi realizado em triplicata, frente ao método analítico previamente validado na faixa de 10 a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.5.3 Eficiência de encapsulação

Considerando os resultados obtidos na quantificação dos capsaicinoides, a eficiência de encapsulação (EE, %) foi calculada a partir da diferença entre a massa

de fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas micropartículas, conforme demonstrado na Equação 4.

$$EE = \left(\frac{\text{massa dos capsaicinoides nas micropartículas}}{\text{massa inicial (teórica) dos capsaicinoides}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

4.6 Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados

As micropartículas poliméricas contendo capsaicinoides foram caracterizadas por métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos.

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas foi efetuada no microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM-6360LV (Quioto, Japão). As micropartículas foram levadas à estufa a vácuo Tecnal, modelo TE 395 (Piracicaba, Brasil) e, posteriormente, fixadas em suporte metálico. Na sequência, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento Balzers Sputtering, modelo SCD-030 (Bingen, Alemanha). As micrografias foram obtidas em diferentes magnificações, após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do software específico, *The SEM ControlUser® Interface* (versão 6.01, JeolTechnics, Quioto, Japão).

4.6.2 Difração de raios X (XRD)

As micropartículas poliméricas, o fármaco, o polímero de partida e a mistura física foram examinados em difratômetro de raios X Rigaku, modelo Ultima IV (Shibuya-Ku, Japão), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 30 mA e voltagem 40 kV.

4.6.3 Tamanho de partícula e dispersão granulométrica

O tamanho de partícula das formulações foi avaliado por espectrometria de difração a laser, utilizando um granulômetro a laser Cilas 920L (Marseille, França), com faixa de análise entre 0,3 a $400 \mu\text{m}$.

As amostras pulverizadas e secas foram dispersas em água filtrada e sonicadas por 1 min, antes de ser realizada a medida. A partir da suspensão

homogênea obtida, por meio do software específico, *The Particle Expert*[®] (versão 5.12, Cilas, Marseille, França), o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados. O *span*, valor matemático definido como a medida da dispersão granulométrica, que avalia a variação do volume de distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio, foi calculado a partir da Equação 5.

$$span = \frac{d_{(v,90)} - d_{(v,10)}}{d_{(v,50)}} \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo, $d_{(v,10)}$, $d_{(v,50)}$ e $d_{(v,90)}$, respectivamente, o diâmetro das partículas correspondente a 10, 50 e 90% da distribuição acumulada para a amostra.

4.6.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

As micropartículas poliméricas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% em massa), no equipamento Shimadzu, modelo IR Prestige-21 (Quioto, Japão), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das micropartículas foram avaliados frente aos espectros do fármaco, do polímero de partida e da mistura física.

4.6.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas de TGA, que foram obtidas na faixa de temperatura entre 20 e 800°C. Para isso, foi empregada uma termobalança Shimadzu, modelo TGA-50 (Quioto, Japão), sob razão dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹), empregando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em microcadinhos de alumina contendo aproximadamente 5 ± 0,1 mg da amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

4.6.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas foram elaborados para o fármaco capsaicinoides, para o polímero PCL, para a mistura física e para as micropartículas preparadas, na faixa

de temperatura entre – 100 e 120°C. Foi utilizada uma célula calorimétrica Netzsch, modelo DSC 200 F3 (Burlington, VE, USA), em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, sendo que a amostra (2,5 mg) foi acondicionada em cápsula de alumínio fechada. O equipamento foi previamente calibrado com índio (f.f. = 156,6°C; $\Delta H_{fusão} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) e zinco (f.f. = 419,6°C).

4.7 Estudo de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram conduzidos para o fármaco puro (capsaicinoides em mistura de 73,1% de capsaicina e 26,9% de di-hidrocapsaicina) e para as micropartículas MC3, MC5 e MC10. Para tanto, foi empregado o aparato 2 (pá) do dissolutor de cubas 299/3 (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil), mantendo a temperatura do sistema em $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, a agitação em 75 rev.min⁻¹, por um período total de 36 h. O meio de dissolução utilizado foi o tampão fosfato pH = 6,8 (50 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 22,4 mmol.L⁻¹ de NaOH), contendo 0,1% (m/V) de Tween[®] 80, em volume de 900 mL. Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras de 10 mL foram coletadas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume, e analisadas em 210 nm no espectrofotômetro UV-Vis Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10 UV Scanning (Madison, WI, Estados Unidos).

4.7.1 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação *in vitro* foram obtidos plotando-se a porcentagem de capsaicinoides liberada em função do tempo. Posteriormente, esses resultados foram analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução) e dos métodos modelo-dependentes.

A eficiência de dissolução dos capsaicinoides foi determinada segundo Gil, Orlando e Matias (2005) e Khan (1975), e comparada com a eficiência de dissolução das diferentes formulações de micropartículas. A eficiência de dissolução é uma avaliação modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução e expressa como a porcentagem da área de um retângulo que descreve 100% da dissolução, em um determinado período de tempo (Equação 6).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

Na qual: y é a porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t.

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 7), ao modelo biexponencial (Equação 8), ao modelo de ordem zero (Equação 9) e ao modelo de Weibull (Equação 10), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 7})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad (\text{Equação 8})$$

$$\%D = kt \quad (\text{Equação 9})$$

$$\%D = 100[1 - e^{-\left(\frac{t}{Td}\right)^b}] \quad (\text{Equação 10})$$

Nas quais: %D, percentual do fármaco dissolvido no tempo t ; k , α e β , constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B , concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; Td , tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b , parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 11) ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n , com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco a partir dos sistemas microparticulados.

$$ft = at^n \quad (\text{Equação 11})$$

Na qual: a , constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n , expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft , fração do fármaco dissolvido no tempo t .

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento (ou erosão) do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte

não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software *MicroMath Scientist*[®] (versão 2.01, Saint Louis, MO, Estados Unidos).

4.8 Ensaios biológicos *in vivo*

As micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides (MC5) foram testadas em três diferentes modelos farmacológicos *in vivo* com o propósito de avaliar a tolerância gástrica, o potencial antiulcerogênico e o efeito dessas formulações na obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEPG), sob o protocolo de número 14/2012, em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.8.1 Tolerância gástrica

4.8.1.1 Animais

Ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, pesando entre 180 e 230 g, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12/12 h), com água e ração *ad libitum*.

4.8.1.2 Protocolo experimental

Trinta ratos foram randomicamente divididos em cinco grupos de seis animais cada. O grupo CAP recebeu capsaicinoides (30 mg/kg, via oral); ao grupo MC5, foi administrada a formulação de micropartículas de PCL contendo capsaicinoides (MC5, em quantidade equivalente a 30 mg/kg de capsaicinoides, via oral); o grupo MC0 recebeu a formulação de micropartículas de PCL sem fármaco (MC0, em massa equivalente ao grupo MC5); ao grupo TCM, foi administrado o veículo usado

nas formulações, 1 mL de triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos do ácido cáprico e ácido caprílico); e o grupo SAL recebeu 1 mL de solução salina a 0,9% (m/V). O tratamento foi feito por um período de 15 dias consecutivos, com administração oral por gavagem gástrica, uma vez ao dia (FANDOHAN *et al.*, 2008). Após o período de administração, os animais foram eutanasiados para posterior remoção do estômago e análise histológica.

4.8.1.3 Análise histológica

Após os ratos terem sido sacrificados, empregando uma overdose de anestésicos (quetamina e xilazina), os estômagos foram retirados por meio de uma incisão abdominal e imediatamente lavados com água destilada por duas vezes. Cada estômago foi transferido para um recipiente contendo solução de Bouin para a fixação. Após 24 h, esse órgão foi armazenado em álcool 70% (V/V). Para a análise histológica, cada estômago foi processado, embebido em parafina, seccionado em espessura de 5 µm, e corados com hematoxilina e eosina para a avaliação microscópica (FANDOHAN *et al.*, 2008).

4.8.2 Atividade antiulcerogênica

4.8.2.1 Animais

Os experimentos de atividade antiulcerogênica foram conduzidos com ratos Wistar machos, de aproximadamente 90 dias, pesando entre 250 e 300 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12/12 h).

4.8.2.2 Protocolo experimental

Quarenta e dois ratos foram randomicamente divididos em sete grupos de seis animais cada. O grupo CAP recebeu capsaicinoides (15 mg/kg, via oral); ao grupo MC5, foi administrada a formulação de micropartículas de PCL contendo capsaicinoides (MC5, em quantidade equivalente a 15 mg/kg de capsaicinoides, via oral); o grupo MC0 recebeu a formulação de micropartículas de PCL sem fármaco (MC0, em massa equivalente ao grupo MC5); ao grupo RAN, foi administrada ranitidina (100 mg/kg, via oral); o grupo OME recebeu omeprazol (20 mg/kg); ao grupo TCM, foi administrado o veículo usado nas formulações, 0,5 mL de

triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos do ácido cáprico e ácido caprílico); e o grupo H₂O recebeu 0,5 mL de água. Depois de uma hora, os ratos receberam por via oral, através de gavagem gástrica, 0,5 mL de etanol P.A. para induzir úlceras gástricas (COSTA *et al.*, 2012). Os animais foram eutanasiados, uma hora após o tratamento com o agente ulcerogênico. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da curvatura maior e, em seguida, lavados com soro fisiológico 0,9%. Na sequência, as lesões foram identificadas, qualificadas e quantificadas, empregando o índice de lesões ulcerativas.

4.8.2.3 Índice de lesões ulcerativas (ILU)

As lesões foram avaliadas quali-quantitativamente, recebendo uma pontuação conforme a classificação: lesão ulcerativa com área maior do que 1 mm: 1 ponto; lesão ulcerativa com área menor do que 1 mm: 1 ponto; lesão hemorrágica: 1 ponto; perda de pregas: 1 ponto; perda de cor: 1 ponto; e lesões petequiais (até 10 petéquias: 1 ponto; até 20: 2 pontos; 30 ou mais: 3 pontos). Os resultados foram expressos como índice de lesões ulcerativas (ILU), por meio da Equação 12.

$$ILU = (3xA) + (2xB) + C + D + E + F \quad (\text{Equação 12})$$

Na qual: A, lesão ulcerativa > 1 mm; B, lesão ulcerativa < 1 mm; C, lesão hemorrágica; D, perda de pregas; E, perda de cor; F, lesões petequiais.

Considerando o ILU obtido para todos os grupos experimentais, foi possível calcular a porcentagem de inibição da ulceração em relação ao grupo controle negativo (H₂O), de acordo com a Equação 13.

$$\% \text{ Inibição da ulceração} = \left(\frac{ILU_{\text{controle negativo}} - ILU_{\text{teste ou controle positivo}}}{ILU_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

4.8.3 Efeito das micropartículas poliméricas de PCL contendo capsaicinoides no tratamento da obesidade

4.8.3.1 Animais

Sessenta ratos Wistar machos, logo após o nascimento, foram divididos randomicamente em dois grupos, denominados de grupo MSG (ratos obesos) e de

grupo CON (ratos controle). A obesidade foi induzida pela administração intradérmica de L-glutamato monossódico (MSG), durante os primeiros cinco dias de vida, nos ratos do grupo MSG, empregando a dose de 4 g/kg. No mesmo período, injeções intradérmicas de solução salina equimolar (cloreto de sódio 0,9% m/V) foram administradas ao grupo CON, com o propósito de reproduzir o mesmo estresse da aplicação sofrida pelo grupo MSG. Para ambos os grupos, a ninhada foi mantida com a fêmea progenitora até o 21º. dia de vida, quando foram desmamados. Durante todo o protocolo experimental, os animais permaneceram em ambiente climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12/12 h).

4.8.3.2 Protocolo experimental

Aos sessenta dias após o nascimento, trinta ratos pertencentes ao grupo MSG (ratos obesos) foram novamente divididos, de forma aleatória, em cinco grupos de seis animais cada. O grupo MSG-CAP recebeu capsaicinoides (15 mg/kg, via oral); ao grupo MSG-MC5, foi administrada a formulação de micropartículas de PCL contendo capsaicinoides (MC5, em quantidade equivalente a 15 mg/kg de capsaicinoides, via oral); o grupo MSG-MC0 recebeu a formulação de micropartículas de PCL sem fármaco (MC0, em massa equivalente ao grupo MC5); ao grupo MSG-TCM, foi administrado o veículo usado nas formulações, 1 mL de triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos do ácido cáprico e ácido caprílico); e o grupo MSG-SAL recebeu 1 mL de solução salina a 0,9% (m/V).

O mesmo procedimento foi adotado para trinta animais do grupo CON (ratos controle), compondo cinco novos grupos de seis animais cada. Ao grupo CON-CAP, foram administrados capsaicinoides (15 mg/kg, via oral); o grupo CON-MC5 recebeu a formulação de micropartículas de PCL contendo capsaicinoides (MC5, em quantidade equivalente a 15 mg/kg de capsaicinoides, via oral); ao grupo CON-MC0, foi administrada a formulação de micropartículas de PCL sem fármaco (MC0, em massa equivalente ao grupo MC5); o grupo CON-TCM recebeu o veículo usado nas formulações, 1 mL de triglicerídeos de cadeia média (triglicerídeos do ácido cáprico e ácido caprílico); e, ao grupo CON-SAL, foi administrado 1 mL de solução salina a 0,9% (m/V).

O tratamento foi realizado por um período de 30 dias consecutivos, com administração oral por gavagem gástrica, uma vez ao dia (GRASSIOLLI, GRAVENA,

MATHIAS, 2007). Aos 90 dias, amostras de sangue dos ratos foram coletadas para a quantificação de parâmetros bioquímicos, sendo que os animais foram também eutanasiados para a avaliação da obesidade.

4.8.3.3 Obtenção das amostras de sangue

Finalizado o tratamento de 30 dias, após jejum de 8 h, os animais pertencentes aos grupos MSG e aos grupos CON foram pesados e amostras de sangue foram retiradas da veia caudal em microtubos heparinizados e fluoretados. O plasma foi separado por centrifugação, a 3500 rpm durante 10 minutos, em centrífuga para tubos Bio Eng, modelo BE-4004 (São Paulo, Brasil). Os plasmas foram armazenados a – 40°C para as análises bioquímicas posteriores.

4.8.3.4 Avaliação da obesidade

Após a coleta de sangue para as análises bioquímicas, os animais dos grupos MSG e dos grupos CON foram anestesiados por quetamina (55 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) e sacrificados por deslocamento cervical (GRASSIOLLI, GRAVENA, MATHIAS, 2007). O comprimento nasoanal (cm) foi então determinado, para a obtenção do índice de Lee (BERNARDIS, PATTERSON, 1968), de acordo com a Equação 14.

$$\text{Índice de Lee} = \left(\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal(g)}}}{\text{comprimento nasoanal(cm)}} \right) \times 1000 \quad (\text{Equação 14})$$

Os depósitos de gordura presentes na região mesentérica, na região periepididimal e na região retroperitoneal foram cuidadosamente removidos a partir de uma incisão peritoneal (YAN *et al.*, 2007). Após a lavagem com água destilada, as massas de tecido adiposo foram determinadas por meio do uso de uma balança analítica, com capacidade de 220 g e sensibilidade de 0,1 mg.

4.8.3.5 Determinação de parâmetros bioquímicos

A concentração de colesterol total foi determinada no plasma heparinizado, por meio do método colorimétrico-enzimático, utilizando o kit comercial colesterol CHOD-PAP (Kovalent, São Gonçalo, Brasil). Para isso, 1000 µL do reagente de colesterol foram adicionados a 10 µL da amostra de plasma. Após um período de

incubação de 10 min a 37°C, a absorvância foi lida em 500 nm, por meio do equipamento automatizado ADVIA 1200 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, Estados Unidos). A dosagem foi feita em duplicata.

A determinação da concentração de HDL-colesterol no plasma heparinizado foi realizada em duplicata por meio da utilização do kit enzimático-colorimético Direct HDL Cholesterol (Siemens Healthcare Diagnostics), sendo que a absorvância foi lida em 596 nm, no equipamento automatizado ADVIA 1200 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics).

A concentração de triglicerídeos séricos foi medida por método enzimático-colorimétrico com o kit comercial GPO-PAP (Kovalent) em duplicata. Para isso, 1000 µL do reagente de triglicerídeos foram adicionados a 10 µL do plasma heparinizado. Após um período de incubação de 10 min a 37°C, a absorvância foi lida em 500 nm, empregando o equipamento automatizado ADVIA 1200 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics).

Com base nos valores obtidos previamente para o colesterol total, para o HDL-colesterol e para os triglicerídeos, a concentração de LDL-colesterol foi estimada pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD, LEVY, FREDRICKSON, 1972), conforme a Equação 15.

$$LDL_{colesterol} = colesterol\ total - \left[HDL_{colesterol} + \left(\frac{TG}{5} \right) \right] \quad (\text{Equação 15})$$

Na qual: *TG*, triglicerídeos.

A determinação da concentração de glicose no plasma fluoretado foi realizada em duplicata por meio do kit enzimático-colorimético GOD-PAP (Kovalent), sendo que a absorvância foi lida em 500 nm, no equipamento automatizado ADVIA 1200 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics).

4.9 Análises estatísticas

Os resultados da atividade antiulcerogênica, dos parâmetros de obesidade e dos ensaios bioquímicos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância (ANOVA) fator único, com *post hoc* de Bonferroni, empregando o software GraphPad Prism (versão 4.0, LaJolla, CA, Estados Unidos). A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas contendo capsaicinoides foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples (O/A) e evaporação do solvente. Após a secagem, os materiais apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento de cor branca.

5.1 Rendimento

Os rendimentos do processo de microencapsulação estão descritos na Tabela 4. Todas as formulações revelaram valores médios de rendimento superiores a 75%, o que pode ser considerado aceitável, a partir do método de microencapsulação empregado.

Tabela 4 – Rendimento* obtido para as formulações de micropartículas, a partir do método de emulsão simples/evaporação do solvente.

Formulação	Capsaicinoides (mg.g⁻¹)	Rendimento (%)
MC0	—	79,8 ± 3,2
MC3	30	80,5 ± 1,0
MC5	50	75,7 ± 4,0
MC10	100	78,7 ± 5,0

* média (n = 3) ± desvio padrão

5.2 Determinação do teor de umidade

A Tabela 5 fornece os resultados referentes ao teor de água presente no fármaco, no polímero e nas micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10. O fármaco indicou um conteúdo de água bastante reduzido, de apenas 0,19%. Foi verificado que as micropartículas apresentaram um teor de umidade semelhante ou inferior ao do polímero puro, variando entre 0,78 e 1,15%, respectivamente para as formulações MC5 e MC3.

Tabela 5 – Teor de água* obtido para os capsaicinoides, para a PCL e para as micropartículas.

Material	Umidade (%)
Capsaicinoides	0,19± 0,03
PCL	1,07± 0,06
MC0	0,86± 0,05
MC3	1,15± 0,09
MC5	0,78± 0,08
MC10	1,00± 0,09

* média (n = 3) ± desvio padrão

Esses resultados indicam que o processo de secagem em estufa a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ foi efetivo na remoção da água empregada no processo de microencapsulação. A quantidade de água residual nos pós tem grande influência sob a sua estabilidade física, ao mesmo tempo em que controla a magnitude das forças capilares responsáveis pela agregação das partículas (BOSQUILLON *et al.*, 2004). Dessa forma, o teor de água tem relevância para prever possíveis alterações nos materiais elaborados. Considerando que os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma umidade reduzida, é possível estabelecer que essa água residual tenha pouca interferência na estabilidade física das micropartículas.

Além disso, está condizente com o observado em estudos prévios sobre micropartículas como sistemas de liberação de fármacos. Raffin *et al.* (2003), ao elaborar aglomerados de micropartículas poliméricas contendo pantoprazol sódico por *spray drying*, obtiveram valores de umidade residual de 2%. Mendes *et al.* (2012) prepararam micropartículas de PCL contendo resveratrol pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico e verificaram valores médios de umidade inferiores a 1,57%.

5.3 Determinação dos capsaicinoides incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação

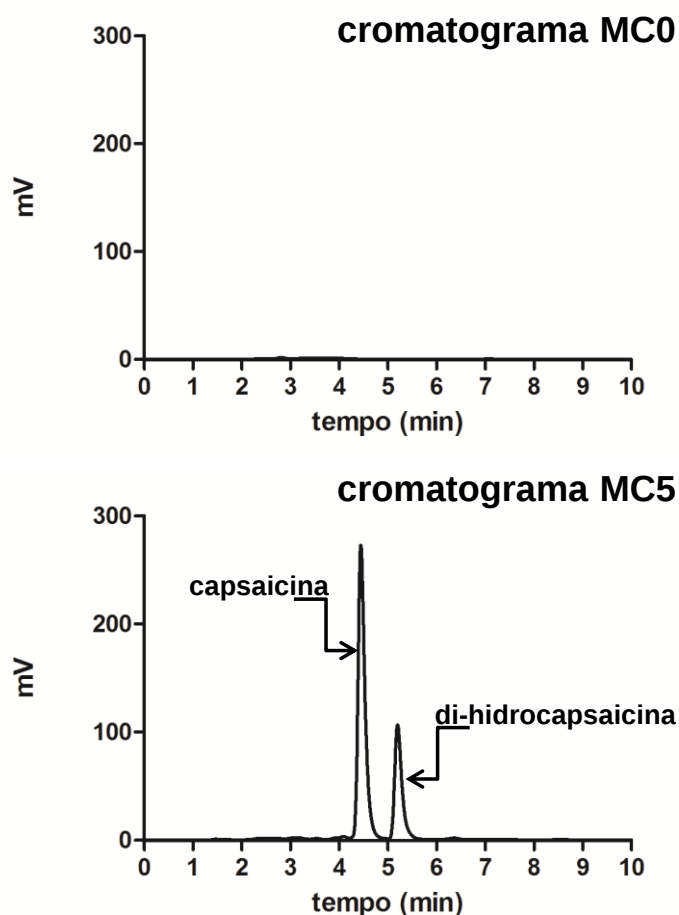
5.3.1 Validação do método analítico para a quantificação dos capsaicinoides presentes nas micropartículas

A partir dos parâmetros cromatográficos previamente estabelecidos para a quantificação dos capsaicinoides por HPLC/UV, foram observados tempos de retenção de 4,43 e 5,18 min nos cromatogramas das amostras de micropartículas, respectivamente para a capsaicina e para a di-hidrocapsaicina. Esses tempos de retenção reduzidos possibilitaram uma determinação rápida dos capsaicinoides, a qual é importante em análises de rotina nos laboratórios de P&D e de controle de qualidade de fármacos e medicamentos.

A partir da comparação do cromatograma do controle negativo (MC0) com o cromatograma de uma formulação contendo capsaicinoides (MC5), foi possível verificar que nenhum dos excipientes empregados na obtenção das micropartículas acarretou interferência nos picos cromatográficos da capsaicina e da di-hidrocapsaicina (Figura 5). Isso demonstra que o método por HPLC/UV proposto é

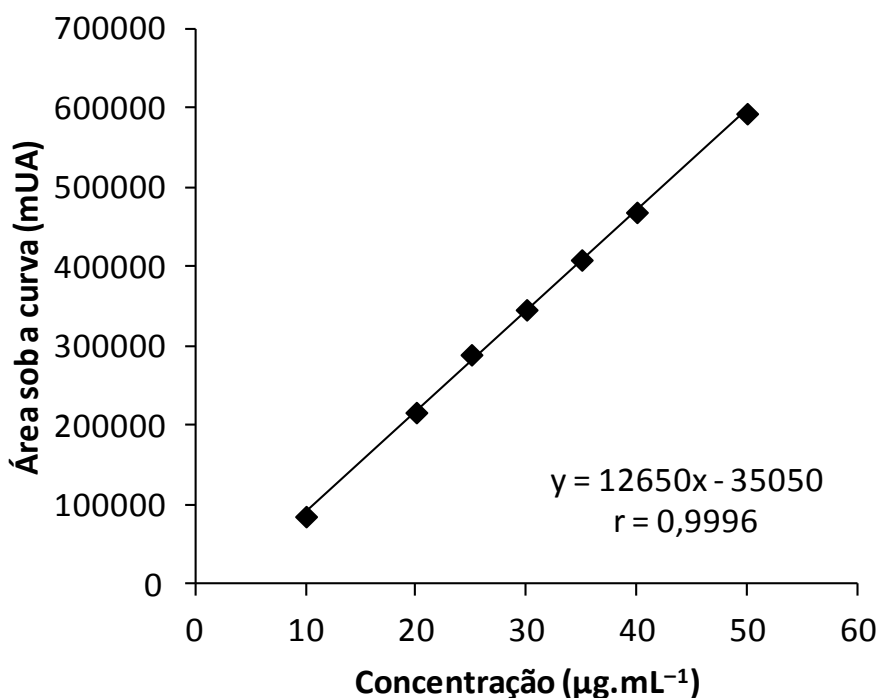
específico para a análise dos capsaicinoides incorporados em micropartículas de PCL por emulsão simples e evaporação do solvente orgânico.

Figura 5 – Cromatogramas obtidos para as formulações MC0 e MC5



A partir das três curvas analíticas elaboradas para a determinação quantitativa dos capsaicinoides por HPLC/UV, o estudo de linearidade revelou um valor de coeficiente de correlação (r) médio igual a 0,9996, indicando uma regressão linear significativa entre as áreas dos picos e as concentrações dos capsaicinoides no intervalo de concentração de 10 a 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A Figura 6 ilustra a curva analítica média obtida para quantificação do fármaco em solução etanólica, apresentando a equação da reta e o valor do r médio encontrado.

Figura 6 – Curva analítica padrão para a determinação dos capsaicinoides obtida por HPLC/UV ($\lambda = 280$ nm) em etanol



Considerando que a concentração teórica das soluções analíticas para a determinação dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas foi estabelecida em $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o método HPLC/UV proposto cumpre o requisito de intervalo, uma vez que apresenta linearidade na faixa de alcance de 80 a 120% da concentração teórica do teste conforme o preconizado na legislação (BRASIL, 2003), ou seja, na faixa de 24 a $36 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 2 e 3, respectivamente. Os valores obtidos foram $18,49 \text{ ng.mL}^{-1}$ para o limite de detecção e de $56,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ para o limite de quantificação.

Os resultados de repetibilidade e de precisão intermediária, expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR), estão apresentados na Tabela 6. Para ambos os estudos, os valores de DPR foram inferiores a 5%, demonstrando a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico empregado (BRASIL, 2003).

Tabela 6 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para o método HPLC/UV.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR dia 3 (%)	Média (%)
10	2,03			
30	0,88	1,05	0,92	0,95
50	1,75			

No que diz respeito à avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 99,06% para concentração final de $22 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 99,93% para $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 98,92% para $42 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultando em uma percentagem média de recuperação de 99,30%, o que caracteriza o método como exato, segundo os preceitos do ICH (2005) e do BRASIL (2003).

A robustez de um método analítico indica a capacidade do método desenvolvido em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, bem como sua confiabilidade durante o uso (BRASIL, 2003). As variações nos parâmetros de análise estabelecidos, fluxo, temperatura e tipo de coluna cromatográfica, apresentaram um DPR inferior a 5%, o que caracteriza o método como robusto.

Dessa forma, a partir dos resultados previamente apresentados para os parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, é possível inferir que o método HPLC/UV cumpre com todos os parâmetros necessários de validação analítica e é adequado para a quantificação simultânea dos capsaicinoides capsaicina e dihidrocapsaicina presentes nas micropartículas de PCL em estudo.

5.3.2 Determinação dos capsaicinoides incorporados nas micropartículas e eficiência de encapsulação

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) e a eficiência de encapsulação (%) estão resumidas na Tabela 7. Todas as formulações apresentaram valores adequados de EE, superiores a 90%. Esses valores podem ser justificados, principalmente, devido à baixa solubilidade aquosa dos capsaicinoides [a capsaicina tem solubilidade de $10,3 \text{ mg.L}^{-1}$ em água a 25°C (HSDB, 2006)], o que acarretou uma concentração elevada do fármaco no interior das micropartículas.

Tabela 7 – Teor¹ de capsaicinoides incorporados nas micropartículas de PCL (mg.g⁻¹) e eficiência de encapsulação² (EE, %).

Material	Capsaicinoides (mg.g ⁻¹)	EE (%)
MC0	—	—
MC3	27,77 ± 1,08	92,6
MC5	47,65 ± 2,11	95,3
MC10	95,23 ± 1,52	95,2

¹média (n=3) ± desvio padrão

²média (n=3)

Xing *et al.* (2003), ao elaborar microcápsulas contendo capsaicina por coacervação complexa, empregando soluções de acácia e de gelatina, na presença de soluções de glutaraldeído e de taninos, verificaram valores de eficiência de encapsulação entre 70,94 e 88,21%. Kim *et al.* (2011) obtiveram nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), incorporando a capsaicina por nanoprecipitação. Esses autores relataram valores de eficiência de encapsulação variando entre 20 e 25%. Em contrapartida, Contri *et al.* (2011) formularam nanocápsulas de Eudragit[®] RS100 contendo capsaicinoides pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e encontraram valores de eficiência de encapsulação próximos a 100% para ambos os capsaicinoides (99,78 e 99,92% para a capsaicina e para a dihidrocapsaicina, respectivamente).

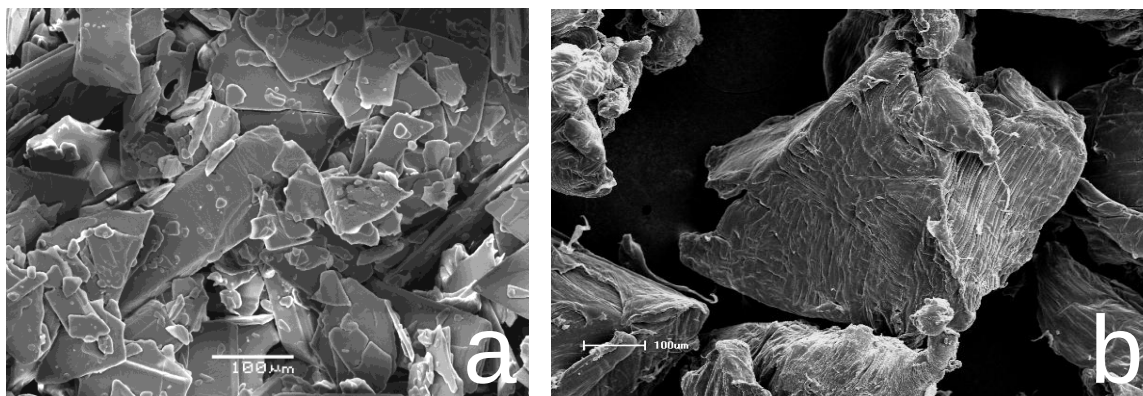
Dessa forma, as micropartículas em estudo apresentaram valores condizentes com a literatura, considerando as características físico-químicas do fitofármaco e o método de obtenção empregado.

5.4 Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

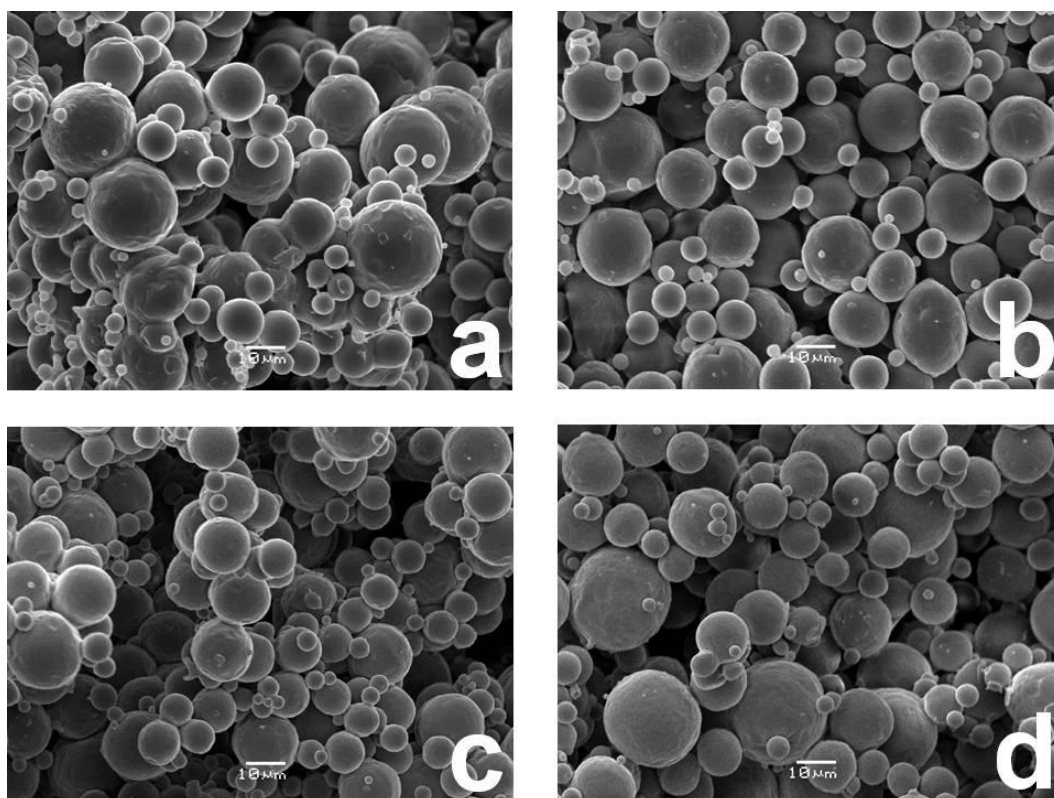
Os resultados obtidos por MEV para os capsaicinoides e para o polímero (PCL) estão indicados na Figura 7. Foi observado que o fármaco (Figura 7a) apresentou uma morfologia cristalina. Os péletes de PCL, apresentaram uma superfície levemente irregular (Figura 7b).

Figura 7 – Fotomicrografias dos capsaicinoides (a) e da PCL (b) aumento de 100X



As micropartículas MC0 (Figura 8a), MC3 (Figura 8b), MC5 (Figura 8c) e MC10 (Figura 8d) revelaram formato esférico, com superfície lisa e regular, sem a presença de poros. Não foi verificada a presença de cristais de capsaicinoides na superfície das micropartículas. Esses aspectos morfológicos estão de acordo com o relatado em estudos prévios utilizando o polímero PCL e o método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico (MENDES *et al.* 2012).

Figura 8 – Fotomicrografias das micropartículas obtidas por MEV aumento de 1000 X, MC0 (a), MC3 (b), MC5 (c) e MC10 (d)

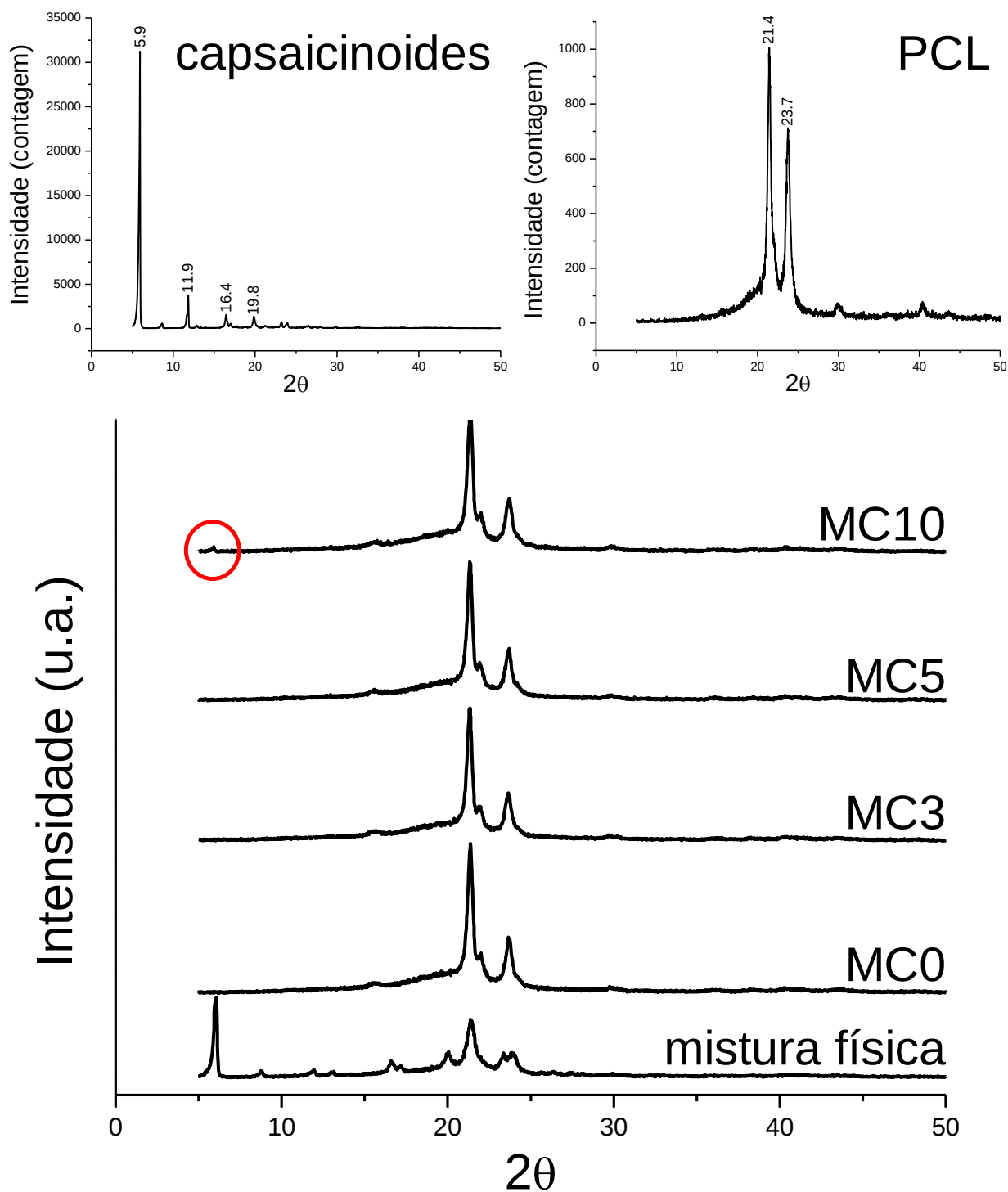


5.4.2 Difração de raios X (XRD)

A Figura 9 compila os resultados obtidos por difração de raio-X para os capsaicinoides, para a PCL, para a mistura física e para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10. O fármaco puro apresentou picos de difração cristalina de alta intensidade correspondendo a valores de $2\theta = 5,9^\circ$ (24.000), $11,9^\circ$ (4.500), $16,4^\circ$ (1.240) e $19,8^\circ$ (1.870), os quais confirmam a natureza cristalina dos capsaicinoides. Para a PCL, dois picos de difração intensos em ângulos Bragg $2\theta = 21,4^\circ$ e $23,8^\circ$ foram observados, os quais foram atribuídos a difração dos planos cristalinos (1 1 0) e (2 0 0) da estrutura semi-cristalina da PCL, respectivamente (PAN *et al.*, 2012). A mistura física demonstrou um perfil de difração resultante da sobreposição dos picos de difração cristalina dos capsaicinoides e da PCL. As micropartículas contendo os capsaicinoides (MC3, MC5 e MC10) revelaram perfis por XRD similares à PCL pura e às micropartículas elaboradas como controle negativo (MC0), sendo que apenas a formulação MC10 apresentou um pico de difração de baixa intensidade em $2\theta = 5,9^\circ$, referente à natureza cristalina dos capsaicinoides.

Os resultados de DRX demonstram que o procedimento de microencapsulação acarretou uma redução expressiva da intensidade dos picos de difração cristalina dos capsaicinoides, conduzindo à amorfização do fármaco. A obtenção de micropartículas contendo capsaicinoides na forma de sólidos amorfos, em comparação com as formas cristalinas observadas no material de partida, pode favorecer o processo de dissolução, especialmente porque os capsaicinoides têm baixa solubilidade em meio aquoso.

Figura 9 – Difratomogramas dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10



5.4.3 Tamanho de partícula e dispersão granulométrica

A Tabela 8 e a Figura 10 resumam as informações referentes ao diâmetro médio e à distribuição de tamanho para as micropartículas de PCL. As formulações revelaram diâmetros médios variando entre 62,54 μm (MC3) e 75,15 μm (MC5). Esses resultados indicaram tamanhos de partícula superiores aos observados por MEV, o que pode ser justificado pela leitura de agregados de micropartículas, quando da avaliação por espectrometria de difração a laser.

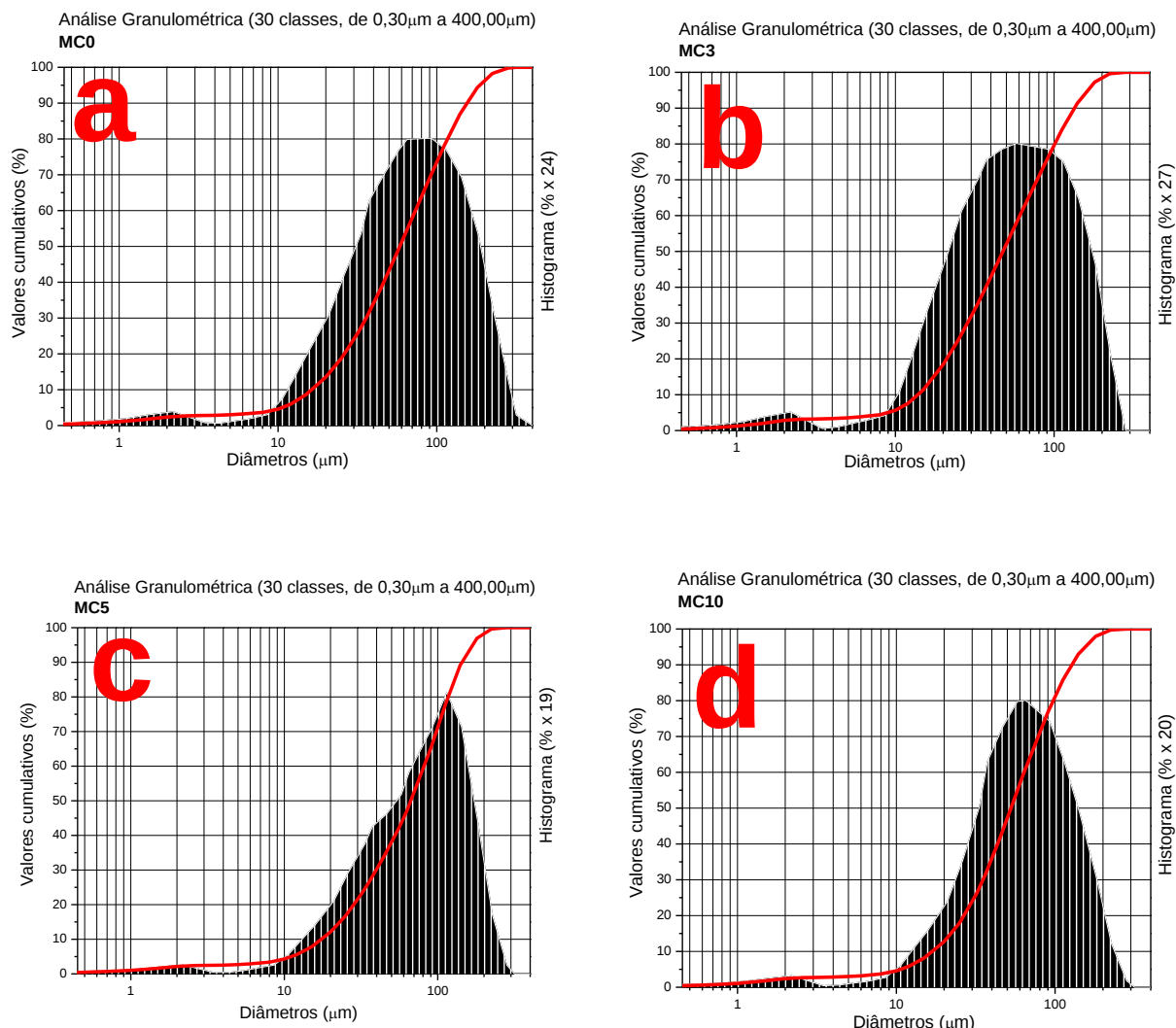
Tabela 8 – Diâmetro médio e *span* (dispersão granulométrica) para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10, indicando o teor de capsaicinoides incorporado em cada formulação.

Formulação	Capsaicinoides (mg.g^{-1})	Diâmetro médio (μm)	<i>Span</i>
MC0	—	73,97	2,38
MC3	$27,77 \pm 1,08$	62,54	2,53
MC5	$47,65 \pm 2,11$	75,15	1,90
MC10	$95,23 \pm 1,52$	64,11	2,10

Esses valores, embora não permitam uma absorção pelos enterócitos, são adequados para a administração por via oral, podendo proporcionar um efeito sustentado do fármaco, devido ao seu tempo prolongado de trânsito intestinal (DESAI *et al.*, 1996).

Mesmo ocorrendo a leitura de agregados de partículas, foi possível observar que a formulação MC5 revelou um valor de *span* inferior a 2, o que representa uma distribuição monomodal e a proximidade dos dados em torno da média. As demais formulações apresentaram valores de *span* acima de 2, provavelmente pelo fato da leitura concomitante de materiais agregados e de micropartículas isoladas, que formam duas populações com tamanhos relativamente diferentes.

Figura 10 – Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10



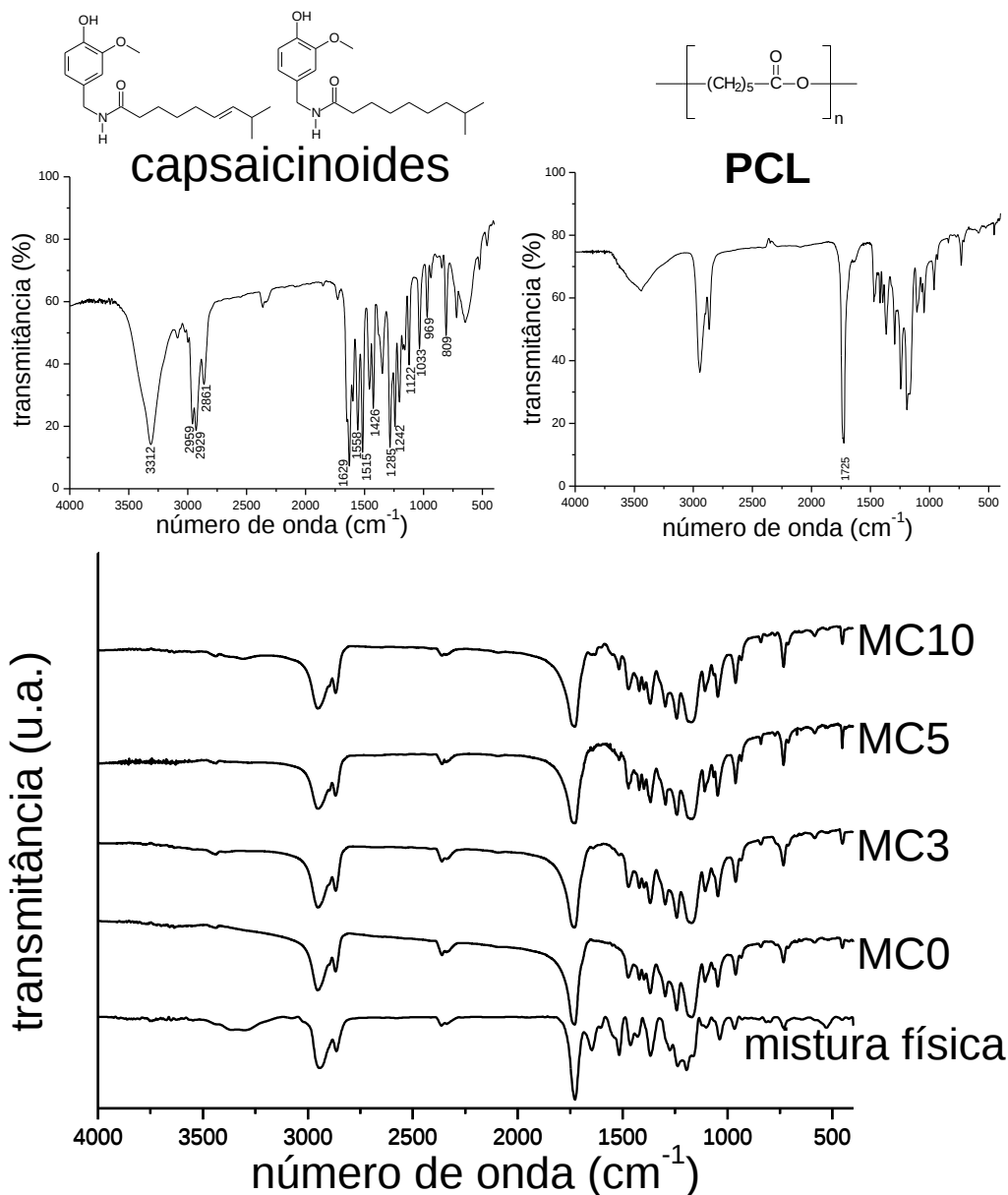
5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10 estão apresentados na Figura 11. O espectro de FTIR do fármaco demonstrou os assinalamentos típicos de ambos os capsaicinoides, capsaicina e dihidrocapsaicina, incluindo a banda de 3312 cm^{-1} referente à vibração de deformação de estiramento dos grupamentos OH e NH. Também foram observadas as bandas características de deformações de estiramento dos grupos CH_x em 2959 , 2929 e 2861 cm^{-1} , da ligação C–O em 1630 cm^{-1} e da ligação C–N em 1600 cm^{-1} . Foi verificada a presença de uma banda em 1558 cm^{-1} atribuída à deformação angular do grupo amida e em 1515 cm^{-1} , relativa

ao grupo fenila. Outras bandas típicas foram assinaladas em 1460, 1426, 1350, 1285, 1242, 1204, 1159, 1123 e 1034 cm^{-1} , incluindo diferentes vibrações de deformação angular dos grupos C–H e O–H e de deformação de estiramento dos grupos C–O, C–N e C–C. Uma banda intensa em 969 cm^{-1} , característica da deformação angular da ligação *trans* H–C=C presente apenas na capsaicina, foi também marcada. Em 809 cm^{-1} foi observada uma banda relativa à deformação angular dos grupos N–H. O espectro infravermelho da PCL exibiu uma banda forte em 1725 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo C=O. Duas bandas típicas em 2944 e 2865 cm^{-1} foram assinaladas, devido às vibrações simétricas e assimétricas do grupamento CH_2 , respectivamente. O espectro da mistura física, como esperado, revelou a sobreposição das bandas características para o fármaco e para o polímero puro.

Os espectros de FTIR para as micropartículas MC3, MC5 e MC10 também apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para a mistura física. Portanto, é possível sugerir que nenhuma ligação química entre o fármaco e o polímero foi formada durante o processo de microencapsulação.

Figura 11 – Espectros obtidos por FTIR dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10



5.4.5 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas obtidas por TGA para os capsaicinoides, para a PCL, para a mistura física e para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10 estão representadas nas Figuras 12 e 13.

Os capsaicinoides (Figura 12) apresentaram apenas um evento de perda de massa na região compreendida entre 197 e 450°C ($\Delta m = 99,2\%$). A PCL (Figura 13)

também demonstrou um único evento de decomposição térmica, na faixa de temperatura de 348 a 458°C ($\Delta m = 96,0\%$). A curva de TGA da mistura física (Figura 13), por sua vez, indicou a presença de dois eventos de perda de massa, resultantes da sobreposição dos perfis de degradação térmica do fármaco e do polímero puro. As micropartículas (Figura 13) apresentaram eventos de perda de massa iniciando em 345, 206, 205 e 204°C para MC0, MC3, MC5 e MC10, respectivamente. Esses resultados demonstram que as micropartículas de PCL contendo capsaicinoides iniciaram a decomposição térmica em temperatura inferior à observada para o polímero puro e para as micropartículas MC0, o que pode ser justificado pela presença dos capsaicinoides nas formulações que têm redução da estabilidade térmica a partir de 197°C. Além disso, as micropartículas MC3, MC5 e MC10 apresentaram perfil de degradação térmica condizente com o verificado para a mistura física, o que pode ser particularmente notado para a formulação MC10. É importante ressaltar que, embora a presença do fármaco tenha ocasionado uma redução na estabilidade térmica das micropartículas, isso não compromete seu uso potencial em meios biológicos (37°C), como um sistema de liberação modificada de fármacos.

Figura 12 – Curva de TGA dos capsaicinoides

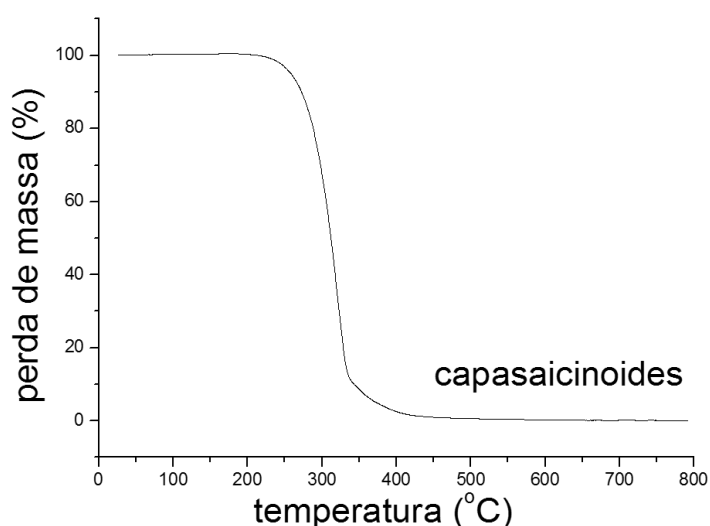
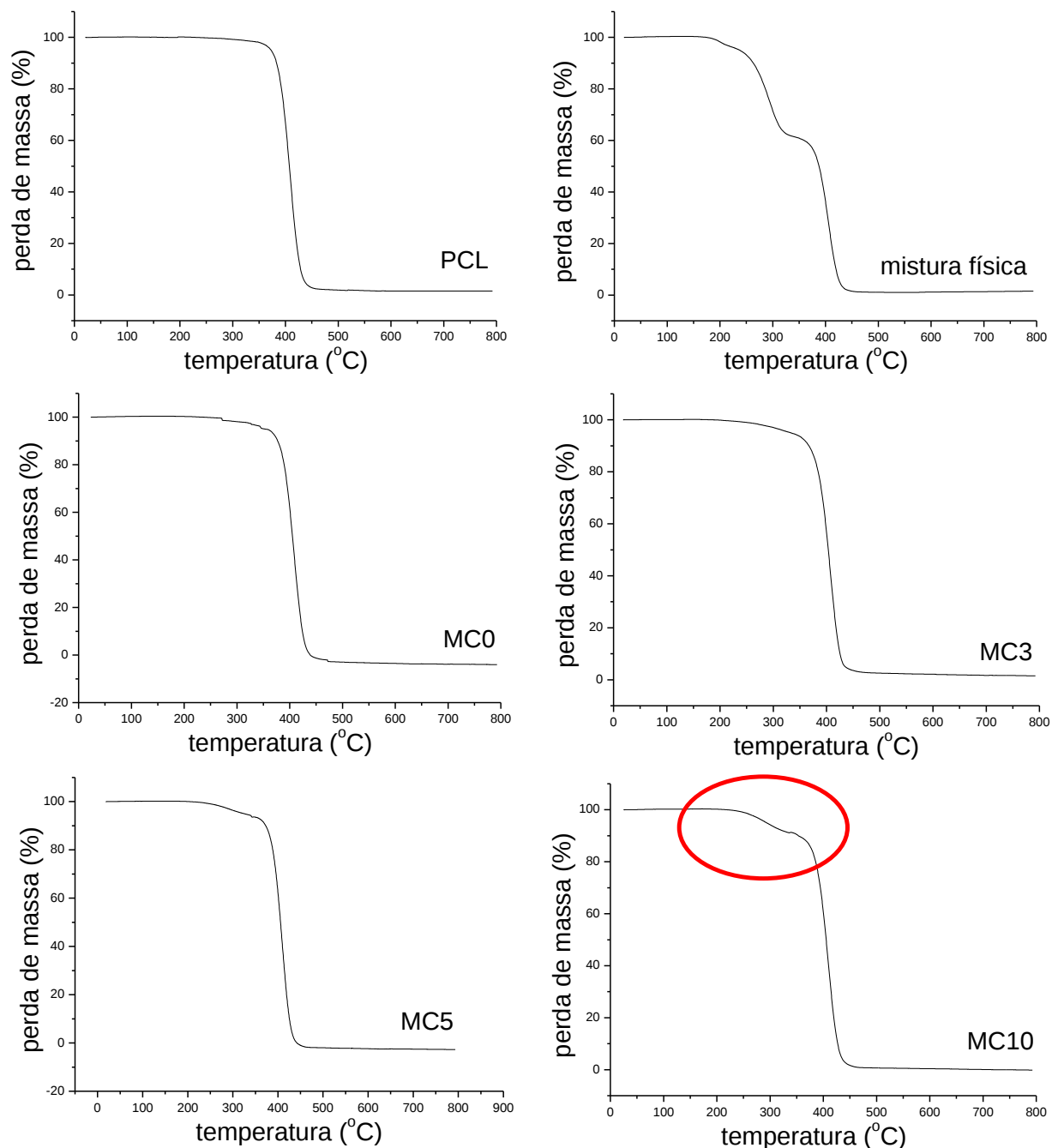


Figura 13 – Curva de TGA da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10



5.4.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas dos capsaicinoides, da PCL, da mistura física e das micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10, obtidos por DSC, estão mostrados nas Figuras 14 e 15. Os capsaicinoides (Figura 14) apresentaram um único evento térmico de fusão em 67,2°C, resultado condizente com o especificado na literatura

para este fármaco (ŠKERGET; KNEZ, 1997). A PCL (Figura 15) demonstrou valores de $-60,9$ e de $61,0^{\circ}\text{C}$, como temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão, respectivamente. Como esperado, o termograma obtido para a mistura física (Figura 15) indicou a presença dos eventos de fusão típicos do polímero e do fármaco. Entretanto, as micropartículas (Figura 15) apresentaram apenas um evento endotérmico de fusão em $61,9$, $61,4$, $60,4$ e $59,2^{\circ}\text{C}$ para MC0, MC3, MC5 e MC10, respectivamente. Portanto, para as micropartículas contendo os capsaicinoides, foi observado o desaparecimento do evento térmico de fusão característico do fármaco. Esse comportamento térmico sugere que ocorreu uma amorfização dos capsaicinoides, quando do processo de microencapsulação. Esses dados estão de acordo com os verificados anteriormente por DRX, em que os picos de difração cristalina atribuídos ao fármaco foram reduzidos nas formulações de micropartículas.

Figura 14 – Termograma obtido por DSC para os capsaicinoides

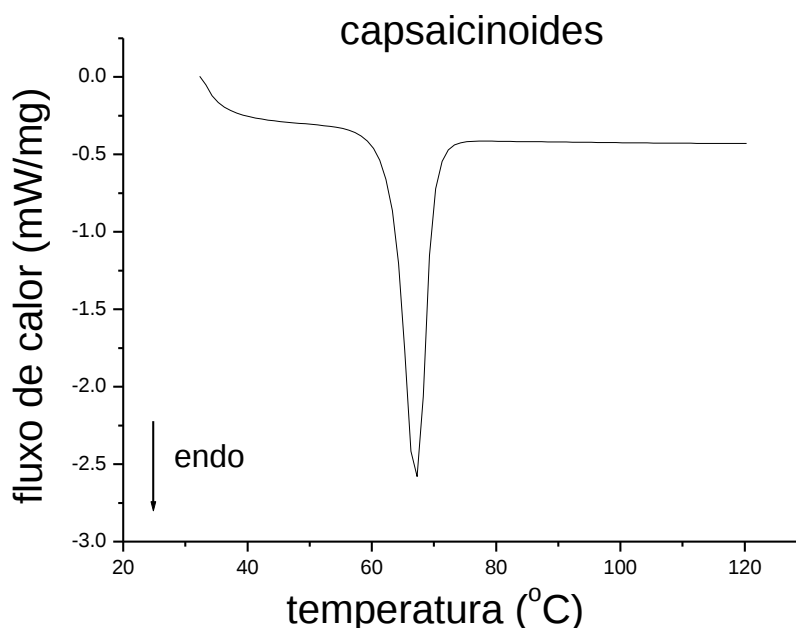
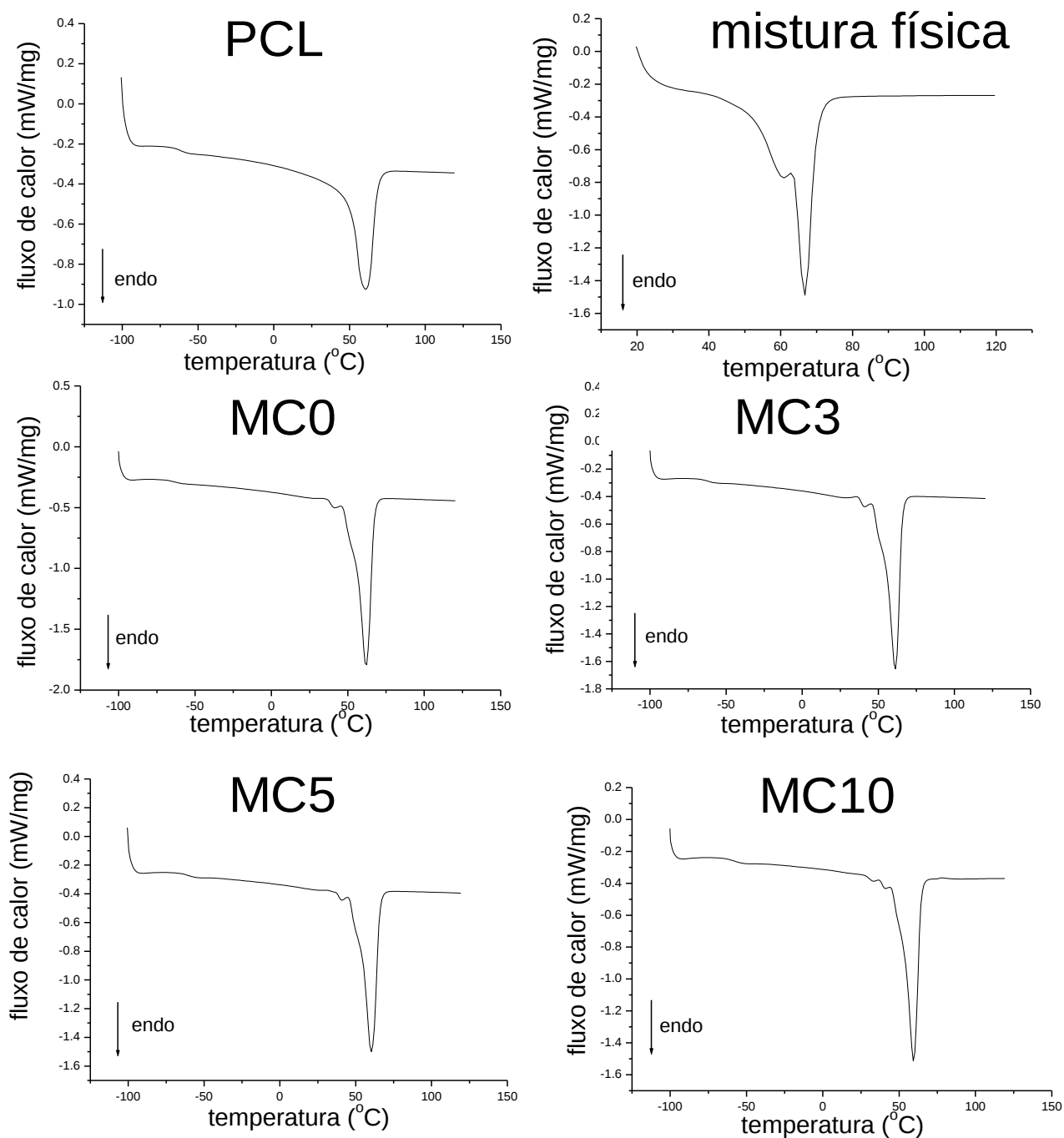


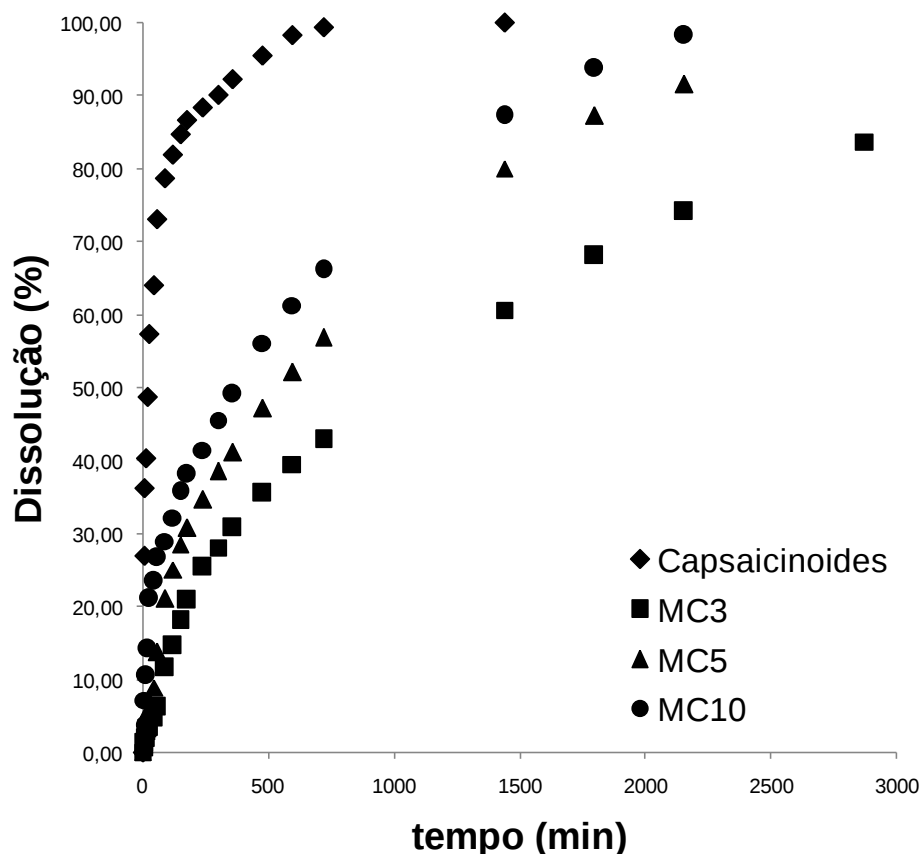
Figura 15 – Termogramas obtidos por DSC para a PCL, para a mistura física e para as micropartículas MC0, MC3, MC5 e MC10



5.5 Estudo de liberação *in vitro*

Os perfis de dissolução obtidos para os capsaicinoides e para as micropartículas MC3, MC5 e MC10 estão ilustrados na Figura 16. O fármaco puro demonstrou uma liberação de 80% em 105 min. Entretanto as formulações de micropartículas apresentaram liberação de 80% dos capsaicinoides nos tempos médios de 2.550, 1.440 e 1.125 min, para MC3, MC5 e MC10, respectivamente. Dessa forma esses resultados demonstram que os sistemas poliméricos foram efetivos em reduzir a taxa de dissolução dos capsaicinoides. A formulação contendo 3% de fármaco (MC3) promoveu uma liberação mais lenta dos capsaicinoides. Provavelmente, a maior quantidade de PCL nessas formulações proporcionou um melhor efeito no controle da dissolução do fármaco. Esses resultados permitem afirmar que as micropartículas de PCL, elaboradas neste trabalho, são estratégias interessantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada contendo capsaicinoides.

Figura 16 – Perfil de liberação *in vitro* do fármaco puro e das micropartículas MC3, MC5 e MC10



5.5.1 Avaliação dos perfis de liberação

Considerando a equação 6, a eficiência de dissolução do fármaco puro avaliada no tempo final de 2.880 min, foi de 97,04%. As formulações de micropartículas contendo capsaicinoides apresentaram valores de eficiência de dissolução de 56,59% (MC3), 71,96% (MC5) e 79,00% (MC10). A literatura (FORTUNATO *et al.*, 2007) relata que valores elevados de eficiência de dissolução são verificados para formas farmacêuticas de liberação imediata. Dessa forma, as formulações, por terem reduzido o valor da eficiência de dissolução dos capsaicinoides, podem ser considerados como formas farmacêuticas de liberação modificada, do tipo prolongada.

Os modelos matemáticos, representados pelas Equações de 7 a 10 foram aplicados aos perfis de liberação do fármaco puro e das micropartículas MC3, MC5 e MC10, empregando o software Micromath Scientist[®]. A seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (r) e para o critério de seleção do modelo (MSC). Ainda assim, foi analisada a coerência dos valores encontrados para as constantes cinéticas de liberação e o ajuste gráfico verificado para cada equação.

Os perfis de liberação dos capsaicinoides e das micropartículas MC3, MC5 e MC10, revelaram um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo biexponencial (Tabela 9), em relação aos outros modelos matemáticos avaliados. Dessa forma, é possível estabelecer que o comportamento de liberação do fármaco a partir das micropartículas tem sua descrição orientada por duas constantes de liberação, a α ou constante cinética da etapa rápida de liberação e a β , constante cinética verificada na etapa lenta de liberação.

Tabela 9 – Resultados da modelagem matemática pela equação biexponencial para o fármaco puro e para as micropartículas MC3, MC5 e MC10.

Material	Modelo biexponencial			
	MSC	R	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)
Capsaicinoides	2,06	0,9961	0,06026	0,004914
MC3	6,43	0,9994	0,00708	0,000533
MC5	5,67	0,9988	0,01446	0,000961
MC10	5,70	0,9990	0,04662	0,001235

Esses resultados demonstraram que as formulações prolongaram a liberação do fármaco, no entanto, sem alterar o modelo de liberação. A primeira etapa da liberação foi inicialmente rápida (efeito *burst*), enquanto que a segunda etapa foi lenta (liberação controlada). Essa liberação inicial pode ajudar a atingir rapidamente uma concentração adequada de capsaicinoides no plasma, enquanto a liberação controlada pode manter uma concentração efetiva do fármaco no plasma por um período mais longo (PENG *et al.*, 2010).

Aplicando o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 11), para os 60% iniciais de porcentagem de dissolução, as micropartículas demonstraram valores de n de 0,58 (MC3), 0,56 (MC5) e 0,42 (MC10).

O valor de n inferior a 0,43, observado para a formulação MC10, está relacionado à difusão do fármaco a partir da estrutura das micropartículas poliméricas, conhecido como mecanismo de transporte fickiano (SIEPMANN; PEPPAS, 2001). As formulações MC3 e MC5 mostraram valores de n entre 0,43 e 0,85, indicando que o mecanismo de liberação do fármaco ocorre por um transporte anômalo (SIEPMANN; PEPPAS, 2001), no qual existe a sobreposição dos eventos de difusão fickiana do bioativo e da entrada do fronte de solvente na estrutura dos produtos microparticulados.

5.6 Ensaios biológicos *in vivo*

Considerando que as micropartículas MC5 demonstraram o menor teor de água (0,78%), a maior eficiência de encapsulação (95,3%), uma baixa dispersão granulométrica ($span = 1,90$) e uma liberação de 80% dos capsaicinoides em 24 h, a partir do estudo de dissolução *in vitro*, essa formulação foi selecionada para dar prosseguimento ao estudo, uma vez que apresentou a maior viabilidade para o uso *in vivo*. Essa formulação foi investigada frente a três modelos farmacológicos *in vivo*, a saber: tolerância gástrica, potencial antiulcerogênico e efeito na obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico.

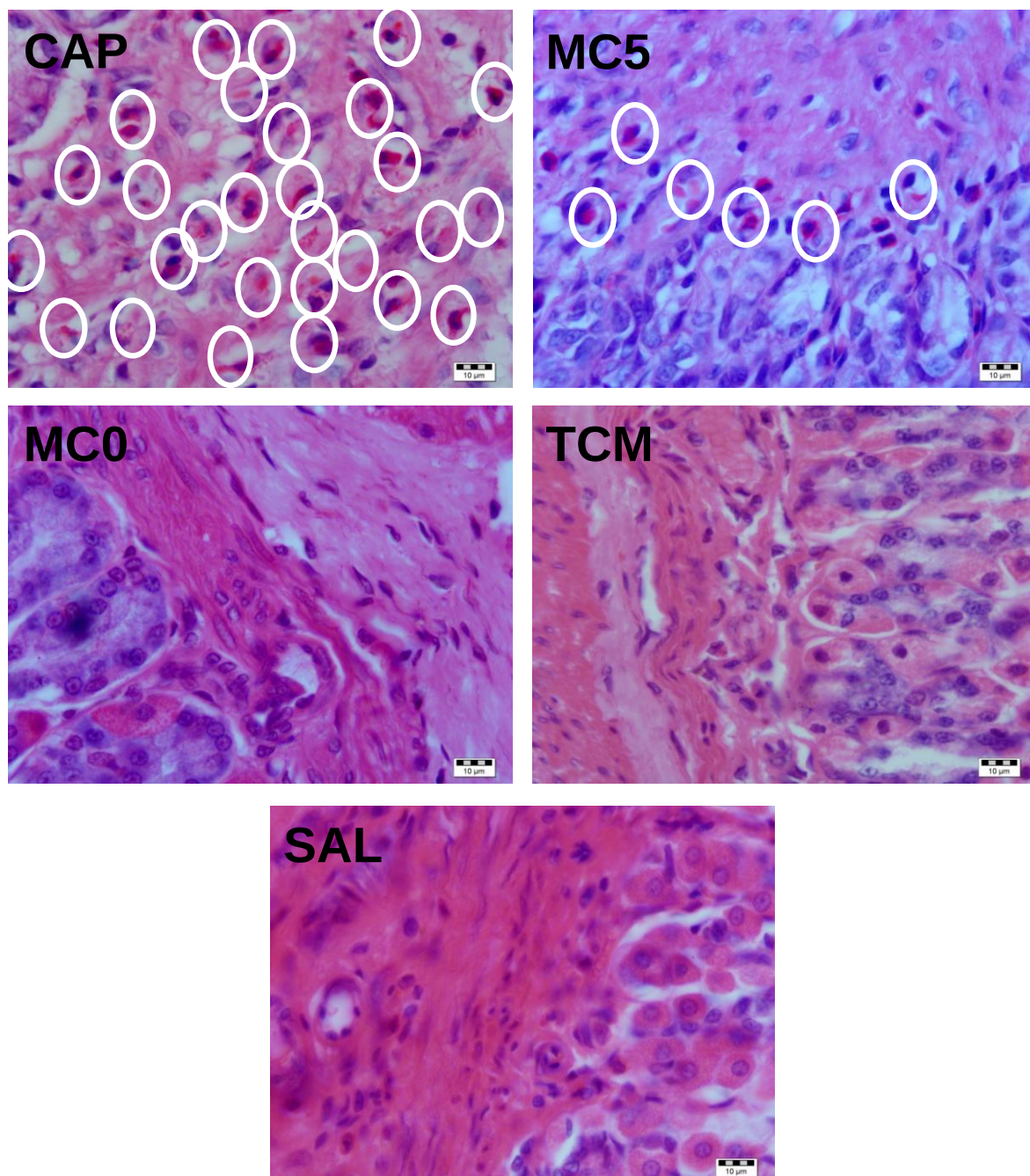
5.6.1 Tolerância gástrica

O teste de tolerância gástrica foi realizado com o propósito de avaliar o efeito de uma quantidade elevada de capsaicinoides (30 mg/kg), na forma livre ou em micropartículas, sobre a mucosa gástrica, a partir de alterações histológicas nos

estômagos de ratos. A dose de 30 mg/kg foi selecionada a partir do estudo prévio de Suresh e Srinivasan (2010), que investigaram a distribuição tissular e a eliminação da capsaicina em ratos, decorrentes da ingestão oral. Esses autores relatam que esse valor corresponde a uma quantidade 5 vezes maior do que a ingerida diariamente por povos asiáticos com tradição no consumo elevado de pimentas.

A Figura 17 apresenta as estruturas histológicas dos estômagos dos ratos submetidos ao teste de tolerância gástrica, após o tratamento por 15 dias consecutivos. O grupo CAP, que recebeu capsaicinoides, apresentou alterações histológicas na camada submucosa do estômago, com a infiltração de leucócitos polimorfonucleares indicativos de lesão inflamatória. Entretanto, a formulação de micropartículas MC5, contendo a mesma quantidade de capsaicinoides que o grupo CAP, apresentou apenas um infiltrado leucocitário discreto. Esses resultados demonstram que a encapsulação dos capsaicinoides em micropartículas de PCL foi capaz de aumentar a tolerância gástrica da capsaicina e da di-hidrocapsaicina, prevenindo a formação de processo inflamatório no estômago dos animais em estudo. Nenhuma alteração histológica foi verificada nos estômagos dos ratos tratados com a formulação de micropartículas de PCL sem fármaco (MC0), com o veículo (TCM) e com salina (SAL).

Figura 17 – Análise histológica dos estômagos de ratos, após o tratamento com os grupos experimentais no modelo de tolerância gástrica. As imagens são representativas de secções transversais dos estômagos de ratos, corados com hematoxilina-eosina (aumento: 1000X, escala: 10 μ m).



5.6.2 Atividade antiulcerogênica

Em contraposição à sensação de irritação que os capsaicinoides causam quando em contato com tecidos de mamíferos, essas vanililamidas apresentam um uso clínico como fármacos antiulcerogênicos. Essa atividade pode ser explicada pelo fato de que os capsaicinoides ocasionam vasodilatação da mucosa gástrica, promovem a liberação de óxido nítrico e ativam os receptores TRPV1 das fibras nervosas sensoriais, abundantes no estômago, o que promove a dessensibilização e a perda da habilidade dos neurônios sensoriais em liberar mediadores envolvidos no processo inflamatório (HAYMAN; KAM, 2008). Nesse sentido, podem atuar como ativos gastroprotetores contra o etanol e a indometacina, como previamente descrito (MÓZSIK; SZOLCSÁNYI; RÁCZ, 2005; PARK *et al.*, 2000).

Dessa forma, com o propósito de investigar o potencial antiulcerogênico das micropartículas de PCL contendo capsaicinoides, frente ao fármaco puro e aos respectivos controles, foi conduzido o estudo *in vivo* de inflamação gástrica induzida por etanol.

A Figura 18 apresenta o aspecto morfológico dos estômagos dos ratos após o tratamento com os grupos experimentais. Foi possível observar que as micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides (grupo MC5) reduziram principalmente o número de lesões ulcerativas, de lesões hemorrágicas e de petéquias causadas pelo etanol, em relação aos grupos CAP (fármaco puro), MC0 (micropartículas de PCL sem fármaco), TCM (veículo) e H₂O (controle negativo). Entretanto, esse efeito gastroprotetor foi nitidamente menor do que o verificado para os grupos utilizados como controle positivo, RAN (ranitidina) e OME (omeprazol).

Para complementar essa análise qualitativa, foi calculado o índice de lesões ulcerativas (ILU) e a porcentagem de inibição da ulceração, conforme demonstrado na Figura 19 e na Tabela 10. O grupo MC5 indicou um ILU de 16,3 pontos e uma porcentagem de inibição de ulcerações de 63,43%, enquanto que os capsaicinoides exibiram valores de 20,7 pontos e de 53,73%, respectivamente.

Figura 18 – Aspecto morfológico dos estômagos dos ratos após o tratamento com os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol

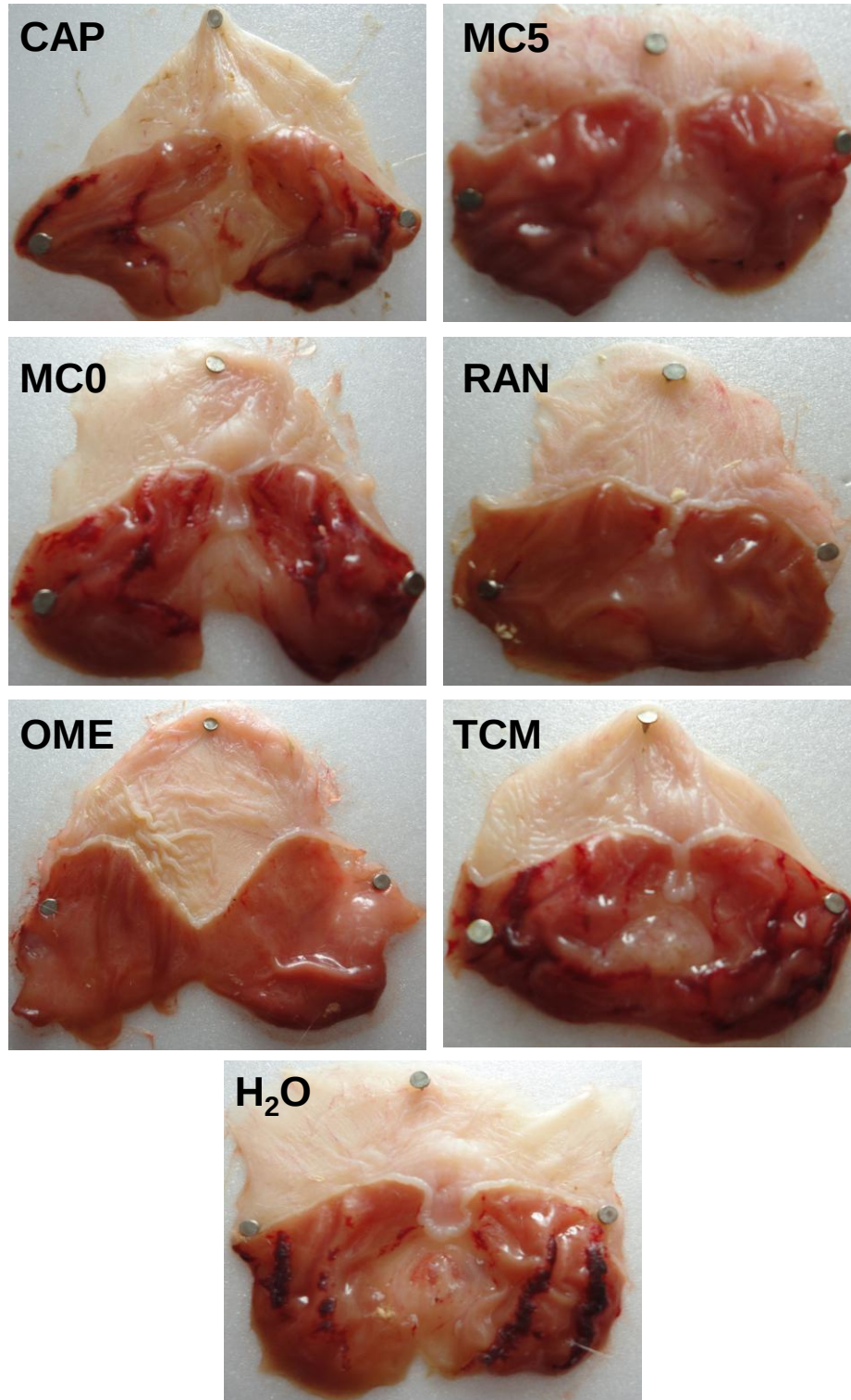


Figura 19 – Valores de índice de lesões ulcerativas obtidos para os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol

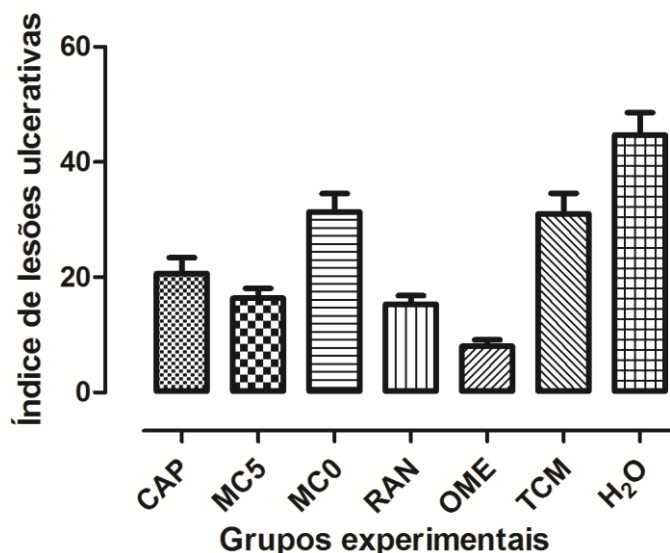


Tabela 10 – Valores de índice de lesões ulcerativas (ILU) e de porcentagem de inibição da ulceração verificados para os grupos experimentais no modelo de inflamação gástrica induzida por etanol.

Grupo experimental	ILU (média±EPM)	Inibição da ulceração (%)
CAP	20,7±2,7 ^e	53,73
MC5	16,3±1,8 ^{a,d,e}	63,43
MC0	31,3±3,2 ^{b,c}	29,85
RAN	15,3±1,4 ^{d,e}	65,67
OME	8,0±1,2 ^{d,e}	81,34
TCM	31,0±3,6	30,60
H ₂ O	44,7±3,9	—

^a p < 0,05 versus MC0, ^b p < 0,05 versus RAN, ^c p < 0,05 versus OME, ^d p < 0,05 versus TCM e ^e p < 0,05 versus H₂O

A formulação MC5 apresentou um ILU estatisticamente menor ($p < 0,05$) do que os grupos MC0 (ILU = 31,3 pontos), TCM (veículo, ILU = 31,0 pontos) e H₂O (controle negativo, ILU = 44,7 pontos), como esperado. Além disso, o resultado obtido para as micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) ao observado para os grupos RAN (ILU = 15,3 pontos) e OME (ILU = 8,0 pontos), o que demonstra o elevado potencial da formulação como estratégia terapêutica para obter um efeito gastroprotetor. Entretanto, os resultados do grupo MC5 não foram estatisticamente diferentes ao

verificado para o fármaco puro (grupo CAP, ILU = 20,7). Com isso, a vantagem do uso das micropartículas em estudo está no fato de que a formulação apresenta uma liberação prolongada dos capsaicinoides, o que, possivelmente, acarretaria uma menor pungência sobre a mucosa gástrica e uma melhor aceitação por parte dos pacientes.

5.6.3 Efeito das micropartículas poliméricas de PCL contendo capsaicinoides no tratamento da obesidade

Para verificar se o processo de microencapsulação tem influência na capacidade dos capsaicinoides de reduzir a obesidade, a formulação MC5 (micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides) foi avaliada no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica utilizando L-glutamato monossódico (MSG), frente aos grupos controle.

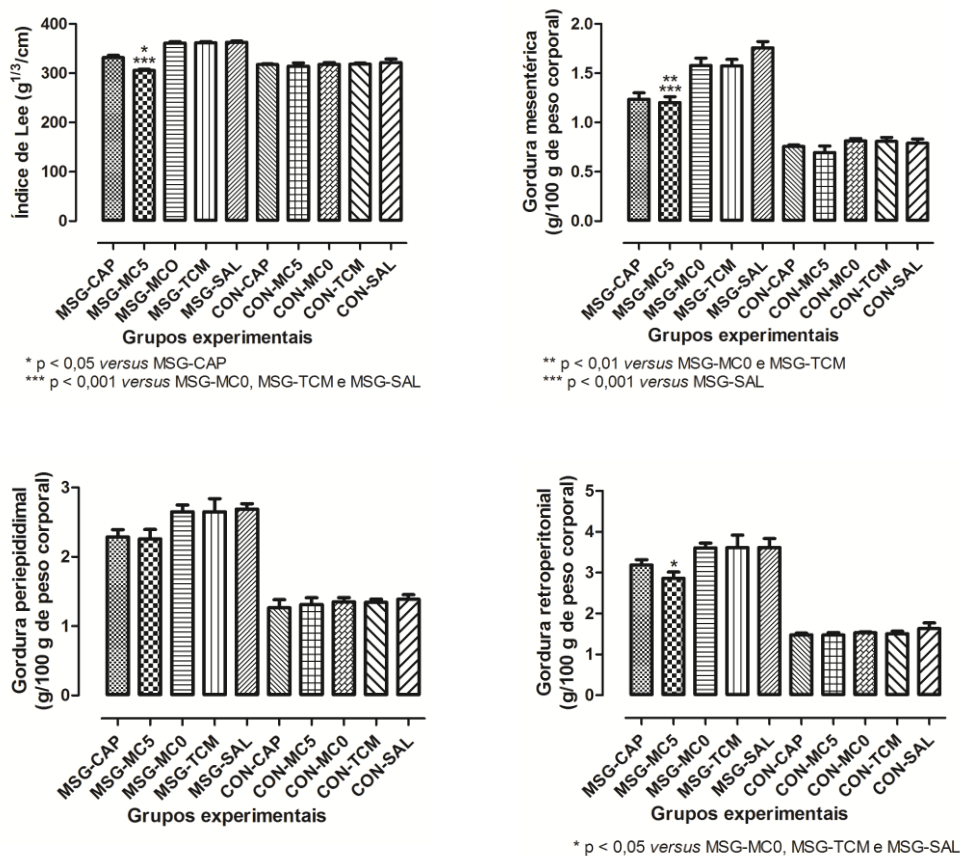
A Figura 20 compila os resultados do índice de Lee, da gordura mesentérica, da gordura periepídidimal e da gordura retroperitoneal obtidos para os grupos experimentais de ratos obesos (MSG) e de ratos controle (CON), após a administração de 30 dias dos respectivos tratamentos: capsaicinoides (CAP), formulação MC5, formulação MC0, veículo (TCM) e controle negativo (SAL).

Em geral, valores mais elevados de índice de Lee e de depósitos de gordura foram observados para os ratos obesos (MSG) em relação aos ratos controle (CON), de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), demonstrando que a indução da obesidade pelo MSG foi efetiva.

Os ratos do grupo MSG-MC5 apresentaram um valor de índice de Lee de $305,7 \pm 2,1 \text{ g}^{1/3}/\text{cm}$, estatisticamente menor que o grupo MSG-CAP (índice de Lee = $331,8 \pm 4,1 \text{ g}^{1/3}/\text{cm}$, com $p < 0,05$) e significativamente menor que os grupos MSG-MC0, MSG-TCM e MSG-SAL ($p < 0,001$), que demonstravam valores de $361,3 \pm 2,8$, $361,8 \pm 2,6$ e $362,6 \pm 2,8 \text{ g}^{1/3}/\text{cm}$, respectivamente. O índice de Lee é um valor consagrado na literatura para avaliar a obesidade em ratos, sendo equivalente ao IMC para humanos (NOVELLI *et al.*, 2007). Dessa forma, o tratamento com a formulação MC5 foi a estratégia mais efetiva na redução da obesidade dos ratos MSG. Como esperado, o índice de Lee do grupo MSG-CAP também apresentou diferença significativa com relação aos grupos MSG-MC0, MSG-TCM e MSG-SAL ($p < 0,01$).

Com relação à gordura mesentérica, o grupo MSG-MC5 foi o que demonstrou o menor valor absoluto entre os animais com obesidade central, $1,20 \pm 0,06$ g/100 g de massa corporal. Esse resultado foi estatisticamente inferior ao verificado para os grupos MSG-MC0 ($1,58 \pm 0,07$ g/100 g, com $p < 0,01$), MSG-TCM ($1,57 \pm 0,07$ g/100 g, com $p < 0,01$) e MSG-SAL ($1,76 \pm 0,06$ g/100 g, com $p < 0,001$). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos MSG-MC5 e MSG-CAP ($1,24 \pm 0,06$ g/100 g, com $p > 0,05$), o que indica que a formulação MC5 revela o mesmo potencial de reduzir os depósitos de gordura mesentérica que os capsaicinoides puros.

Figura 20 – Valores de índice de Lee, gordura mesentérica, gordura periepídidima e gordura retroperitoneal encontrados para os grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos controles



De acordo com a literatura (MALAVAZOS et al., 2008), o tecido adiposo visceral (mesentérico) pode contribuir com fatores pró-inflamatórios para a doença cardiovascular, uma vez que ele pode produzir e liberar uma variedade de cito-

quimiocinas e, conseqüentemente, induzir infiltração progressiva de macrófagos. Dessa forma, os resultados obtidos para as micropartículas MC5, bem como para os capsaicinoides, são interessantes do ponto de vista clínico, uma vez que revela, especialmente, o potencial da formulação em teste na diminuição do risco de doença arterial coronariana em obesos.

Os animais com obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG exibiram valores de gordura periepididimal de $2,29 \pm 0,10$, $2,26 \pm 0,14$, $2,65 \pm 0,10$, $2,65 \pm 0,19$ e $2,69 \pm 0,09$ g/100 g de peso corporal para os grupos MSG-CAP, MSG-MC5, MSG-MC0, MSG-TCM e MSG-SAL, respectivamente. Entretanto, para a gordura periepididimal, não houve diferença significativa entre os grupos MSG ($p > 0,05$).

Entre os animais obesos, o menor depósito de gordura retroperitoneal ($2,86 \pm 0,15$ g/100 g de peso corporal) foi registrado para o grupo MSG-MC5. Esse resultado foi estatisticamente inferior ao obtido para os grupos MSG-MC0 ($3,61 \pm 0,12$ g/100 g), MSG-TCM ($3,61 \pm 0,31$ g/100 g) e MSG-SAL ($3,62 \pm 0,22$ g/100 g), com $p < 0,05$. Como relatado para a gordura mesentérica, não foi verificada diferença significativa entre os grupos MSG-MC5 e MSG-CAP ($3,19 \pm 0,13$ g/100 g, com $p > 0,05$), o que sugere que a formulação MC5 tem um potencial semelhante aos capsaicinoides puros para reduzir os depósitos de gordura retroperitoneal.

Além disso, nenhuma alteração significativa no índice de Lee e nos depósitos de gordura foi identificada nos ratos controle, quando da administração dos capsaicinoides e da formulação MC5 ($p > 0,05$). Esse resultado também pode ser considerado relevante, pois os capsaicinoides não apresentaram impacto negativo, como o sobrepeso, nos animais com esses parâmetros dentro da normalidade.

Em síntese, com base nos resultados experimentais, é possível afirmar que as micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides constituem um sistema viável para controlar a liberação do fármaco e para reduzir os depósitos de gordura mesentérica e de gordura retroperitoneal de ratos obesos, em relação aos controles negativos. Essa formulação também demonstrou um desempenho superior aos capsaicinoides puros, quando da avaliação do índice de Lee.

Os resultados referentes ao perfil lipídico, obtidos para os grupos de ratos obesos (MSG) e ratos controle (CON), estão representados na Tabela 11. Com relação aos parâmetros bioquímicos de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e LDL-colesterol, não houve diferença significativa entre os grupos

MSG-CAP e MSG-MC5 ($p < 0,05$). Entretanto, esses dois grupos experimentais mostraram diferenças estatisticamente significativas, quando comparados com os demais grupos, especialmente para os valores de LDL-colesterol.

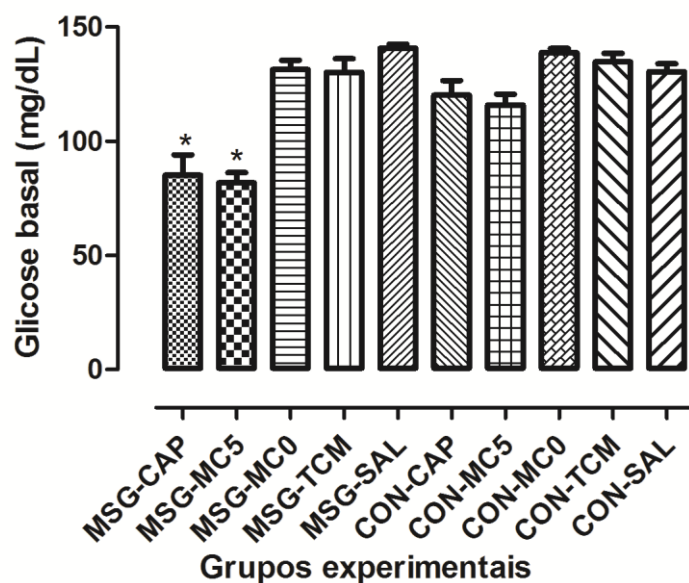
Tabela 11 – Perfil lipídico dos diferentes grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos controles.

Grupo experimental	Colesterol total (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)
MSG-CAP	82,5±1,8 ^{a,b,c}	36,0±2,1 ^e	109,7±4,4 ^{a,b}	24,2±0,6 ^{a,b,c,d,e,f,g,h}
MSG-MC5	87,3±4,1 ^{a,b}	38,0±2,3 ^{a,b,d,e,f,g}	100,7±4,8 ^{a,b}	29,1±0,7 ^{a,b,c,d,e,f,g,h}
MSG-MC0	118,7±5,4	26,3±1,4	156,0±3,2 ^{c,d,e,f,g,h}	61,1±5,7
MSG-TCM	124,0±6,7	25,7±0,9	155,0±5,9 ^{c,d,e,f,g,h}	67,3±6,7
MSG-SAL	110,5±3,8	31,8±2,2	121,5±5,3 ^e	53,1±5,9
CON-CAP	99,3±2,4	26,8±0,8	92,2±7,6	54,1±2,5
CON-MC5	100,0±5,9	25,5±1,9	86,0±8,2	57,3±2,7
CON-MC0	103,7±2,9	26,7±2,9	106,3±2,3	55,7±6,2
CON-TCM	100,3±9,3	26,3±2,4	106,7±5,8	52,7±6,6
CON-SAL	104,7±9,0	29,0±2,3	103,7±7,7	54,9±5,6

^a $p < 0,05$ versus MSG-MC0, ^b $p < 0,05$ versus MSG-TCM, ^c $p < 0,05$ versus MSG-SAL, ^d $p < 0,05$ versus CON-CAP, ^e $p < 0,05$ versus CON-MC5, ^f $p < 0,05$ versus CON-MC0, ^g $p < 0,05$ versus CON-TCM, ^h $p < 0,05$ versus CON-SAL

A Figura 21 indica os valores de glicemia de jejum verificados para os grupos experimentais de ratos obesos (MSG) e de ratos controle (CON), após a administração de 30 dias dos tratamentos propostos. Os grupos MSG-CAP e MSG-MC5 apresentaram valores de glicemia significativamente menores do que os obtidos para os demais grupos ($p < 0,05$). Dessa forma, a formulação de micropartículas MC5, para o grupo de ratos obesos, demonstrou a vantagem de assegurar a normoglicemia. Esse resultado tem um significado clínico relevante, uma vez que o DM tipo 2 é uma das complicações mais frequentes da obesidade (KITABCHI *et al.*, 2006; FERRANNINI *et al.*, 2004; BUCHANAN *et al.*, 2002; UNWIN *et al.*, 2002). Embora resposta estatisticamente semelhante tenha sido observada para o grupo MSG-CAP ($p > 0,05$), o uso do fármaco microencapsulado pode ser considerado mais promissor, por permitir a liberação modificada dos capsaicinoides e por assegurar uma maior tolerância gástrica.

Figura 21 – Valores de glicemia para os grupos experimentais no modelo de obesidade induzida por lesão hipotalâmica com MSG, e respectivos controles



* $p < 0,05$ versus MSG-MC0, MSG-TCM, MSG-SAL, CON-CAP, CON-MC5, CON-MC0, CON-TCM e CON-SAL

Portanto, os resultados do presente trabalho, quando considerados em conjunto, demonstram a viabilidade do uso das micropartículas de PCL contendo capsaicinoides como uma estratégia farmacotécnica promissora para controlar a liberação do fármaco ao longo do trato gastrointestinal, para aumentar a tolerância gástrica dos capsaicinoides, e ainda, com efeitos benéficos na prevenção de lesões ulcerativas induzidas por etanol e no tratamento da obesidade, associada ou não ao DM tipo 2, quando comparadas ao fármaco puro.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que:

1. As micropartículas de PCL contendo capsaicinoides foram obtidas com sucesso;
2. Os capsaicinoides foram microencapsulados com valores elevados de eficiência de encapsulação;
3. As micropartículas de PCL apresentaram morfologia adequada para permitir a liberação prolongada ao longo do trato gastrointestinal;
4. O procedimento de microencapsulação não conduziu a formação de ligações químicas entre os capsaicinoides e o polímero;
5. A microencapsulação promoveu a amorfização do fármaco;
6. As micropartículas apresentaram estabilidade térmica como carreadores de liberação controlada dos capsaicinoides por via oral;
7. As micropartículas preparadas a partir da PCL prolongaram a taxa de dissolução dos capsaicinoides, sem alterar o modelo cinético biexponencial de liberação;
8. A formulação de micropartículas de PCL contendo 5% de capsaicinoides (MC5) demonstrou uma melhor tolerância gástrica, quando comparada ao fármaco puro;
9. As micropartículas MC5 tiveram efeito comparável à ranitidina e ao omeprazol na prevenção de lesões ulcerativas induzidas por etanol;
10. As micropartículas de PCL contendo capsaicinoides apresentaram resultados promissores no tratamento da obesidade.

Dessa forma, é possível sugerir que as micropartículas poliméricas elaboradas com a PCL demonstraram as condições adequadas para o controle da liberação dos capsaicinoides, sendo uma alternativa viável para o tratamento da obesidade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; MADNI, A.; USMAN, M.; MUNIR, A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology** v. 75, p. 384-387, 2011.
- AHRÉN, J.; AHRÉN, B.; PACINI, G.; WIERUP, N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet. A dynamic study over 12 months. **Islets**. v. 2, n. 6, p. 353–356, 2010.
- AL HAUSHEY, L.; BOLZINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANCON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 16-25, 2007.
- ASTRUP, A.; FINER, N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or obesity-dependent diabetes mellitus. **Journal of Obesity**. 1: 57–59, 2000.
- BALISTRERI, C.R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **J. Med. Sci.** 12(3): 70–77, 2012.
- BARCELÓ, A.; PELÁEZ, M.; RODRIGUEZ-WONG, L.; PASTOR-VALERO, M. The Prevalence of Diagnosed Among the Elderly of Seven Cities in Latin America and Caribbean: The Health Wellbeing and Aging (SABE) Project. **J Aging Health Journal**: 18:224-39, 2006.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**: 40:527–8. 1968.
- BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. **Microparticle drug delivery systems**. In: BROWN, D.M. (ed.) Drug delivery systems in cancer therapy. Totowa: Humana Press, p. 117-135, 2003.
- BOSQUILLON, C.; ROUXHET, P. G.; AHIMOU, F.; SIMON, D.; CULOT, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. **Journal of Controlled Release** v. 99, p. 357-367, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução - RDC nº. 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em abr. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Quase metade da população brasileira está acima do peso**. Disponível: <<http://www.portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4718/162/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>> Acesso em dez. 2012.
- BRUCE, K.D.; BYRNE, C.D. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. **Postgrad Med J**. v. 85, n. 1009, p. 614–21, 2009.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; PETERS, R. K.; KJOS, S. L.; MARROQUIN, A.; GOICO, J.; OCHOA, C.; TAN, S.; BERKOWITZ, K.; HODIS, H. N.; AZEN, S. P. Preservation of Pancreatic B Cell Function and Prevention of Type 2 Diabetes by Pharmacological Treatment of Insulin Resistance in High-Risk Hispanic Women. **Diabetes** 51: 2796-2803, 2002.

CARDOSO, J.; MARTINS, J.; BENITES, J.; CONTI, T.; SOHN, V.. Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade. Instituto de Nutrição Josué de Castro. **Dietoterapia e patologia nutricional**. Rio de Janeiro, 2010.

CHAKRAPANI, A. **Processing and characterization of polymer microparticles for controlled drug delivery systems**. 92 p. Doutorado em Filosofia, The Ohio State University, Columbus, 2006.

CHANG-CHEN, K.J.; MULLUR, R.; BERNAL-MIZRACHI, M. β cell failure as a complication of diabetes, **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v. 9, p. 329–343, 2008.

CHOI, A.J.; KIM, C.J.; CHO, Y.J.; HWANG, J.K.; KIM, C.T. Characterization of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Stabilized with Alginate and Chitosan by Self-assembly. **Food Bioprocess Technol** 4:1119–1126, 2011.

CIGOLLE, C. T.; BLAUM, C. S.; HALTER, J. B. **Diabetes and Cardiovascular Disease Prevention in Older Adults**. 25: 602-41, 2009.

CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7ª Ed. Porto Alegre: Art Med, 2004.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JÖRNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2. **Diabetes.**, 54(2) 97-107, 2005.

CONTRI, R.V.; KAISER, M.; POLETO, F.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **J. Nanosci Nanotechnol**. Mar 11 (3): 2398–406. 2011.

COSTA, L.L.G.; DAVID, V.C.; PINTO, R.M.C.; MINOZZO, B.R.; VITOLDO, A.K.J.; CAMPOS, L.A.; SILVA, R.Z.; BELTRAME, F.L. Anti-ulcer activity of Synadenium grantii látex. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 22(5): 1070-1078, Sep./Oct. 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro. cap.10. p. 406–409, 2000.

CZECH, A.; TATÓN, J.; PIATKIEWICZ, P. Cellular glucose transport disturbances in the pathogenesis and therapy of type 2 diabetes mellitus Znaczenie zaburzeń dokomórkowego transport glukozy w patogenezie i terapii cukrzycy typu . **Endokrynologia Polska/Polish Journal of Edocrinology**. vol 61, n. 3, p. 292–302, 2010.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. **Pharmaceutical Research** v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DIEPVENS, K.; WESTERTERP, K.R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**: 292(1):R77–85. 2007

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**. 345 p. Livre-docência em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

FANDOHAN, P.; GNONLONFIN, B.; LALEYE, A.; GBENOU, J.D.; DARBOUX, R.; MOUDACHIROU, M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**.n 46, p.2493–2497, 2008.

FERNSTROM, M.H.; FERNSTROM, J. D. The new role of pharmacotherapy for weight reduction in obesity. **Int J Clin Pract** .n 56, p.683–6, 2002.

FERRANNINI, E.; CAMASTRA, S.; GASTALDELLI, A.; SIRONI, A. M.; NATALI, A.; MUSCELLI, E.; MINGRONE, G.; MARI, A. Beta-Cell function in obesity. Effectsofweightloss. **Diabetes**. 53 (supp. 3): 26–33, 2004.

FERREIRA, S.; TINOCO, A.L.A.; PANATO, E.; VIANA, N.L. Aspectos etiológicos e o papel do exercício físico na prevenção e controle da obesidade. **Revista de Educação Física**. Viçosa. n. 133. p. 15–24. 2006.

FIGUEIREDO, A. C. **Fatores Sociodemográficos, Comportamentais e de Saúde Associados à Obesidade em Idosos do Distrito Federal**. 2010.

FORTUNATO, K. A.; DOILE, M. M.; SCHMÜCKER, I. C.; SCHUCKO, S. K.; SILVA, M. A. S.; RODRIGUES, P. O. Influência da complexação com β -ciclodextrina sobre a liberação do acetato de dexametasona a partir de matrizes hidrofílicas de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e polioxetileno (PEO) **Latin American Journal of Pharmacy** v. 26, p. 513-521, 2007.

FRANCISCHI, R.P.P. ; PEREIRA, L.O. ; FREITAS, C.S. ; KLOPPER, M. ; SANTOS, R.C. ; VIEIRA, P. ; LANCHÁ JÚNIOR, A.H. Obesity: Updated information about its etiology, morbidity and treatment. **Rev. Nutr**. v.13. p. 17– 28. 2000.

FRIEDEWALD, W.T. ; LEVY, R.I. ; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**. Jun :18(6): 499–502, 1972.

FROGUEL, P., VELHO, G. Maturity onset diabetes of the young. **Science Pediatrics Journal**. 6:482-5, 1994.

GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology** v.197, p. 211-217, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International** v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIL-CAMPOS, M.; CAÑETE, R.; GIL, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clinical Nutrition**. v. 23. p. 963–974. 2004.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: An overview. **STP Pharma Sciences** v. 5, p. 276-290, 1995.

GONG, Z.; MUZUMDAR, R.H. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. **International Journal of Endocrinology**. 13p., 2012.

GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. **Pharmacological Research**. v 64. p. 438–455, 2011.

GOVINDARAJAN, V.S.; and SATHYANARAYANA, M.N.;. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and Metabolism; Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences. **Crit. Rev. Food Sci. Nutrition**, 29 (6), 435-473, 1991.

GRASSIOLLI, S.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P.C. F. Muscarinic M₂ receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **European Journal of Pharmacology**. 556, p. 223–228, 2007.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. v. 53 Suppl 1, n. February, p. 110–8, 2004.

GUIMARÃES, M.M.; GRECO, D.B.; RIBEIRO, A.O.J.; PENIDO, M.G.; MACHADO, L.J.C. Corporal fat distribution and lipidic and glicemic profiles of HIV-infected patients. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.51, n.1, Feb. 2007.

HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 19, p. 338-343, 2008.

HESLINGA, M. J.; MASTRIA, E. M.; ENIOLA-ADEFESO, O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release** v. 138, p. 235-242, 2009.

HENDERSON, S. M.; RASMUSSEN, B.; LANCASTER, C.; KERKSICK, C.; SMITH, P.; MELTON, C.; COWAN, P.; GREENWOOD, M.; EARNEST, C.; THOMAS, S.; KREIDER, A. R. Effect of the *Coleus Forskohlii* Supplementation on Body Composition and Hematological Profiles in Mildly Overweight Women. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. p 54-62, 2005.

HILL, J.O.; WYATT, H.R. Role of physical activity in preventing and treating obesity. **Appl Physiol Journal**. 99:765-770, 2005.

HUANG, S.M.; BISOGNO, T.; TREVISANI, M.; AL-HAYANI, A.; PETROCELLIS, L.; KREY, J.F.; CHU, C.J.; MILLER, J.D.; DAVIES, S.N.; GEPPETTI, P.; WALKER, J.M.; MARZO, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **Neurobiology**. June 11; 99(12): 8400–8405, 2002.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. **Mol Nutr Food Rev**:50:1072–9, 2006.

HWANG, J.; PARK, I.; SHIN, J.; LEE, Y.K.; BAIK, H.W.; HA, J..Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 694-699, outubro, 2005.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE.; **Validation of analytical procedures:** Text And Methodology Q2(R1). 2005. International Conference OnHarmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE**
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf> Acesso em 17 de outubro de 2012.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials** v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JINCHENG, W.; SIHAO,C.Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Capsaicin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p. 2234–2241, 2010.

JOO, J.I; KIM, D.H.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. **J Proteome** 9(6):2977–87, 2010.

KAHN, S.E.; ZINMAN, B.; HAFFNER, S.M.; O'NEILL, M.C.; KRAVITZ, B.G.; YU, D.; FREED, M.I.; HERMAN, W.H.; HOLMAN, R.R.; JONES, N.P.; LACHIN, J.M.; VIBERTI, G.C. Study Group (2006). Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. **Diabetes**. 55(8): 2357–2364, 2006.

KANG, J.H; KIM, C.; HAN, I.; KAWADA, T., YU, R..Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. **FEBS Letters**, v. 581, p. 4389-4396, agosto, 2007.

KANG, J.H.; TSUYOSHI, G.; HAN, I.S.; KAWADA, T.; KIM, Y.M.; YU, R. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. **Obesity**:18(4):780–7. 2010

KAPLAN, M.. Gastroenterol Clin. **Pharmacological Therapies for Obesity**. n.34, p. 91–104, 2005.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. **Current Pharmaceutical Biotechnology** v. 4, p. 303-309, 2003.

KAWADA, T.; WATANABE, T.; TAKAISHI, T.; TANAKA, T.; IWAI, K. Capsaicin-induced betaadrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. **Proc Soc Exp Biol Med**:183:250–6. 1986

KEISUKE, S.; YUAN, Z.; KITA, T.; KISHIMOTO, C. Immunoglobulin Treatment Suppressed Adoptively Transferred Autoimmune Myocarditis in Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice. Articles in Press. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. August, 2004.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 27, p. 48-49, 1975.

KIM, S.; KIM, J.C.; SUL, D.; HWANG, S.W.; LEE, S.H.; KIM, Y.H.; TAE, G. Nanoparticle formulation for controlled release of capsaicin. **J. Nanosci Nanotechnol**. May 11 (5): 4586–91. 2011.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. H. Preparation and physicochemical characterization of *trans*-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**. v. 108, p. 37-42, 2011.

KISSEL, T.; MARETSCHKE, S.; PACKHAUSER, C.; SCHNIEDERS, J.; SEIDEL, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. (ed.). **Microencapsulation: Methods and industrial applications**. Boca Raton: Taylor & Francis Group v. 158, p. 99-122, 2006.

KITABICHI, A. E.; TEMPROSA, M.; KNOWLER, W.C.; KAHN, S.E.; FOWLER, S. E.; HAFFNER, S. M.; ANDRES, R.; SAUDEK, C.; EDELSTEIN, S. L.; ARAKAKI, R.; MURPHY, M. B.; SHAMOON, H. The Diabetes Prevention Program Research Group. Role of Insulin Secretion and Sensitivity in the Evolution of Type 2 Diabetes in the Diabetes Prevention Program: Effects of Lifestyle Intervention and Metformin. **Diabetes**. 54:2404-2414. 2006.

KRZYZANOWSKA, J.; CZUBACKA, A.; OLESZEK, W. Dietary Phytochemicals and human health. **Bio-Farms for Nutraceuticals**. Advances in Experimental Medicine and Biology. v. 698, p.74–98, 2010.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

LEE, H.; LIDA, T.; MIZUNO, A. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. **J Neuroscience** 25(5):1304-10, 2005.

LEE, M.O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **Am Journal Physiol.**, 89:24-31, 1928.

LEITÃO, M.P.C.; MARTINS, I.S. Prevalence and factors associated with metabolic syndrome in users of primary healthcare units in São Paulo - SP, Brazil. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.58, n.1, Jan/Feb 2012.

LEUNG, F. Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution - **Life Sciences** 83: 1–5, 2008.

LI, L-Y.; EASA, A.M.; LIONG, M-T.; TAN, T-C.; FOO, W-T. The use of microbial transglutaminase and soy protein isolate to enhance retention of capsaicin in capsaicin-enriched layered noodles. **Food Hydrocolloids**: 30, p. 495–503, 2013.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics** v. 363, p. 26-39, 2008.

LIN, J.; DELLA-FERA, M.A. ; BAYLE, C. A. Green Tea Polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. **Obesity Research**. v. 12, n. 6, p. 982–990, June 2005.

LU, B.; ZHANG, J. Q.; YANG, H. Lung-targeting microspheres of carboplatin. **International Journal of Pharmaceutics** v. 265, p. 1-11, 2003.

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 133 p. Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MALAVAZOS, A.E.; CEREDA, E.; DELNEVO, A.; PASSERI E, T.A.; SBURLATI, L.; ORSI, E.; MORRICONE, L.; AMBROSI, B. Thyroid function and body weight: should we also consider the interplay with insulin resistance and fat distribution. **Arch Intern Med**. Nov 10;168(20):2284–5, 2008.

MARIN, D. M. Resistência à Insulina e Função da Célula Beta: **Efeito da Perda de Peso após Bypass Gástrico**. p.181 Doutorado em Ciências Médicas – UNICAMP. 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 220p., 2000.

MENDES, J.B.E.; RIEKES, M.K.; OLIVEIRA, V.M.; MICHEL, M.D.; STULZER, H.S.; KHALIL, N.M.; ZAWADZKI, S.F.; MAINARDES, R.M.; FARAGO, P.V. PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. **Scientific World Journal**. 2012

MENDES, N. **Obesidade: um problema de saúde**. 2000. Disponível em: <http://www.desportosdeginasio.com/saude/ver_artigos.asp?IDsaude=24> Acesso em: out 2012.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 563-580, 1998.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. Ed. Atheneu, 4 ed. Cap. 3, p. 48, 1999.

MÓZSIK, G.; SZOLCSÁNYI, J.; RÁCZ, I. Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. **World J Gastroenterol**. Sep 7(33): 5180–4, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NAHAS, M.V. Núcleo de Pesquisa em atividade física e saúde. Universidade Federal de Santa Catarina. **6º Fórum Internacional de Esportes**. 2001.

NISWENDER, K. Diabetes and obesity: therapeutic targeting and risk reduction – a complex interplay. **Diabetes, Obesity and Metabolism** 12: 267–287, 2010.

NOVELLI, E.L.B.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.X.; RODRIGUES, H.G.; MANI, F.; FERNANDES, A.A.H.; CICOGNA, A.C; NOVELLI FILHO, J.L.V.B.; Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Laboratory Animals Ltd. **Laboratory Animals** n. 41, p. 111–119, 2007.

OBEIDAT, W. M. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation** v. 3, p. 178-192, 2009.

OGAWA, Y.; YAMAMOTO, M.; OKADA, H.; YASHIKI, T.; SHIMAMOTO, T. A new technique to efficiently entrapment leuprolide acetate into microcapsules of polyactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 1095-1103, 1988.

OLIVEIRA, A.M.A.; CERQUEIRA, E.M.M.; SOUZA, J.S.; OLIVEIRA, A.C. Sobrepeso e Obesidade Infantil: Influência de Fatores Biológicos e Ambientais em Feira de Santana – BA. **Arq.Bras.Endocrinol.Metab**. vol 47 n. 2, 2003.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

OMS **Obesity and overweight**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em janeiro de 2013

PARK, J.J.; LEE, J.; KIM, M.A. Induction of total insensitivity to capsaicin and hypersensitivity to garlic extract in human by decreased expression of TRPV1. **Neuroscience Lett.** 411(2): 87–91, 2007.

PARK, J.S.; CHOI, M.A.; KIM, B.S.; HAN, I.S.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life Sci.** v. 67, p. 3087–3093, 2000.

PADWAL, R.; LI, S.K.; LAU, D.C.; Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v.27, p.1437– 46, 2003.

PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; XIE, M.; LIU, Y.; BAI, C.; CHEN, L. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry.** v. 121, p. 23–28, 2010.

POWER, M.L; SCHULKIN, J. Sex difference in fat storage, fat metabolism, and health risks from obesity: possible evolutionary origins. **British Nutrition of Journal.** v. 99, p 931- 940, 2008.

PRASAD, B.C.N.; SHRIVASTAVA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Capsaicin: A Promising Multifaceted Drug from Capsicum spp. **Evidence-Based Integrative Medicine.** v. 2, n. 3, p. 147-166, 2005.

PRENTKI, M.; NOLAN, C.J. Review Series: Islet β cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation.** 116(7):1802–1812, 2006.

RABE, K.; LEHRKE, M.; PARHOFER, K. G.; BROED, U.C. Adipokines and insulin resistance. **Molecular Medicine.** Nov–Dec. v. 14. p. 741–751. 2008.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, p. 163–72, 2003.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M.A.; BAILE, C.A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **J Nutr Biochem.** Nov;19(11):717–26, 2008.

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

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids** v. 55, p. 333–339, 2010.

REYES-ESCOGIDO, M.L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E.G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E.; Review: Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. **Molecules**, 16, 1253–1270, 2011.

ROA, J. P. B.; MANO, V.; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E. B.; SILVA, M. E. S. R. e; SOUZA, J. D. FILHO. Síntese e caracterização do copolímero poli(3 Hidroxibutirato-co-εCaprolactona) a partir de poli(3 Hidroxibutirato) e poli(εCaprolactona). **Polímeros** v. 20, n.3, p. 221-226, 2010.

RUDIN, E.; BARZILAI, N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. **Immunity & Ageing**. 2005

SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International** v. 40, p. 1107-1121, 2007.

SCHAFFER, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Current Opinion in Lipidology**. v. 14. p. 281–287. 2003.

SHUKLA, A. J.; PRICE, J. C. Effect of drug (core) particle size on the dissolution of theophylline from microspheres made from low molecular weight cellulose acetate propionate. **Pharmaceutical Research** v. 6, n. 5, p. 418-421, 1989.

SIEPMANN, J. & PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews** v.48, n.2-3, p.139-157, 2001.

SILVA, D.J.F.; SCHERER, B.S.; ALVES, M. K.; OLIVEIRA, J.R.. Determinação do potencial antioxidante do extrato filtrado de *Capsicumbaccatum* (pimenta dedo de moça) através do método DPPH. Disponível em: www.pucrs.br/edipucrs/XSalaoIC/Ciencias_Biologicas/Biofisica acesso em: 19/08/2011.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, V. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Habulin, M. Solubility of α-Carotene and oleic acid in dense CO₂ and data correlation by a density-based model. **Fluid Phase Equilib.** 109, p. 131–138, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal** v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Studies on the in vitro absorption of spice principles - curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. **Food Chem Toxicol.** 45 : 1437 – 42, 2010.

TAVANO, L.; ALFANO, P.; MUZZALUPO, R.; CINDIO. Niosomes vs microemulsions: New carriers for topical delivery of capsaicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v 87, p. 333– 339, 2011.

TYAGI, P.; CHANCELLOR, M. B.; LI, Z.; GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N.; FRASER, M. O.; HUANG, L. Urodynamic and immunohistochemical evaluation of intravesical capsaicin delivery using thermosensitive hydrogel and liposomes. **The Journal of Urology.** v. 171, p. 483–489, January 2004.

THOMPSON, C. J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G. A.; MUNDAY, D. L. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics** n. 329, p. 53-61, 2007.

TRAN, V.; BENOÎTA, J. P.; VENIER-JULIENNEA, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy **International Journal of Pharmaceutics** v. 407, p. 1-11, 2011.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition:** 92, p. 347–355, 2004.

TSI, D.; NAH, A.K.; KISO, Y.; MORITANI, T.; ONO, H. Clinical study on the combined effect of capsaicin, green tea extract and essence of chicken on body fat content in human subjects. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo):49:437–41, 2003.

TSINOPOULOU, A.G. Insulintherapy in children and adolescents with diabetes. **Diabetes Research and Clinic Praticce** 93:114–117, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 28 ed. Rochville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2005.

UNWIN, N.; SHAW, J.; ZIMMET, P.; ALBERT, K. G. M. N. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glicemia: the current satatus on definition and intervention. **Medical Journal Diabetes.**v. 108, n. 1, p. 37–42, 2002.

VOLTERA, A. F.; CESARETTI, M. L. R.; GINOZA, M.; KOHLMANN, O. J. Efeito da Indução de Obesidade Neuroendócrina sobre a Hemodinâmica Sistêmica e a Função Ventricular Esquerda de Ratos Normotensos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2008.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/ solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems** v. 7, n. 3, p. 235–259, 1990.

WEATERTEP-PLATENGA, M.S.; SMEETS, A.; LEJEUNE, M.P.G.. Sensory and gastro intestinal satiety effects of capsaicin on food intake. **Internacional Journal of Obesity** 29: 682–688, 2007.

WEBSTER, L.R.; MALAN, T.P.; TUCHMAN, M.M.; MOLLEN, M.D.; TOBIAS, J. K.; VANHOVE, G.F. A multicenter, randomized, double-blind, controlled dose finding study of NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia. **The Journal of Pain**. v. 11, n. 10, p. 972–982, 2010.

YAMAUCHI T. T.; SAITOH, T.; SHIRAI, K.; FUJIKI, K.; TSUBOKAWA, N. Immobilization of capsaicin onto silica nanoparticle surface and stimulus properties of the capsaicin-immobilized silica. **Journal of Polymer Science**. v.48, p. 1800–1805, 2010.

YOSHIOKA, M.; LIM, K.; KIKUZATO, S.; KIYONAGA, A.; TANAKA, H. Effects of redpepper diet on the energy metabolism in men. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo):41:647–56, 1995.

ZEYDA, M.; STULNIG, T.M. Review: Adipose tissue macrophages. **Immunology Letters**. v.112 . p. 61–67, 2007.

ZI, P.; YANG, X.; KUANGA, H.; YANGA, Y.; YUB, L. Effect of HP β CD on solubility and transdermal delivery of capsaicin through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. n.358, p.151–158, 2008.

ANEXO A

PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE
ÉTICA NO USO DE ANIMAL



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 14/2012

Protocolo UEPG – 08273/2012

Título – “Avaliação de micropartículas poliméricas contendo capsicinoides em modelo de indução de obesidade utilizando glutamato monossódico”.

Interessado – Dr Paulo Vitor Farago

Data de Entrada – 11/05/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/05/2014**

Considerações

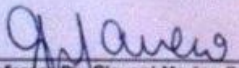
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de *Rattus norvegicus*.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.


Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264