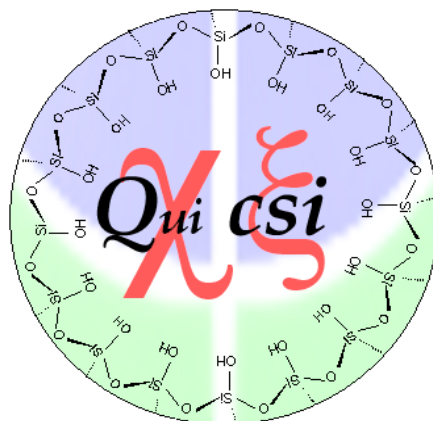


**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***Estudo das Interações das Vitaminas A e E em
Microesferas de Quitosana: Liberação
controlada em fluidos gastrointestinais e em
cremes hidratantes***



Tese apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração físico-química.

André Luiz Ferreira dos Santos

Orientador: Alexandre Gustavo Soares do Prado

(in memoriam)

Brasília-DF/2012

Dedicatória

***Tu, nunca soubeste
Que este momento fora planejado.
Quando, há tempos, minha mente
expôs, enquanto meu coração escondia.
Por várias primaveras, fui-lhe
grato.
Hoje, a alvura do papel tem apenas
um nome.***

Dedico o poema e este trabalho à

Gabriella

AGRADECIMENTOS

À minha família e amigos;

A todos que contribuíram para minha formação e aos quais sempre serei grato;

A toda galera do *Qui Csi*, em especial, aos senhores Alécio R. Nunes e Guilherme W. Tavares, por seu apoio, espírito de time e grande ajuda nesta tese;

Ao professor Gesley Alex Veloso Martins pela gentileza em presidir a sessão de defesa;

Aos professores Edésio Fernandes da Costa Alcântara, Fernando Fabriz Sodré, Leonardo Giordano Paterno, Luiz Fabrício Zara e Rafael Morgado Silva, membros da banca examinadora, por aceitarem o convite;

A todos os colegas e funcionários do Instituto de Química da UnB;

Aos colegas da EPE, aquele abraço.

Por fim, digo obrigado ao professor Alexandre Prado, por acreditar em mim e me aceitar como um de seus discípulos.

我不明白了一切。

Wǒ bù míngbáile yīqiè.

我是一个学徒。

Wǒ shì yīgè xuétú.

人们想要的财富，

Rénmen xiǎng yào de cáifù,

但他们不明白

Dàn tāmen bù míngbái

简单的话。

Jiǎndān huà.

André

玉不琢

yù bù zhuó

不成器

bù chéng qì

人不学

rén bù xué

不知义

bù zhī yì

为人子

wéi rén zǐ

方少时

fāng shào shí

亲师友

qīn shī yǒu

习礼仪

xí lǐ yí

O jade não esculpido

Não se torna um instrumento.

A pessoa sem estudo

Não adquire conhecimento.

Para ser discípulo de alguém

O adequado é ser criança.

A amizade com o professor

Mostra-se por estudo, respeito e

obediência.

(O Clássico dos Trissílabos - 三

字經 - Seção IV)

Folha de aprovação

Resumo

Microesferas de quitosana foram produzidas, e as vitaminas ácido retinóico (A) e α -tocoferol (E) foram ancoradas na superfície do biopolímero. As quantidades imobilizadas foram $19,3 \pm 0,5$ e $13,4 \pm 0,4$ mg de ácido retinóico e de α -tocoferol por grama de microesferas, respectivamente. As interações foram acompanhadas por calorimetria, cujas entalpias entre as vitaminas e as microesferas foram exotérmicas: $-18,59 \pm 0,34$ e $-15,17 \pm 0,50$ kJ mol⁻¹, para o ácido retinóico e para o α -tocoferol, respectivamente. A determinação das energias de Gibbs mostrou que os ancoramentos em ambos os casos foram espontâneos, além de entropicamente favoráveis. As microesferas modificadas com tocoferol foram aplicadas em um sistema de liberação controlada em um complexo gastrointestinal mimetizado. Quantidades baixas de tocoferol foram liberadas em pH 1,2, enquanto a liberação cresceu com o aumento de pH, alcançando a estabilidade em pH 7,4. Microesferas modificadas com α -tocoferol e retinil palmitato foram usadas para fortificar três dos principais cremes hidratantes do mercado brasileiro. As microesferas de quitosana modificadas com α -tocoferol e com retinil palmitato liberaram essas vitaminas mais lentamente do que os cremes fortificados com α -tocoferol e retinil palmitato puros.

Palavras-chave: Quitosana; Sistemas de Liberação Controlada; ácido retinóico; tocoferol; biopolímero.

Abstract

Chitosan microspheres were developed and retinoic (A) acid and α -tocopherol (E) vitamins were anchored onto chitosan microspheres. The immobilized amounts of retinoic acid and α -tocopherol, respectively, were 19.3 ± 0.5 and 13.4 ± 0.4 mg per gram of chitosan microspheres. The interactions in solid/liquid interface were calorimetrically followed and gave exothermic values: -18.59 ± 0.34 and -15.17 ± 0.50 kJ mol⁻¹, for retinoic acid and tocopherol, respectively. Both Gibbs energy values were negative. Adsorption processes were accompanied by an increase in the system's entropy. The microspheres modified with α -tocopherol were applied in α -tocopherol controlled release in a simulated gastrointestinal system. Low amounts of tocopherol were released at pH 1.2, whereas the release increased with heightening pH value, reaching the controlled release stability in pH 7.4. Microspheres modified with α -tocopherol and retinyl palmitate were spiked in 3 distinct commercial moisturizing creams. Chitosan microspheres modified with α -tocopherol and retinyl palmitate released those vitamins slower than each cream spiked with pure α -tocopherol and retinyl palmitate.

Keywords: Chitosan; Controlled Release System; retinoic acid; tocopherol; biopolymer.

Sumário

Lista de Acrônimos e Siglas.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Equações	xiv
Introdução	2
1.1 – Mercado de cosméticos.....	3
1.2 – Cremes Faciais	7
1.3 – Vitamina A.....	10
1.4 – Vitamina E.....	13
1.5 – Sistemas de liberação controlada	19
1.6 – Suportes para a liberação controlada	25
1.7 – Quitosana como suporte	28
2 – Objetivos Gerais	35
2.1 – Objetivos Específicos	36
3 – Procedimentos Experimentais	39
3.1 – Materiais e reagentes.....	39
3.2 – Síntese das microesferas de quitosana	40
3.2.1 – Microscopia óptica das microesferas de quitosana	42
3.3 – Interações das vitaminas com as microesferas de quitosana ..	42
3.3.1 – Quantificação das vitaminas adsorvidas	43
3.4 – Espectroscopia de infravermelho.....	44
3.4.1 – Interações das microesferas-vitaminas por FTIR	44
3.5 – Termoquímica das interações entre as microesferas e as vitaminas.....	45
3.6 – Sistemas de liberação controlada	48
3.6.1 – Liberação de α-tocoferol em fluido gastrointestinal mimetizado	48
3.6.2 – Liberações controladas de α-tocoferol e retinil palmitato em cremes hidratantes	49

3.6.2.1 – Preparação das membranas para liberação controlada em cremes	50
3.6.2.2 – Permeação em células de difusão Franz-type	53
4 – Resultados e Discussão	57
4.1 – Caracterizações.....	57
4.1.1 – Síntese das microesferas de quitosana.....	57
4.1.2 – Espectroscopia de infravermelho das microesferas de quitosana	58
4.1.3 – Microscopia óptica das microesferas de quitosana	61
4.2. – Interações das vitaminas com as microesferas de quitosana .	63
4.2.1 – Estudos de FTIR.....	63
4.2.2 – Quantificação de α -tocoferol e ácido retinóico ancorados nas microesferas de quitosana	70
4.2.3 – Microscopias das interações microesferas-vitaminas.	71
4.2.4 – Interações termodinâmicas das microesferas-vitaminas.....	72
4.3 – Sistemas de liberação controlada	80
4.3.1 – Liberação do tocoferol em fluido gastrointestinal mimetizado ...	80
4.3.2 – Liberações controladas em cremes hidratantes.....	83
4.3.2 – Determinação de um modelo cinético das difusões nos cremes	90
5 – Conclusões	98
6 – Referências	101

Lista de Acrônimos e Siglas

9-cis RA – *9-cis Retinoic Acid*

ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATRA – *all-trans Retinoic Acid*

BRICS – Conjunto de países formado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul

FDA – *Food and Drug Administration Agency*

FTIR – Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPPC – Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

IDR – Ingestão Diária Recomendada

MMP – Matriz Metaloproteinase

SBCD – Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica

SLC – Sistemas de Liberação Controlada

TE – Tocoferol Equivalente

UI – Unidade Internacional

UV – Radiação Ultravioleta

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mercado Mundial de Produtos HPPC. ⁵	5
Tabela 2. Vitaminas e suas funções no foto-envelhecimento.	9
Tabela 3. Polímeros usados em sistemas de liberação de fármacos. ³⁹	26
Tabela 4. Constante de equilíbrio, K e funções de estado, ΔH , ΔG e ΔS para as interações do ácido retinóico e tocoferol com as microesferas de quitosana.	78

Lista de Figuras

Figura 1. Faturamento da indústria brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC). ⁴	4
Figura 2. a) (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimetil- 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol (retinol) e b) 1,1'-(3,7,12,16-Tetrametil-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaeno-1,18-diil)bis[2,6,6-trimetilciclohexeno] (β-caroteno).....	11
Figura 3. Estrutura do ácido retinóico.	12
Figura 4. Estrutura do (2R)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4R,8R)-(4,8,12-trimetiltridecil)]-6-cromanol (α-tocoferol).	13
Figura 5. Perfis de liberação de drogas em função do tempo (com adaptações). ³²	20
Figura 6. Possíveis mecanismos de liberação controlada em matrizes poliméricas. (a) liberação a partir da superfície; (b) liberação da superfície e do núcleo; (c) liberação apenas pelo núcleo.....	22
Figura 7. Estabilidade do retinol na forma livre e encapsulada (com adaptações). ³⁸	24
Figura 8. Estruturas da celulose, quitina e quitosana.	29
Figura 9. Sítios reativos da quitina e quitosana (OH, NH e C=O) e alguns exemplos de derivados.....	31
Figura 10. (A) liberação <i>in vitro</i> de vitamina C ancoradas em nanopartículas de quitosana (pH 1,0 e pH 7,4), e (B) liberação <i>in vivo</i> no trato de peixes (<i>O. mykiss</i>) (com adaptações). ⁵²	33
Figura 11. Estrutura do retinil palmitato.	40
Figura 12. Esquema do sistema de obtenção das microesferas contendo: solução de quitosana (a); bomba peristáltica (b); compressor de ar (c); sistema de gotejamento (d); solução de coagulação (e). ⁴⁶	41
Figura 12. Calorímetro PAAR 6755 com sistema de quebra de ampola....	47
Figura 13. Calorímetro PAAR 6755 com sistema de titulação.	47
Figura 15. Corte da orelha do porco da sua face.....	51
Figura 16. Imagem da orelha de porco.	52
Figura 17. Imagem da remoção da membrana da orelha de porco.	52
Figura 18. Imagem da membrana usada para os experimentos de difusão.	53
Figura 19. Célula de difusão Franz-type.	54
Figura 20. Imagem do gotejador construído.	57
Figura 22. Espectro de FTIR da quitosana pura.	59
Figura 21. Reação de formação da ligação imina e bloqueio de grupos amino reativos na quitosana.....	60
Figura 23. (a) Imagem de microscopia óptica e (b) distribuição do tamanho médio das microesferas de quitosana.	62
Figura 24. Espectros de infravermelho das microesferas de quitosana (a), quitosana-tocoferol (b), quitosana-ácido retinóico (c), tocoferol (d), ácido retinóico (e).....	65

Figura 25. Seção correspondente dos espectros contendo as bandas de interação entre quitosana e ácido retinóico [ácido retinóico (A), quitosana (B) e quitosana-ácido retinóico (C)].....	66
Figura 26. Esquema da interação entre ácido retinóico e microesferas de quitosana.	67
Figura 27. Ampliação do espectro de FTIR, mostrando a quitosana (a), a interação microesferas de quitosana- α -tocoferol (b) e o espectro de α -tocoferol (c).....	68
Figura 28. Representação esquemática da interação das microesferas de quitosana com α -tocoferol.	69
Figura 29. Cromatogramas do α -tocoferol (A) e ácido retinóico (B).....	70
Figura 30. Imagem de microscópio ótico das microesferas de quitosana após o ancoramento com α -tocoferol.	71
Figura 31. Valores de calor liberado pela interação do ácido retinóico (■) e α -tocoferol (○) com as microesferas de quitosana.....	75
Figura 32. Perfis de liberação gastrointestinal de α -tocoferol livre (A) e ancorado em quitosana (B), erro baseado no SD, n=3, T = 37°C.	81
Figura 33. Cromatograma do tocoferol e ampliação com diversas concentrações.	82
Figura 34. Esquema de células Franz-type e célula montada no laboratório. O sistema de difusão em si (A), visão do encaixe do sistema de difusão no banho térmico (B), visão do banho térmico contendo o sistema de difusão (C), adaptação para o agitador magnético não sofrer danos por estar imerso na água do banho térmico (D), visão superior do banho térmico (E).	85
Figura 35. Espectros de absorção molecular (em função do tempo) na região UV da difusão do α -tocoferol em cremes (A) e espectro da difusão do α -tocoferol ancorado em microesferas de quitosana (B) das alíquotas retiradas das células Franz-type.	86
Figura 36. Espectros de absorção molecular (em função do tempo) na região UV da difusão do retinil palmitato em cremes (A) e espectro da difusão do retinil palmitato ancorado em microesferas de quitosana (B) das alíquotas retiradas das células Franz-type.	87
Figura 37. Quantidades permeadas, através da membrana, do α -tocoferol livre (■) e α -tocoferol ancorado em microesferas de quitosana (●) nos três cremes distintos.	88
Figura 38. Quantidades permeadas, através da membrana, do retinil palmitato livre (■) e retinil palmitato ancorado em microesferas de quitosana (●) nos três cremes distintos.	89
Figura 39. Modelos de regressão da cinética de permeabilidade cutânea para a vitamina A (retinil palmitato).	94
Figura 40. Modelos de regressão da cinética de permeabilidade cutânea para a vitamina E (tocoferol).....	95

Lista de Equações

$$J = C_w P_w \quad \text{Eq. (1)}$$

$$J = \frac{J_{\max} C_w}{C_w + K_M} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\overline{GD} = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{\frac{A_{3450}}{1,33}} \cdot 100 \right) \quad \text{Eq. (4)}$$

$$Nf = \frac{ni - ns}{m} \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\frac{Cs}{Nf} = \frac{Cs}{Ns} + \frac{1}{Ns.K} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$\Sigma Q_{tot} = \Sigma Q_{tit} + \Delta Q_{sol} - \Delta Q_{dil} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$\Sigma Q_{tot} = \Sigma Q_{tit} - \Delta Q_{dil} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$\frac{\Sigma X}{\Sigma \Delta_r H} = \frac{1}{(K-1)\Delta_{mono} H} + \frac{\Sigma X}{\Delta_{mono} H} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$\Delta_r H = \frac{\sum Q_{\text{int}}}{m} \quad \text{Eq. (10)}$$

$$\Delta H = \frac{\Delta_{\text{mono}} H}{N_s} \quad \text{Eq. (11)}$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad \text{Eq. (12)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. (13)}$$

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_0 t + b \quad \text{Eq. (14)}$$

$$\ln Q_t = -kt + \ln Q_\infty \quad \text{Eq. (15)}$$

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_H \sqrt{t} + b \quad \text{Eq. (16)}$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[D \frac{\partial C}{\partial x} \right] \quad \text{Eq. (17)}$$

Introdução

Introdução

Ao longo dos séculos, apesar das tecnologias associadas à fabricação e inovação virem sofrendo constantes melhorias, a função precípua de um produto cosmético permanece praticamente inalterada, tendo como finalidade tratar a pele de maneira a prevenir a sua deterioração e reestabelecer o seu equilíbrio fisiológico quando este for passível de uma alteração.¹

Por esta razão, a cosmetologia e seu enfoque estético vêm ganhando notoriedade, tornando o uso de cosméticos não apenas uma frivolidade humana, mas também uma premissa médica.

A pele, maior órgão do corpo humano e um dos mais complexos, exerce uma função principal de proteção e revestimento, e sempre foi o principal alvo de retardamento do envelhecimento, desde a Grécia antiga, com o uso de óleos para banho, passando pela Europa medieval com a popularização de pinturas faciais.²

Além de proteger o corpo contra agressões do meio ambiente e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor, tato), a pele também desempenha papel na regulação térmica, defesa orgânica e controle do fluxo sangüíneo. Constituem seus anexos os pêlos, as unhas e o cabelo. O cosmético deve exercer funções de limpeza, correção, proteção e embelezamento da pele e anexos, revertendo os efeitos do foto-envelhecimento.³

O termo cosmético limita-se aos produtos com ação superficial, sem possuírem caráter terapêutico ou penetrarem na estrutura celular, ou ainda, sem ação sinérgica com o sistema circulatório. Quando um produto passa a agir em profundidade sobre a pele e anexos, este deixa de ser considerado um cosmético e passa a ser visto como um medicamento, de domínio médico.

Em linhas gerais, com o aumento da expectativa de vida da população humana, bem como da renda *per capita* média mundial, o interesse comercial por produtos cosméticos mais eficientes e eficazes figura este segmento como um dos mais importantes às economias dos principais países do mundo.⁴

1.1 – Mercado de cosméticos

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o setor apresentou um crescimento expressivo nos últimos 15 anos, com um faturamento *Ex-Factory* (saído da fábrica, sem impostos sobre vendas) em 2010 de R\$ 27,3 bilhões, equivalente a 5,4% do PIB. Esse montante, conforme a Figura 1, é 12,6% maior que o do ano anterior, que fechou com um valor de R\$ 24,4 bilhões.⁴

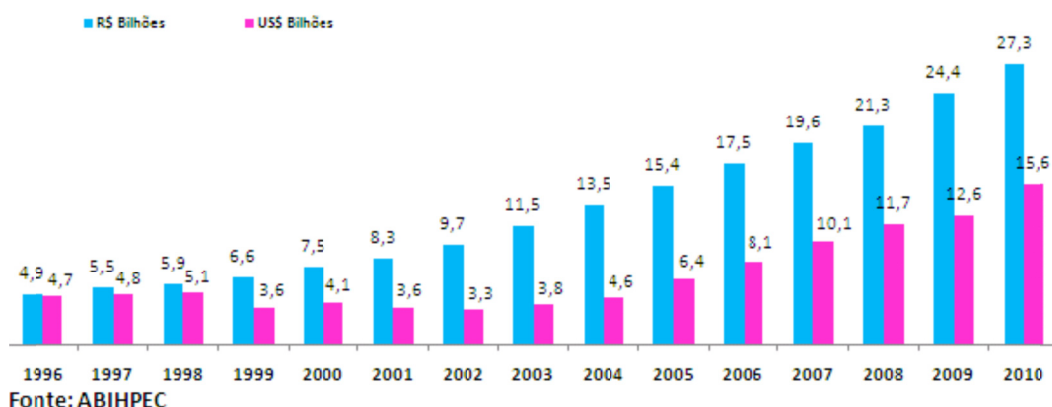


Figura 1. Faturamento da indústria brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC).⁴

A parcela de exportação de produtos de HPPC cresceu 17,8% em 2010, alcançando US\$ 693 milhões, comparando-se com o valor de US\$ 588 milhões em 2009. A América do Sul tem sido o principal mercado importador para os produtos do setor de HPPC. Entretanto, a balança comercial indica que o Brasil tem aumentado também suas importações, totalizando US\$ 696 milhões em 2010 contra US\$ 456 milhões em 2009, um aumento de 52,6%.

De maneira geral, nos últimos 15 anos, o setor apresentou crescimento médio maior que o restante da indústria brasileira, que foi de 2,3%. Em termos de infraestrutura, existem no país 1659 empresas atuando no mercado de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, sendo 14 delas empresas de grande porte.⁴

Em relação ao mercado mundial de HPPC, o Brasil ocupa a terceira posição, conforme a Tabela 1. É o primeiro mercado em desodorante, produtos infantis e perfumaria; segundo mercado em produtos para higiene

oral, proteção solar, masculinos, cabelos e banho; terceiro em produtos cosméticos; quarto em pele e quinto em depilatórios.

Tabela 1. Mercado Mundial de Produtos HPPC.⁵

	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos	2010 US\$ Bilhões (preço ao consumidor)	Crescimento %	Participação %
	Mundo	374,3	7,0	
1	Estados Unidos	59,8	1,7	16,0
2	Japão	43,8	6,8	11,7
3	Brasil	37,4	30,1	10,0
4	China	23,6	10,8	6,3
5	Alemanha	17,7	-2,0	4,7
6	França	15,9	-3,8	4,2
7	Reino Unido	15,3	3,4	4,1
8	Rússia	12,5	15,0	3,3
9	Itália	12,0	-4,5	3,2
10	Espanha	10,4	-5,3	2,8
Top Ten		248,3	6,3	66,3

©2011 Euromonitor International

Dentre os vários fatores responsáveis pelo crescimento do setor, destacam-se o aumento da participação da mulher brasileira no mercado de trabalho, a introdução de novos produtos voltados às necessidades do mercado e o aumento da expectativa de vida, o que contribui para o intento em se conservar um fenótipo juvenil.⁴

É possível destacar outras tendências percebidas nas estratégias empresariais do setor. Uma delas é relativa à liderança dos produtos de beleza e maquiagem, em especial os dermocosméticos. Segundo dados do Euromonitor – instituto internacional que audita o mercado de higiene pessoal em mais de 120 países –, os cuidados com a pele apresentaram crescimento de 40% entre 2002 e 2007.⁵

Essa tendência tem estimulado empresas a incorporarem novos ingredientes ativos, por exemplo, com ações anti-envelhecimento, anti-sinais, ou hidratantes, visando ao aumento da elasticidade e firmeza da pele, dentre outros efeitos. Os investimentos vão desde o desenvolvimento de novas proteínas, aminoácidos com funções específicas, como também os veículos de aplicação desses produtos.⁵

Outra tendência importante é o recente interesse de empresas em inovação por produtos que utilizem ingredientes naturais, pressionadas pela preocupação ambiental e ecológica dos consumidores. Algumas empresas já adotam o conceito de química verde no desenvolvimento de seus produtos, ao utilizar matérias-primas renováveis, reduzir o número de estágios no processo de produção, evitar a formação de resíduos e economizar água.⁵

Ainda segundo o Euromonitor, a projeção é que, no Brasil, até 2013, o consumo *per capita* de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos atinja US\$ 178,00. O último dado divulgado apontava um consumo *per capita* brasileiro de US\$ 146,60 em 2009. O valor previsto para 2013 é três vezes maior que a média mundial e o maior entre os BRICS (conjunto de países formado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul).⁶

Para 2011, as expectativas do setor brasileiro de HPPC são que as indústrias faturarão R\$ 31,12 bilhões de reais, mantendo um crescimento de 13,2%, comparado a 2010.⁴

1.2 – Cremes Faciais

Como dito anteriormente, dentre os vários tipos de cosméticos, os cremes para a pele têm uma importância significativa nesse mercado crescente. Entre os principais compostos presentes nesses dermocosméticos estão as vitaminas.⁷

De acordo com informações da Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica (SBCD), a pele envelhece por dois mecanismos distintos: um intrínseco e outro extrínseco. O envelhecimento intrínseco é decorrente da passagem do tempo, portanto um envelhecimento cronológico. Já o extrínseco, que deixa sinais mais marcantes na pele, é resultado de fatores ambientais, como a exposição solar e o cigarro, que, por possuírem efeito cumulativo, podem desencadear câncer de pele. Segundo a SBCD,⁷ a proteção desde a infância reduz significativamente os riscos de melanomas.

A atenção especial a esta fase da vida justifica-se pelo fato que cerca de 80% de toda radiação solar que um ser humano recebe durante a vida concentra-se nos primeiros 18 anos de idade.⁷

À medida que a pele vai envelhecendo, torna-se mais fina e perde elasticidade. A firmeza da pele é função das ações da elastina e do colágeno, que se tornam mais fracos por causa de fatores físico-químicos (e.g: gravidade, meio ambiente), impulsionando a pele para baixo.²

O rejuvenescimento facial consiste em restaurar uma aparência mais jovem, revertendo os danos solares e o aspecto envelhecido da pele. Como primeira barreira do organismo ao meio externo, as células da pele

produzem uma secreção natural, denominada manto hidrolipídico, que promove sua adequada hidratação. Tal hidratação a protege de ressecamentos, irritações, envelhecimento precoce e até mesmo infecções, pois algumas substâncias presentes combatem bactérias infecciosas.⁸

Muitas substâncias já comprovaram suas eficácias na prática, como o ácido glicólico, a vitamina A (retinol) e seus análogos (e.g: ácido retinóico, retinaldeído e ésteres do retinol), que rejuvenescem; o ácido hialurônico e a uréia, que hidratam; os ácidos ascórbico (vitamina C) e cafeico, antioxidantes redutores de radicais livres, e despigmentantes como a hidroquinona.⁴

A nanotecnologia vem possibilitando o aumento de eficiência dos cosméticos faciais, pois, ao reduzir as partículas que contêm os ativos, estas elevam sua capacidade de penetração, podendo chegar até a derme, agindo de maneira mais eficaz.⁴

No caso das vitaminas, estas são micronutrientes naturais, essenciais à sobrevivência, que o corpo humano não produz. Além de suas funções específicas, certas vitaminas são úteis na prevenção, na forma de fármacos ou produtos cosméticos.⁹ As vitaminas mais importantes são as A, B, C, D, E e K, assim como o ácido fólico.

Estudos *in vitro* determinaram que muitas vitaminas possuem forte ação antioxidante e podem atuar em processos de reparo e crescimento da pele, como mostrado na Tabela 2.¹⁰ Por essa razão, os possíveis benefícios cutâneos das vitaminas em suplementos orais e formulações tópicas têm sido amplamente investigados.

Tabela 2. Vitaminas e suas funções no foto-envelhecimento.

	Funções
Vitamina A	
Carotenóides	Possíveis agentes preventores da destruição do colágeno pela radiação UV
Retinóides	Aumentam o crescimento dos fibroblastos e a produção de colágeno em ensaios clínicos
	Aumentam a espessura da epiderme, reduzindo a aparência de rugas finas. Reduzem os níveis da Matriz Metaloproteinase (MMP), enzima proteolítica que catalisa a degradação de colágeno e elastina em ensaios clínicos
	Apresentam efeito quimiopreventivo no câncer de pele, reduzindo efeitos carcinogênicos nas células
Vitamina C	Aumenta a estabilidade e diminui a sensibilidade do colágeno ao calor
	Estimula a produção de colágeno em ensaios clínicos e <i>in vitro</i>
	Teoricamente capaz de proteger a pele de danos induzidos pela radiação UV devido às suas propriedades antioxidantes
Vitamina E	Age como antioxidante quando aplicado antes da exposição ao sol
	Demonstrada <i>in vitro</i> a capacidade de regular a desagregação de colágeno e elastina
Vitamina B₃	Aumenta a produção de colágeno em ensaios <i>in vitro</i>
	Reduz a hiperpigmentação da pele em ensaios clínicos
Vitamina D	Em ensaios <i>in vivo</i> (ratos), demonstrou proteger a pele do enrugamento fotoinduzido e do espessamento da epiderme
Vitamina K	Reduz as manifestações vasculares do fotoenvelhecimento

1.3 – Vitamina A

A vitamina A (retinol, tretinoína ou axeroftol) é talvez a vitamina mais importante à saúde humana. É uma vitamina lipossolúvel e ocorre sob duas formas principais na natureza – o retinol, propriamente dito, o qual se encontra apenas em fontes animais; e certos carotenóides (pró-vitaminas), os quais provêm apenas de fontes vegetais.¹¹

O retinol é transformado no corpo humano em ácido retinóico, que é a forma bioativa. Este existe em duas formas principais: *all-trans-retinoic acid* (**ATRA**, o mais importante) e *9-cis-retinoic acid* (**9-cis RA**). Todos esses análogos do retinol, juntamente com o retinaldeído e os retinil ésteres, compõem a classe dos retinóides. Os retinóides podem ser encontrados no fígado, gema de ovo, manteiga e triacilglicerídeos de peixes.¹¹

Os carotenóides são os compostos que dão a vários frutos e vegetais a sua cor amarela ou laranja. O carotenóide mais abundante e conhecido é o β -caroteno. O β -caroteno é um precursor da vitamina A ou “provitamina A”, porque a sua atividade como vitamina A ocorre apenas após a sua conversão para retinol no interior do corpo com subsequente transformação em ácido retinóico.

Uma molécula de β -caroteno pode ser clivada por uma enzima intestinal específica em duas moléculas de vitamina A. Alimentos ricos em β -caroteno incluem as cenouras, os vegetais de folhas verde escuro e

amarelas (e.g: espinafre e brócolis), abóboras e melões. A Figura 2 ilustra o retinol e o β -caroteno.

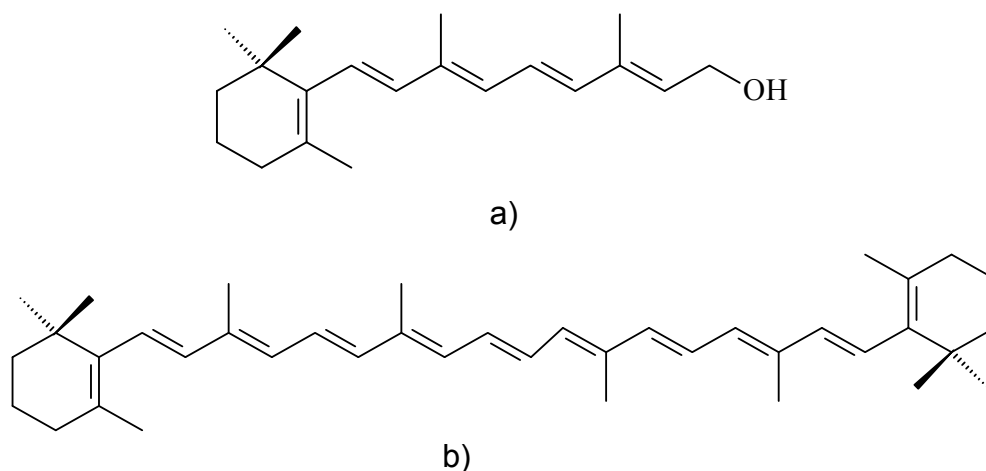


Figura 2. a) (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimetil- 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-enil)nona- 2,4,6,8-tetraen-1-ol (**retinol**) e b) 1,1'-(3,7,12,16-Tetrametil-1,3,5,7,9,11,13,15,17-octadecanonaeno-1,18-diil)bis[2,6,6-trimetilciclohexeno] (**β -caroteno**).

Uma evidente função da vitamina A é como um grande composto das proteínas (chamadas rodopsinas) nos olhos que reagem à luz e tornam a visão possível. A maior parte das funções dessa vitamina, todavia, é realizada por seus receptores, que são fatores de transcrição da família de receptores nucleares. Por estes receptores, o ácido retinóico pode afetar quase todas as funções na célula humana. Sabendo isso, é simples entender porque a vitamina A deve ser consumida em quantidades normais.¹¹

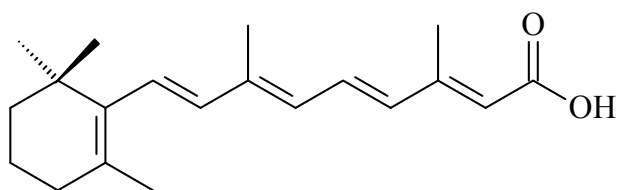


Figura 3. Estrutura do ácido retinóico.

Estudos mais recentes demonstram a importância da vitamina A para uso tópico. Keller e Fenske atestam a eficácia do uso tópico de cremes à base de retinóides e ingestão de carotenóides como redutores do fotoenvelhecimento e dano à pele, bem como manifestações cutâneas como psoríase, câncer de pele, acne, estria, e doenças do sistema imunológico como o lúpus.¹²

No que concerne à estabilidade, por possuir uma estrutura altamente insaturada, a vitamina A é sensível à oxidação pelo ar. A perda de atividade é catalisada pelo calor e pela exposição à luz.

A oxidação dos óleos e gorduras pode destruir as vitaminas lipossolúveis, incluindo a vitamina A (retinóides). No caso do β -caroteno, este é uma das vitaminas mais estáveis em vegetais, cujas perdas por fervura são inferiores a 25%.¹¹ Contudo, como a conversão dessa espécie química dá-se em um ambiente endógeno, sua finalidade para uso tópico fica descartada.

Ainda segundo Keller e Fenske,¹² a presença de antioxidantes, tais como a vitamina E contribui para uma sinergia entre as duas vitaminas, pois esta protege a vitamina A da degradação.

1.4 – Vitamina E

Vitamina E é um termo utilizado para uma série de compostos lipossolúveis que inclui tocoferóis e tocotrienóis. Das diversas formas da vitamina E, as mais abundantes são o γ -tocoferol e o d- α -tocoferol (forma biologicamente ativa). Essas espécies estão presentes nos óleos vegetais, castanhas, alguns tipos de carne e margarina. Possuem o caráter de interromper a produção de radicais livres no metabolismo de lipídeos, atuando como antioxidantes.¹³ A Figura 4 exemplifica o α -tocoferol.

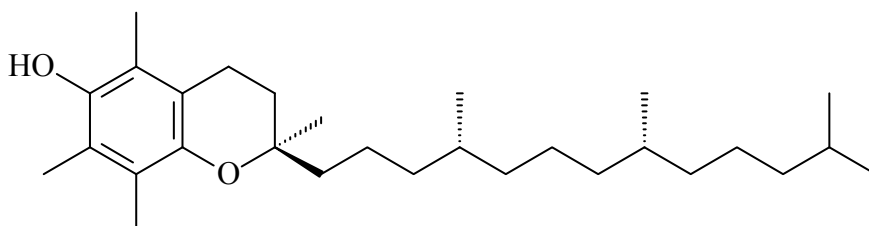


Figura 4. Estrutura do (2R)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4R,8R)-(4,8,12-trimetiltridecil)]-6-cromanol (α -tocoferol).

A vitamina E foi proposta como tratamento a uma série de manifestações cutâneas, incluindo melasmas (manchas escuras na pele), síndrome da unha amarela, dermatites atópicas e controle da cicatrização.¹⁰ A razão é o fato dela desempenhar um papel importante na desagregação de colágeno da pele.

Quando fibroblastos de indivíduos mais idosos foram incubados com α -tocoferol, os níveis de transcrição da MMP, que são normalmente elevados em pessoas mais velhas, foram significativamente reduzidos e nenhuma mudança no tecido foi observada. Segundo os autores desse

estudo¹⁰, como qualquer composto, a vitamina E somente exercerá seus efeitos fotoprotetores nos tecidos quando presente em concentrações adequadas.

A radiação UV reduz significativamente os níveis cutâneos de vitamina E. Estudos *in vivo* demonstram que aplicações tópicas de vitamina E em cremes são eficientes na proteção contra os efeitos da radiação UV. Interessantemente, o efeito protetor da vitamina E é percebido quando aplicado antes ou depois da exposição à radiação UV.¹⁰

A aplicação de acetato de d- α -tocoferol após exposição à luz UV diminuiu eritemas, edemas e a sensibilidade da pele de ratos.¹⁰ A vitamina E contribui para a defesa antioxidante da pele, absorvendo luz UV na região do espectro solar que é responsável pela maior parte dos efeitos biológicos deletérios do sol.^{14,15}

Relativo à estabilidade dessa vitamina, a luz, oxigênio e o calor, além de más condições de armazenagem e processamento de alimentos, diminuem o conteúdo de vitamina E destes. Em alguns alimentos, o teor reduz em até 50% apenas após duas semanas de armazenamento à temperatura ambiente. O processo de fritura destrói, em grande parte, a vitamina E presente nos óleos.¹¹

Apesar da eficácia do ácido retinóico e do α -tocoferol, existem algumas limitações em seus usos em cosméticos, tais como a baixa solubilidade em fase aquosa; instabilidade na presença de luz e oxigênio, o que leva a degradações rápidas das vitaminas, sem o devido aproveitamento da pele; ou ainda hiperconcentrações locais.^{16,17} No caso

específico do ácido retinóico, há a ocorrência de reações locais como irritações da pele, eritemas, xerose e escamação leve.¹⁰

Dessa maneira, microesferas de quitosana podem ser uma alternativa viável para uma liberação controlada de ácido retinóico e α -tocoferol tanto na pele, quanto no trato gastrointestinal, no caso da vitamina E, minimizando a irritação produzida quando da aplicação tópica, resultado da liberação prolongada, o que confere mais estabilidade às moléculas,^{18,19} ou maximizando a absorção da vitamina E por via oral, não aproveitada na alimentação.

Nas fórmulas manipuladas que prescrevem para os pacientes, os dermatologistas costumam indicar de 1% a 3% de vitamina A; de 10% a 15% de C; e de 3% a 5% de E. Nos cremes, vendidos livremente nas lojas, essas substâncias aparecem em menor quantidade – se a concentração fosse maior, seriam classificados como medicamentos e precisariam de receita. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determina um limite máximo para vitaminas em cosméticos (o da A é de 1%, da C, 10%; e para vitamina E, que quase não possui efeitos colaterais, é livre).²⁰⁻²²

A perda de fármacos e micronutrientes resultante das aplicações de cremes e formulações farmacêuticas tem sido bastante estudada, e propostas para diminuir tais perdas baseiam-se principalmente em suportes para essas substâncias.

Para prevenir esses problemas, essas vitaminas podem ser imobilizadas em matrizes poliméricas biocompatíveis, como por exemplo, microesferas de quitosana, a fim de reduzir suas degradações pelo calor e

luz. Essas macromoléculas constituem um grupo de materiais de especificidade química conhecido na literatura por sistemas de liberação controlada (SLC).²³

Além dos efeitos cosméticos, a vitamina E é essencial à saúde, e a sua deficiência no organismo humano pode causar diversos males. O α -tocoferol inibe a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, auxiliando contra os danos celulares e doenças cardiovasculares. É conhecido que doses de vitamina E regeneram tecidos e aumentam a resistência imunológica humana. A falta de vitamina E na alimentação pode causar esterilidade tanto ao homem como a mulher.²⁴

No tocante à ingestão de vitamina E, muitos estudos investigam a sua importância na alimentação, bem como a relação entre a quantidade ingerida e a perda por excreção não aproveitada deste micronutriente. Por exemplo, Oliveira *et al.* relatam que, em estudos dos níveis de micronutrientes no plasma sanguíneo de adolescentes, todos do grupo apresentaram consumo de vitamina E inadequado (40% de inadequação), quando comparado aos valores de referência,^{25,26} o que pode levar a anemias e problemas de pele.

As quantidades diárias recomendadas de vitamina E na dieta humana foram primeiramente propostas por Evans e Bishop em 1922, ao correlacionar os sintomas de sua deficiência com a atividade biológica de animais, relacionando-a a neuropatia, miopatia e morte fetal.²⁷

Até 1980, a ingestão diária recomendada (IDR) para vitamina E era expressa em UI (Unidade Internacional); a partir de então, o termo tocoferol

equivalente (TE) passou a ser utilizado para indicar a IDR, onde 1,0 mg de α -tocoferol equivale à 1 TE. Dessa maneira, como todas as formas da vitamina E apresentam atividades biológicas, seus valores passam a ser expressos em tocoferol equivalente, definidos como: α -tocoferol, 1,0 mg:1 TE; β -tocoferol, 1,0 mg:0,5 TE; γ -tocoferol, 1,0 mg:0,1 TE; δ -tocoferol, 1,0 mg:0,03 TE; α -tocotrienol, 1,0 mg:0,3 TE e β -tocotrienol, 1,0 mg:0,05 TE.^{13,25}

Uma vez que os seres humanos são incapazes de realizar a biossíntese da vitamina E, a IDR deste micronutriente é de 10 mg de α -tocoferol para adultos.²⁸

O estômago, embora não seja o sítio primário de absorção de um nutriente, configura-se como o primeiro local onde uma formulação administrada oralmente pode liberar suas substâncias bioativas.

Para compostos altamente solúveis em pH gástrico, a completa dissolução pode ocorrer no estômago. Para esses compostos, o esvaziamento gástrico pode perfeitamente limitar a subsequente taxa de absorção do intestino delgado.²⁹

Para compostos neutros, parcialmente solúveis, como o α -tocoferol, a dissolução será lenta na região gástrica e, em muitos casos, não será completa antes da substância chegar aos primeiros sítios absorventes no intestino delgado. A dissolução incompleta desses componentes no trato gastrointestinal pode restringir severamente sua bioviabilidade oral. Isso pode resultar em uma supersaturação da substância ao se deslocar do pH estomacal para o pH do intestino delgado, mais alto.²⁹ Precipitações podem

ocorrer, embora esse processo seja dificultado pelos componentes da bile, que promove a formação de sais, o que mantém tais espécies solúveis.²⁹

A concentração de determinada substância (e.g: fármaco ou micronutriente) na parede intestinal, C_w (g dm^{-3}), é um dos dois principais determinantes da taxa de captação e transporte através da membrana celular do epitélio intestinal. O outro fator é a permeabilidade da substância.

Dependendo do mecanismo de transporte, o fluxo da espécie química pela mucosa intestinal, J ($\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), pode ser descrito pelas seguintes equações:

Para o transporte passivo:

$$J = C_w P_w \quad \text{Eq. (1)}$$

Para o transporte mediado por carreadores:

$$J = \frac{J_{\max} C_w}{C_w + K_M} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde, P_w ($\text{dm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) é o coeficiente de permeabilidade da membrana, J_{\max} ($\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) é o fluxo máximo da substância através da membrana, e K_M é a constante Michaelis-Menten.

Pelo fato do intestino delgado ser o sítio principal de absorção para a grande maioria dos compostos, a concentração nessa região é a mais importante para o cálculo do fluxo.²⁹

Um dos grandes problemas da ingestão de fármacos e sua grande quantidade de perda, é que cerca de 90% de todo fármaco ingerido é eliminado nas excreções humanas. Assim, os sistemas de liberação controlada tornam-se úteis para tentar gerar doses ideais durante um período mais longo de tempo.³⁰

1.5 – Sistemas de liberação controlada

Sistemas de liberação controlada (SLC) correspondem a dispositivos projetados para alvos específicos em organismos. A tecnologia de liberação controlada de fármacos e outras substâncias bioativas representa uma das fronteiras da ciência, a qual pode contribuir muito para o avanço do conforto, da estética e da saúde humana.³¹

Sistemas de liberação controlada possuem inúmeras vantagens em comparação aos sistemas convencionais. Nas formas de administração tradicionais (oral, tópica, subcutânea ou nebulização) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina.^{31,32}

Considerando que cada espécie química possui uma atividade no organismo na qual, acima de determinada concentração máxima esta torna-se tóxica e, abaixo de um nível mínimo ela não exerce ação alguma, os níveis plasmáticos são dependentes das doses dessas espécies. Quando um produto contém uma dosagem próxima à dosagem tóxica, tal fator torna-se de extrema importância.^{31,32}

Portanto, um SLC tem como finalidade manter a concentração do fármaco entre os níveis máximo e mínimo por um período prolongado, com uma única aplicação. A Figura 5 compara a eficácia de um fármaco liberado via SLC com os sistemas convencionais.³²

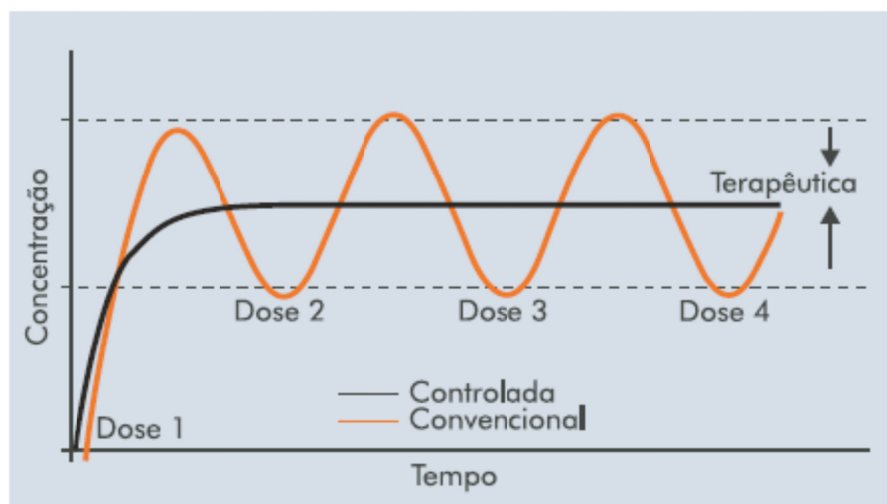


Figura 5. Perfis de liberação de drogas em função do tempo (com adaptações).³²

Como observado na Figura 5, as rotas convencionais de administração de fármacos não seguem o perfil farmacocinético ideal, representado pela curva *Controlada*, o que reduz seus efeitos. O ideal para essas substâncias é que elas permaneçam sob concentrações não críticas por um período prolongado de tempo.^{33,34}

Para proceder à imobilização dessas substâncias, as matrizes de suporte são comumente poliméricas, na forma de nano ou micropartículas. As espécies químicas podem ser incorporadas por dois métodos:³³ i) durante a síntese da partícula e ii) pela adsorção da espécie química (e.g:

vitaminas, fármacos) após a formação da micropartícula, por meio da imersão do polímero em uma solução do adsorbato.

SLC têm sido estudados há mais de 30 anos e apresentam as seguintes vantagens:³⁴

- i. Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- ii. Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- iii. Natureza e composição variadas dos veículos, sem que se verifique predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- iv. Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- v. Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização irreversível das espécies bioativas;
- vi. Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas;

Como mostrado na Figura 6, a espécie química (e.g: vitamina) será liberada ao longo do tempo pela difusão através da matriz polimérica (a), pela degradação da estrutura da macromolécula (erosão) (c), ou pela combinação de ambos os mecanismos (b). A liberação contínua da substância pode potencialmente levar a um perfil farmacocinético perto do cenário ideal visualizado na Figura 5.

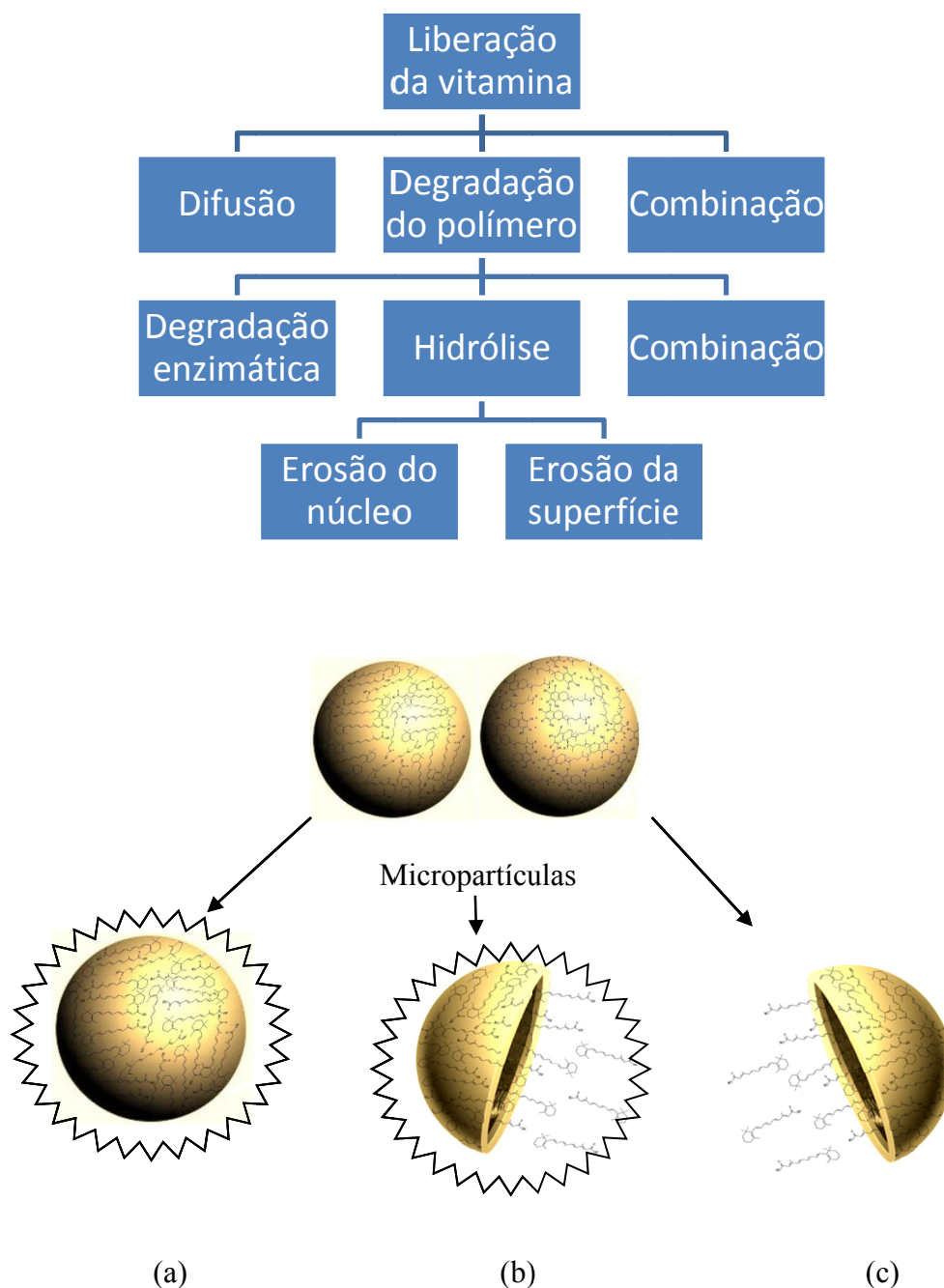


Figura 6. Possíveis mecanismos de liberação controlada em matrizes poliméricas. (a) liberação a partir da superfície; (b) liberação da superfície e do núcleo; (c) liberação apenas pelo núcleo.

Muitos estudos têm apresentado cinéticas de liberação de vitaminas e fármacos a partir de matrizes poliméricas regidas por esses mecanismos de liberação.^{34,35,36} De maneira geral, a cinética do processo é dependente

de três fatores majoritários: o tipo de polímero; a morfologia do polímero e excipientes no sistema. A quantidade de material adsorvido depende tanto da estrutura química do adsorbato (vitamina) quanto do adsorvente (polímero), bem como das condições reacionais.

A determinação de isotermas de adsorção possibilita a obtenção de informações vitais sobre a melhor formulação possível, o número de mols adsorvidos na superfície e o número de sítios de ligação do adsorvente.

Na literatura, essas novas estratégias para a veiculação envolvem aplicações importantes da ciência de colóides, sob a forma de emulsões, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas.³⁷

Klee e colaboradores desenvolveram um estudo acerca do efeito sobre o pH da pele após a liberação controlada de determinadas substâncias, como o retinol. O material de suporte utilizado foi um copolímero à base de metacrilato. Os autores mostram que os testes de estabilidade aplicados ao retinol livre e às microcápsulas contendo o ingrediente são significativamente diferentes, pois o retinol encapsulado manteve-se estável por até 12 semanas, conforme a Figura 7.⁴⁰

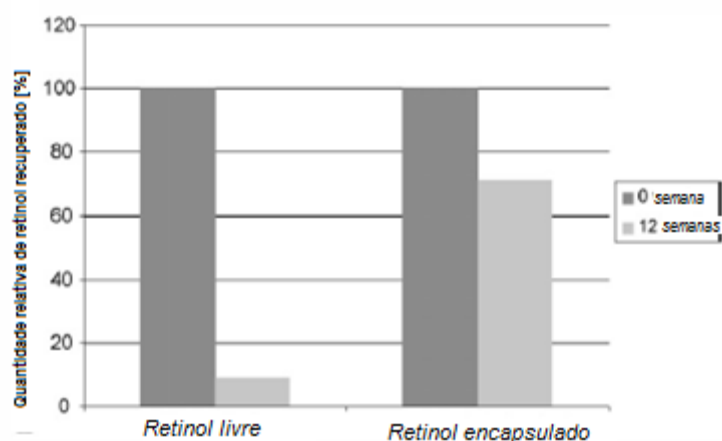


Figura 7. Estabilidade do retinol na forma livre e encapsulada (com adaptações).⁴⁰

De acordo com Kumari *et al.*,³³ a cinética da liberação controlada de fármacos a partir de nanopartículas pode ser descrita por uma função bi-exponencial.

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde C é a concentração do medicamento que permanece na nanopartícula em um tempo t , A e B são constantes características do sistema (A é relativa ao controle por difusão e B ao controle por erosão do sistema), α e β são constantes obtidas empiricamente a partir do gráfico que contém os dados.³³

Como já relatado, a aplicação de fármacos e outras substâncias sobre a pele é uma atividade antiga, que ocorre sob variadas formas, tanto para efeito tópico como para efeito sistêmico. Os avanços nesta área dizem respeito aos níveis dos excipientes das preparações farmacêuticas, à

inércia dos próprios excipientes e a capacidade de conterem veículos promotores de permeação.

Para entendimento dos processos de difusão de fármacos e outras substâncias através da pele, os modelos *in vitro* de permeação, sejam com peles artificiais (membranas), ou com peles animal e humana, têm contribuído bastante.³⁸

Apesar de apenas ser possível compreender parte dos fenômenos que se passam *in vivo*, os modelos *in vitro* têm sido ferramentas úteis na previsão da difusão de compostos, sobretudo de moléculas lipofílicas de baixa massa molar.³⁹

Na grande maioria dos estudos, os fenômenos de permeação são reduzidos a um processo de difusão governado pelas Leis de Fick. Geralmente são utilizadas células constituídas de um material inerte como o vidro, aço inoxidável ou teflon, bem como todos os componentes do sistema que podem ligar a célula a vários instrumentos de análise.²

1.6 – Suportes para a liberação controlada

Materiais poliméricos, naturais ou sintéticos, são as principais macromoléculas estudadas pelas ciências farmacêuticas no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Os polímeros mais usados na liberação controlada de fármacos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Polímeros usados em sistemas de liberação de fármacos.⁴¹

Classificação	Polímero
Polímeros naturais	
Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrinas
Polímeros sintéticos	
<i>Biodegradáveis</i>	
Poliéster	Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(hidroxibutirato), poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido β -málico), poli(dioxanonas)
Polianidrido	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido terftálico) e vários copolímeros
Poliamidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos
Polímeros fosforosos	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos
Outros	Poli(ciano acrilatos), poliuretanos, éster poliorto, Polidihidropirans, poliacetais
<i>Não biodegradáveis</i>	
Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metilcelulose
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros Acrílicos	Polimetracrilatos, poli(metilmetacrilato), poli hidro(etilmetacrilato)
Outros	Polivinilpirrolidona, etilvinilacetato, poloxameros, poloxaminas

A utilização de materiais poliméricos como suporte para fármacos está crescendo rapidamente, principalmente em áreas como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo, dentre outras.⁴²

Devido às suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada de fármacos, os polímeros estão entre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas.⁴⁰

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumores.

Polímeros biologicamente degradáveis incluem⁴⁰ a quitosana, a qual é classificada como polissacarídeo³⁷ possuidor de uma estrutura muito similar à da celulose, com cadeia linear, e grupos amino primários que rendem propriedades especiais, que a faz muito útil em aplicações farmacêuticas e se destaca por possuir facilidade para a formação de gel, além de ser hidrofílica, biodegradável, biocompatível e bactericida.^{43,44}

Comparada a muitos outros polímeros naturais, a quitosana possui uma densidade de carga positiva, resultado da quaternização de seus grupos amino, além de ser muco-adesiva. Conseqüentemente, em razão dessas características favoráveis, além de seu baixo custo,⁴⁵ pode ser utilizada extensivamente em aplicações de sistemas de liberação controlada de fármacos e outras substâncias.

1.7 – Quitosana como suporte

Como apresentado, dentre as classes de materiais candidatos à utilização como suporte para liberação controlada estão os biopolímeros, que além de biodegradáveis são também biocompatíveis. Os polissacarídeos, como uma classe de macromoléculas naturais, possuem alta compatibilidade biológica, e são em geral derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos.

Celulose e amido são exemplos de biopolímeros antigos, enquanto que a quitina e a quitosana são exemplos de biopolímeros cujos estudos e aplicações são mais recentes devidos principalmente aos seus baixos-custos.⁴⁶

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, sendo sintetizada por um grande número de organismos vivos, apenas atrás da celulose.⁴⁷ Este material natural é o componente principal do exoesqueleto dos artrópodes, presente também nas paredes celulares de algumas espécies de fungos e leveduras³⁵.

Alguns derivados da quitina podem ser obtidos por meio de processos simples, como a quitosana, por exemplo. Este é o principal derivado da quitina e consiste em um amino polissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido pelo processo de desacetilação da quitina, via tratamento alcalino ou hidrólise enzimática.⁴⁸ A Figura 8 compara as estruturas da quitina e da quitosana com a da celulose.

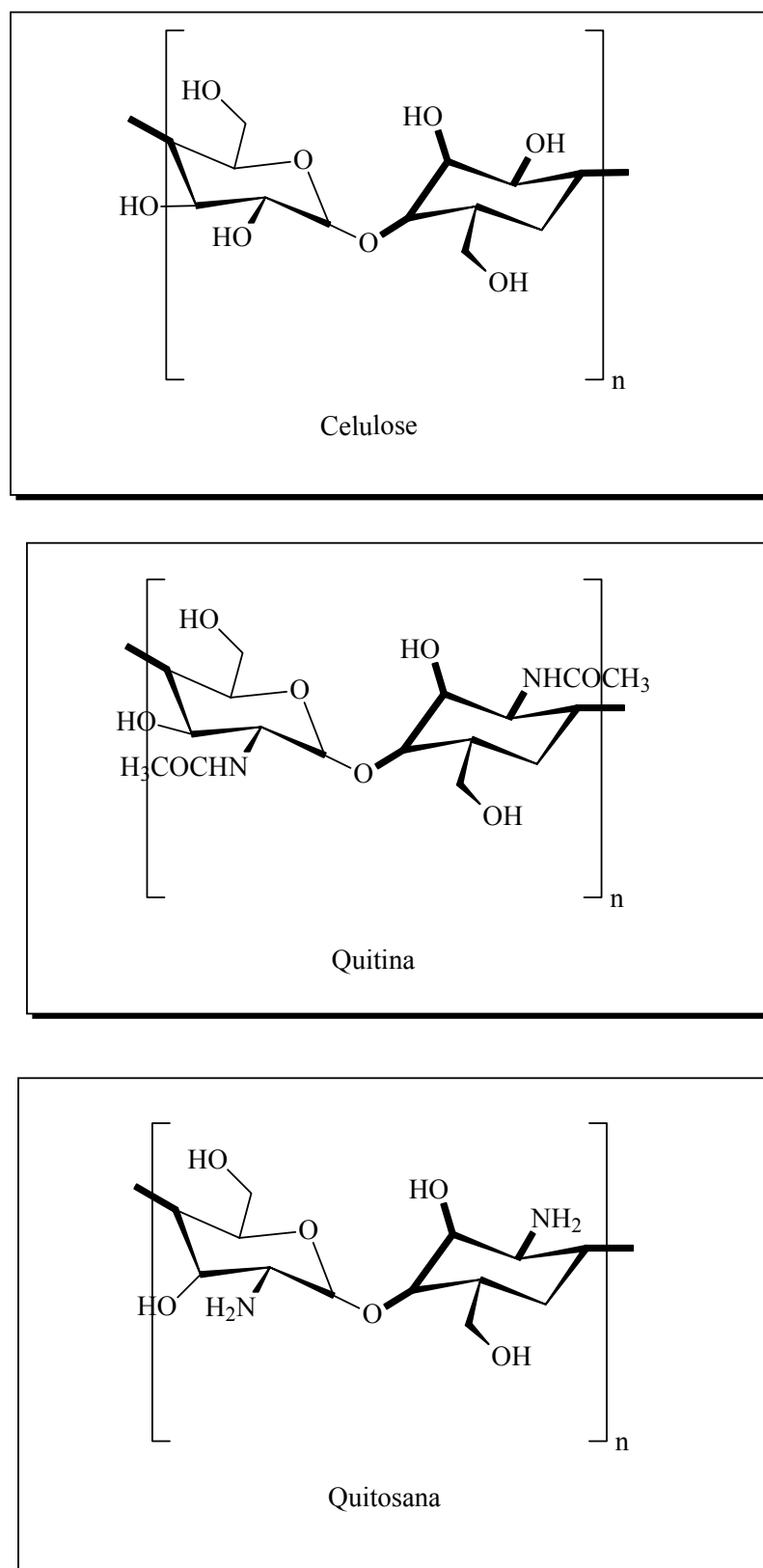


Figura 8. Estruturas da celulose, quitina e quitosana.

Comparada com a celulose, a quitosana diferencia-se nos grupos funcionais. Enquanto a celulose apresenta grupos hidroxila ($-OH$) na estrutura, na quitosana alguns desses grupos são substituídos por grupos amino ($-NH_2$). Isso possibilita sua dissolução em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico com a protonação do grupo amino, o que lhe confere propriedades diferenciadas, como inércia no trato gastrointestinal de mamíferos, por exemplo. Além dos grupos amino, a quitosana e a quitina também possuem grupos hidroxil, que influenciam em sua solubilidade e reatividade.

A principal vantagem da utilização da quitosana reside em sua disponibilidade abundante na natureza, através da transformação da quitina, facilmente encontrada como subproduto da indústria pesqueira.

Além disso, suas propriedades químicas fazem que a quitosana seja empregada em diversas áreas da ciência e tecnologia, como em sistemas de pré-concentração,⁴⁹ adsorção de contaminantes,^{51,52} catálise,⁵³ liberação controlada de drogas e cosméticos.^{54,55,56} A Figura 9 apresenta os sítios reativos da quitina ($q>p$) e quitosana ($p>q$) e alguns derivados desses biopolímeros.

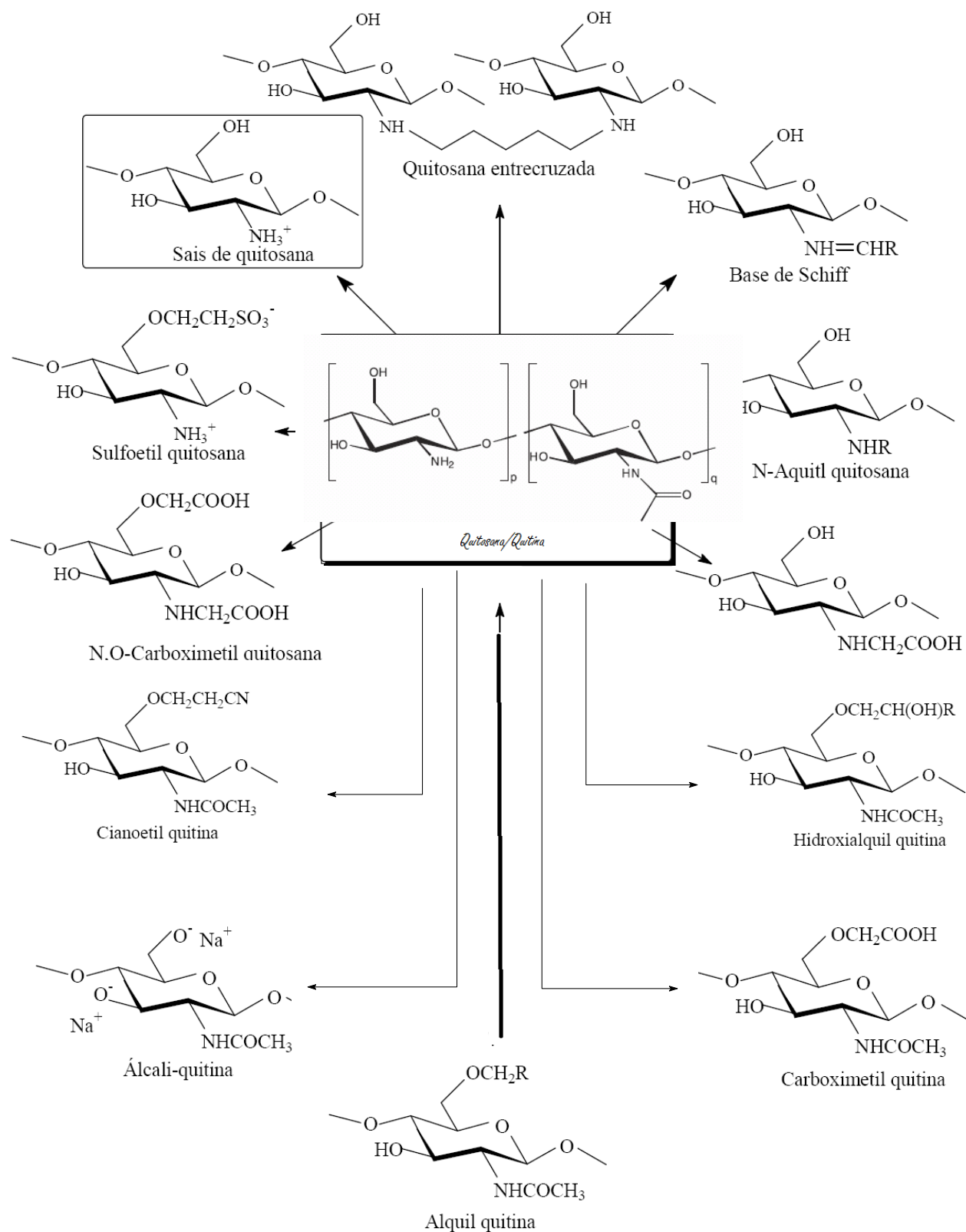


Figura 9. Sítios reativos da quitina e quitosana (OH, NH e C=O) e alguns exemplos de derivados.

A quitosana tem sido estudada como um biomaterial de potencial aplicação nas áreas médica, farmacêutica e de materiais. Mi e colaboradores realizaram estudos sobre a aplicação de quitosana na liberação controlada de fármacos.⁵⁴ Prado e colaboradores estudaram o desempenho da quitosana na adsorção de corantes.⁵²

A quitosana encontra aplicação nos produtos para pele, principalmente por causa da sua capacidade de formar camadas protetoras transparentes, capazes de reter a umidade sem causar reações alérgicas. A quitosana apresenta-se ainda como uma matriz apropriada para outros ingredientes ativos em cosméticos, como as vitaminas. O caráter hidrofílico e hidrofóbico deste biopolímero o torna um potente estabilizador de emulsões.⁴⁷

A quitosana na forma de esferas foi estudada como suporte à liberação de vitaminas C e D por via oral.^{55,56} No trabalho desenvolvido por Alishahi *et al.*,⁵⁵ a vitamina C foi imobilizada em nanopartículas de quitosana, onde os autores avaliaram a vida útil do suporte vitamina-quitosana, além de compararem sua liberação controlada *in vitro* (sistema gastrointestinal mimetizado) e *in vivo* (truta).⁵⁵ A liberação foi rápida em pH intestinal simulado (tampão de fosfato 0,1 mol dm⁻³, pH 7,4), enquanto que em pH gástrico, esta foi mais lenta (HCl 0,1 mol dm⁻³, pH 1,0). A Figura 10 mostra o perfil de liberação da vitamina no organismo dos peixes, que apresentou a mesma tendência dos ensaios *in vitro*.

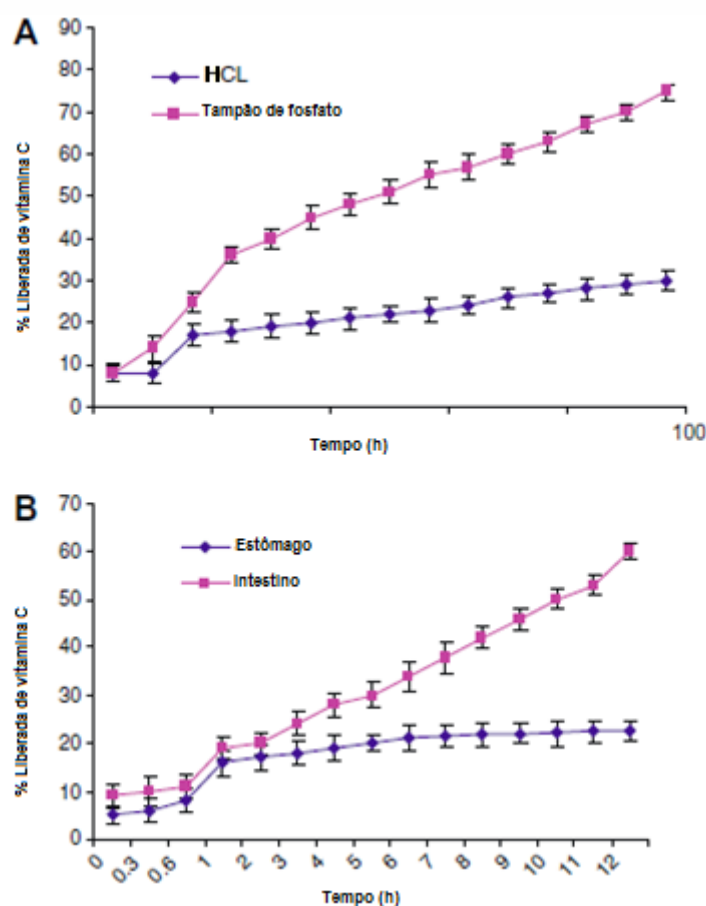


Figura 10. (A) liberação *in vitro* de vitamina C ancoradas em nanopartículas de quitosana (pH 1,0 e pH 7,4), e (B) liberação *in vivo* no trato de peixes (*O. mykiss*) (com adaptações).⁵⁵

Portanto, torna-se interessante avaliar a capacidade da quitosana servir de suporte à liberação controlada de vitaminas essenciais à saúde, como a A e a E. A afinidade biológica que este material apresenta, associada ao fato de que ainda não há um mercado estruturado para o completo aproveitamento da matéria-prima da qual este biopolímero deriva, pode criar um cenário oportuno para o campo da pesquisa e desenvolvimento.

2.0 – Objetivos

2 – Objetivos Gerais

Esta tese teve como objetivo principal investigar a viabilidade técnico-científica de potenciais veículos de liberação controlada, baseados em microesferas de quitosana. As substâncias bioativas escolhidas para imobilização na matriz polimérica foram as vitaminas A (na forma de retinóides) e E (na forma de α -tocoferol), em virtude de suas respectivas relevâncias para o balanço vitamínico. As estratégias escolhidas para condução do estudo consistiram na aplicação das microesferas enriquecidas com vitamina E na liberação controlada em sistema gastrointestinal simulado, bem como a avaliação das permeações cutâneas destes micronutrientes e suas respectivas biodisponibilidades, em ensaios envolvendo dermocosméticos fortificados com e sem as vitaminas A e E ancoradas nas microesferas. Não se objetivou desenvolver uma formulação oral envolvendo microesferas de quitosana e alguma forma da vitamina A em função do β -caroteno possuir um baixo índice de perda, não se enquadrando no delineamento do problema.

2.1 – Objetivos Específicos

Dentro dos objetivos gerais deste trabalho, uma metodologia de estudo foi delineada. Esta procurou estabelecer parâmetros significativos que pudessem confirmar a eficiência e a eficácia do material desenvolvido na incorporação e posterior liberação das vitaminas no sítio desejado. Para tal, métodos de desenvolvimento e técnicas analíticas foram empregados para caracterizar as microesferas de quitosana sintetizadas por um processo inovador e de baixo custo, desenvolvido no laboratório. Buscou-se avaliar, por exemplo, características morfológicas, dimensionais e regioquímicas que pudessem auxiliar na compreensão microscópica dos fenômenos observados.

Em sequência, aspectos relativos à capacidade de ancoramento das vitaminas sobre a matriz polimérica, bem como a natureza das interações foram investigados por meio de estudos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), titulação calorimétrica e espectroscopia na região de infravermelho médio (FTIR). O conjunto de resultados para algumas das variáveis obtidas, em comparação com a literatura, possibilitou inferências que contribuíssem ao estado da arte sobre o assunto.

A realização de estudos de liberação controlada da vitamina E, imobilizada em quitosana, em ambiente gastrointestinal mimetizado, assim como as liberações controladas (*in vitro*) das vitaminas A e E, por meio de aplicações tópicas de cremes enriquecidos com α -tocoferol e retinil

palmitato,¹ objetivaram a determinação e interpretação de características relativas apenas a primeira etapa do processo farmacocinético das substâncias (que consiste na **absorção**, distribuição, biotransformação e excreção), ao quantificar suas biodisponibilidades ao longo do tempo, após a introdução do biopolímero no meio difusor. Partindo-se desta premissa, estabeleceu-se como critérios relevantes quantificar a porcentagem de vitamina E liberada pelas microesferas que estaria disponível no trato gastrointestinal, as quantidades permeadas através da pele em um determinado intervalo de tempo, bem como propor um modelo cinético que se adequasse à difusão das vitaminas A e E a partir das formulações preparadas.

¹ Para fins desta tese, a etapa de liberação controlada de vitamina A foi realizada sob a forma do retinóide retinil palmitato. As razões são descritas na seção *Procedimentos*.

3.0 – Experimental

3 – Procedimentos Experimentais

3.1 – Materiais e reagentes

Quitosana ($\bar{M} = 120000 \text{ g mol}^{-1}$) foi obtida da Genix Indústria Farmacêutica. α -tocoferol ($M = 430,71 \text{ g mol}^{-1}$), ácido retinóico ($M = 300,44 \text{ g mol}^{-1}$) e retinil palmitato ($M = 524,86 \text{ g mol}^{-1}$) foram obtidos da empresa Sigma. Demais reagentes como ácido acético, hidróxido de sódio, glutaraldeído, etanol, acetona, metanol, acetonitrila, cloreto de sódio e fosfato de sódio foram obtidos em grau analítico (P.A.) da empresa Vetec, e utilizados como recebidos. Para os ensaios de liberação controlada, foram utilizadas três das principais marcas de cremes hidratantes do mercado nacional.

Deve-se destacar que no decurso dos estudos desta tese, foram levantadas informações sobre a utilização tópica das vitaminas A e E. Pelo fato da literatura internacional não fazer nenhuma objeção legal a ensaios tópicos envolvendo essas espécies químicas, os experimentos preliminares envolveram vitaminas A e E em suas formas ativas, ácido retinóico e α -tocoferol, respectivamente.

Entretanto, apesar da agência americana que regula essas substâncias (FDA) não fazer qualquer proibição ao seu uso em cosméticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) segue diretrizes européias,⁵⁷ que liberam o uso sem restrições para o α -tocoferol, mas

proíbem o uso de vitamina A em cosméticos na forma de ácido retinóico, por risco de efeitos teratogênicos.⁵⁸ Desta forma, para os ensaios de liberação tópica, utilizou-se vitamina A na forma de retinil palmitato (Figura 11), um éster do ácido retinóico, o qual é liberado pela Anvisa e FDA e utilizado em diversas formulações comerciais, além de se fazer presente em na literatura em estudos relativos à liberações dérmicas de vitamina A.⁵⁰

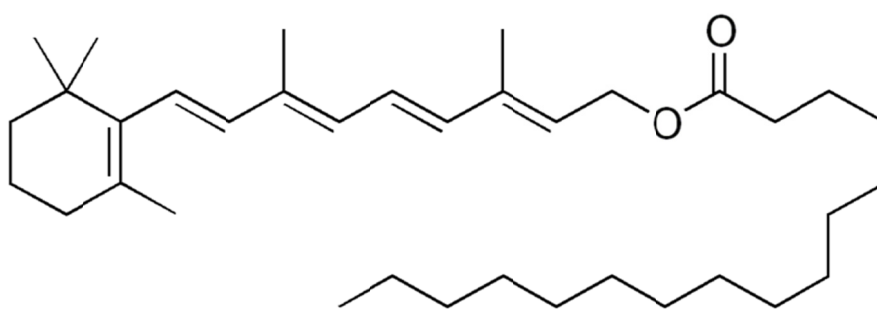


Figura 11. Estrutura do retinil palmitato.

3.2 – Síntese das microesferas de quitosana

A preparação das microesferas de quitosana foi realizada conforme adaptações do método proposto por Rorrer e Hsien, que consiste na formação de micropartículas de quitosana gotejadas sobre uma solução coagulante, com posterior reticulação com glutaraldeído.⁵¹ O sistema de gotejamento utilizado foi uma adaptação do sistema proposto por Dias e colaboradores,⁵² cuja ideia inicial e protogênese deve-se ao trabalho de Prado *et al.*,⁴⁸ no esforço de desenvolver um sistema de baixo custo para preparação das microesferas. O sistema de gotejamento (Figura 12) foi

construído utilizando-se partes de uma caneta esferográfica (tubo externo, tubo da carga e tampa) e uma agulha de insulina (0,45 mm Ø; 13 mm).

A adaptação dos componentes do sistema de gotejamento para formar um sistema em fluxo para maior velocidade de obtenção de microesferas foi desenvolvida por Prado *et al.*⁴⁸

Uma solução de quitosana 10% (m/v) foi preparada em ácido acético 10% (v/v) e, com o auxílio de uma bomba peristáltica acoplada a um compressor de ar (Schulz, modelo MSL 10ML/175), foi gotejada sob um fluxo de $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ sobre uma solução coagulante de hidróxido de sódio 12% (m/v) mantida sob leve agitação, como mostra a Figura 12. O uso do compressor foi necessário para expulsar a gota da solução de quitosana da ponta da seringa. Em seguida, as microesferas gelificadas foram enxaguadas com água deionizada até pH 7,0.

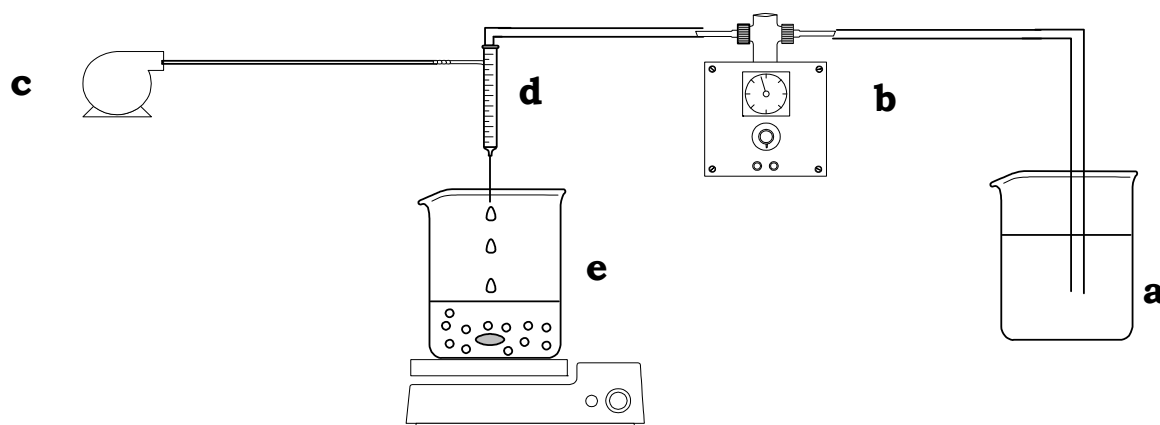


Figura 12. Esquema do sistema de obtenção das microesferas contendo: solução de quitosana (a); bomba peristáltica (b); compressor de ar (c); sistema de gotejamento (d); solução de coagulação (e).⁴⁸

Depois de neutralizadas, as microesferas gelificadas foram reticuladas em uma solução 25% (m/v) de glutaraldeído, sem agitação por duas horas, para que alguns dos grupos amino presentes na quitosana ficassem interligados pelos grupos aldeído da solução reticulante. Posteriormente, as microesferas reticuladas foram filtradas e lavadas com água deionizada em excesso, para retirar qualquer resíduo de glutaraldeído não reagido. Por fim, as microesferas foram imersas em acetona por 24 h, para facilitar a extração de água, e depois secas a temperatura ambiente por 48 h.⁴⁸⁻⁵³

3.2.1 – Microscopia óptica das microesferas de quitosana

As imagens de microscopia óptica das microesferas de quitosana e dos pares microesferas-vitaminas foram obtidas em um microscópio trinocular, acoplado com uma câmera fotográfica Vision Plus L2000C. A distribuição do tamanho médio das microesferas foi determinada a partir desta análise.

3.3 – Interações das vitaminas com as microesferas de quitosana

As interações das microesferas com as vitaminas foram realizadas em batelada, por meio de uma suspensão de 100 mg de microesferas em 0,05 dm³ de uma solução etanólica de 2,0 g dm⁻³ de ácido retinóico ou α -tocoferol. A mistura reacional foi mantida por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, as microesferas foram isoladas, secas sob

vácuo e a quantidade adsorvida foi determinada no sobrenadante, pela diferença entre a quantidade do sobrenadante e a solução inicial.

3.3.1 – Quantificação das vitaminas adsorvidas

A estimativa da quantidade de α -tocoferol adsorvida pelas microesferas foi determinada em um sistema de cromatografia líquida HPLC-UV 920 (Varian). Para quantificação do α -tocoferol foi utilizada uma coluna analítica Pursuit 5 C₁₈ (diâmetro de partícula: 5 μ m; dimensões da coluna, 250 mm \times 4,6 mm, Varian). O comprimento de onda de detecção foi de 229 nm. A temperatura da coluna foi ajustada em 30°C. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/acetonitrila (75:25, v/v), a um fluxo de 1,0 cm³ min⁻¹. A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de filtro de 0,2 μ m de tamanho de poro (PEAD, Millipore) e desgaseificada por ultrassom após misturados os solventes, sem posterior ajuste de pH.

A estimativa da quantidade de ácido retinóico adsorvida pelas microesferas foi também determinada injeção de alíquota de 100 μ L em um sistema de cromatografia líquida HPLC-UV 920 (Varian). Para quantificação do ácido foi utilizada uma coluna analítica Pursuit 5 C₁₈ (diâmetro de partícula: 5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm, Varian). O comprimento de onda de detecção foi de 222 nm. A temperatura da coluna foi ajustada em 30 °C. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/hexano (75:25, v/v), a um fluxo de 0,6 cm³ min⁻¹. A fase móvel foi filtrada sobre uma membrana de filtro de 0,2 μ m de tamanho de poro (PEAD, Millipore) e desgaseificada por ultrassom depois de misturados os solventes.

A etapa de identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais de α -tocoferol e ácido retinóico.

Os processos de quantificação de α -tocoferol e ácido retinóico presentes no sobrenadante foram realizados por meio de curvas de calibração externa obtidas para cada padrão comercial das vitaminas. As curvas de calibração foram montadas a partir da relação da área do pico de cada padrão versus a sua concentração.

3.4 – Espectroscopia de infravermelho

A escolha da espectroscopia na região de infravermelho para caracterizações de biomateriais justifica-se por ser um método amplamente difundido e citado por vários autores,⁴⁵⁻⁵⁴ além de possibilitar o cálculo do grau de desacetilação médio da quitosana.⁵² Para esta análise, preparou-se uma pastilha de brometo de potássio (KBr) com 1,0 mg de microesferas de quitosana, previamente secas a 60 °C e pressão reduzida por 12 horas. O espectro foi analisado na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um equipamento de infravermelho com transformada de Fourier (Bomem MB Series).

3.4.1 – Interações das microesferas-vitaminas por FTIR

Para o estudo da interação por meio da espectroscopia no infravermelho, 100 mg de microesferas de quitosana foram suspensas em 0,05 dm^3 de uma solução etanólica 2,0 g dm^{-3} de ácido retinóico ou α -

tocoferol. A mistura reacional foi mantida por 24 h em temperatura ambiente, e o etanol foi removido sob vácuo a 50°C, durante 3 h. Os espectros de infravermelho das microesferas em contato com as vitaminas foram obtidos em um espectrofotômetro JASCO 4100, com resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 250 varreduras, nas condições já descritas no início desta seção.

3.5 – Termoquímica das interações entre as microesferas e as vitaminas

A calorimetria é uma técnica capaz de detectar as trocas de energia de processos químicos, físicos e biológicos com o ambiente. Esta técnica é baseada nos efeitos térmicos liberados e/ou adsorvidos por um dado sistema, que são proporcionais à quantidade de matéria envolvida.

Na titulação calorimétrica, o procedimento experimental consiste na adição de volumes de solução titulante, previamente termostatizada, ao titulado, sempre sob agitação conveniente. O efeito térmico total de interação é então determinado pelo somatório dos efeitos térmicos obtidos durante a titulação. A cada adição, um efeito térmico (ΣQ) é registrado pelo sistema de detecção do instrumento, que transforma num sinal eletrônico do equipamento de acordo com um gráfico de ΔT versus tempo.

Os parâmetros termodinâmicos das interações entre as vitaminas e as microesferas foram determinados por meio da titulação calorimétrica em um calorímetro adiabático PAR 6755. Em um ensaio típico, 500 mg de

microesferas foram suspensas em $0,1 \text{ dm}^3$ de água, equilibradas em $25 \pm 0,002 \text{ }^\circ\text{C}$ (controle termostático), e tituladas com uma solução etanólica $2,0 \text{ g dm}^{-3}$ de ácido retinóico ou α -tocoferol. A partir deste ensaio obteve-se a variável denominada calor de titulação (Q_{tit}).

Porém, para determinar o calor correto de interação é necessário realizar um ciclo termodinâmico para evitar a soma de valores de calor de diluição (Q_{dil}) e/ou suspensão das esferas (Q_{sol}). Assim, para se conhecer o calor da interação das microesferas com as vitaminas, três análises calorimétricas distintas foram realizadas:

- (a) titulação da suspensão das microesferas com o solvente (Q_{sol});
- (b) titulação da vitamina com o solvente (Q_{dil});
- (c) titulação da solução das microesferas solvatadas com as vitaminas diluídas no solvente (Q_{tit}).

Os valores das variações de calor de solvatação (ΔQ_{sol}) e calor de diluição (ΔQ_{dil}) foram determinados pelo calorímetro no processo de quebra de ampola (Figura 13), no qual a quitosana, ou a vitamina, é colocada em um recipiente que é aberto na solução de interesse durante agitação, onde é determinada a quantidade de calor relacionada à solvatação (etanol) da quitosana e à diluição das vitaminas por meio de sucessivas quebras de ampola.

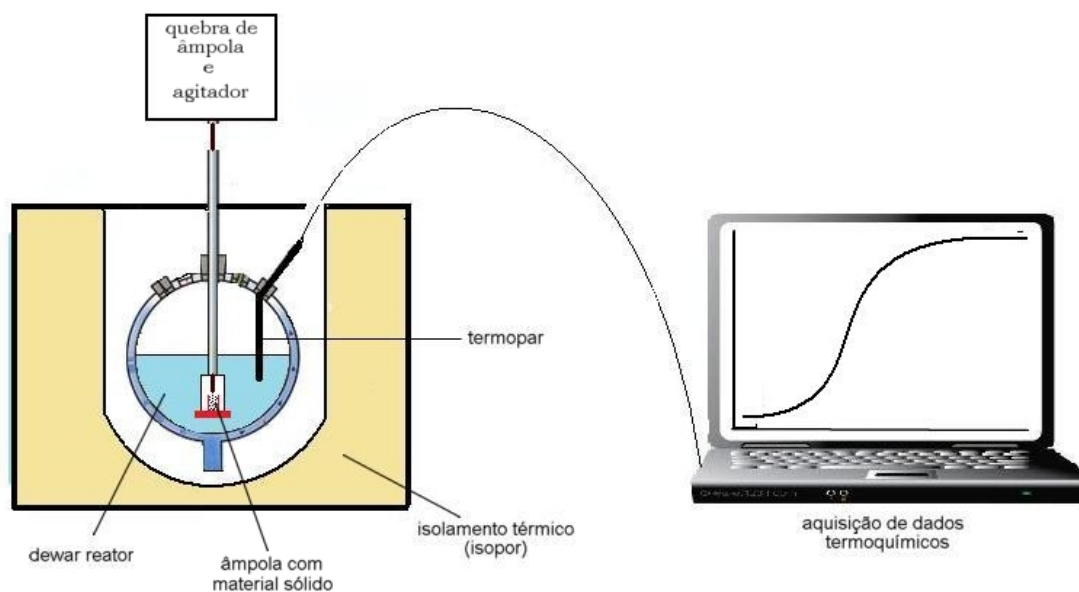


Figura 13. Calorímetro PAAR 6755 com sistema de quebra de ampola.

Já a quitosana suspensa em etanol foi titulada pela solução de vitamina diluída em etanol, de acordo com o esquema da Figura 14, a fim de se calcular a variável (Q_{tit}).

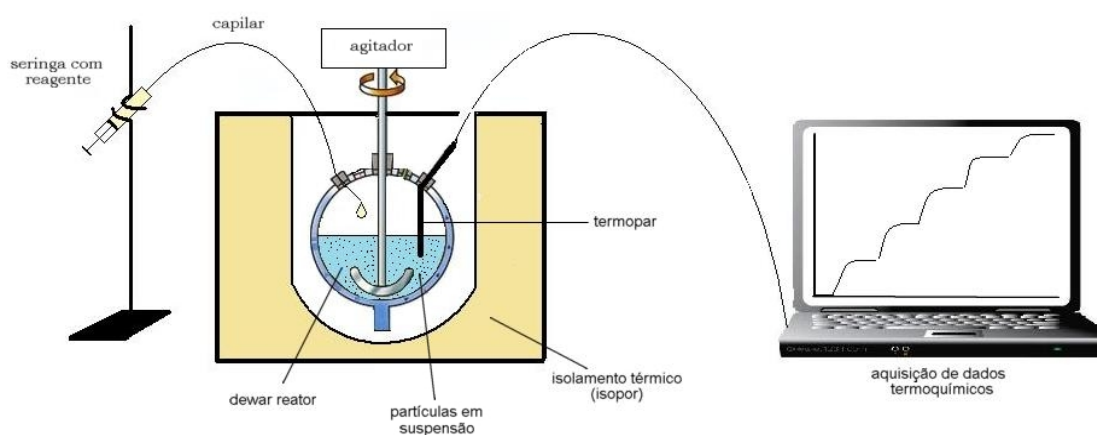


Figura 14. Calorímetro PAAR 6755 com sistema de titulação.

3.6 – Sistemas de liberação controlada

3.6.1 – Liberação de α -tocoferol em fluido gastrointestinal mimetizado

As microesferas de quitosana (500 mg) modificadas com α -tocoferol foram eluídas com fluidos gastrointestinais (GI) simulados, baseados nas seguintes soluções: HCl, 0,04 mol dm⁻³, pH 1,2; tampão de fosfato, 0,06 mol dm⁻³, pH 6,8; e tampão de fosfato, 0,13 mol dm⁻³, pH 7,4. Em todas as soluções descritas foi adicionada uma solução de NaCl (0,9%, m/m), para reproduzir as condições isotônicas dos fluidos corporais.⁶⁴

As soluções foram utilizadas em sequência, com as microesferas em imersão. As soluções em pH 1,2 e pH 6,8 durante 2 h cada; a solução em pH 7,4 até o final do experimento (12 h). Após o teste de liberação, a vitamina residual foi completamente removida da amostra por meio da extração com 10 cm³ de metanol, a fim de determinar a quantidade total de vitamina liberada e extraída a partir do conteúdo inicial desta nas microesferas.

As quantidades de α -tocoferol liberadas pelas microesferas nas faixas de pH citadas foram determinadas retirando-se alíquotas de 100 μ L em triplicata, com posterior injeção em um sistema de cromatografia líquida HPLC-UV 920 (Varian). Para quantificação do α -tocoferol foi utilizada uma coluna analítica Pursuit 5 C₁₈ (diâmetro de partícula: 5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm, Varian). O comprimento de onda de detecção foi de 229 nm. A temperatura da coluna foi ajustada em 30°C. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/acetonitrila (75:25, v/v), a um fluxo de 1,0 cm³ min⁻¹. A

fase móvel foi filtrada sobre uma membrana de filtro de 0,2 µm de tamanho de poro (PEAD, Millipore) e desgaseificada por ultrassom após misturados os solventes, sem ajuste de pH.

A etapa de identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão comercial de α -tocoferol. As curvas de calibração foram montadas por meio da relação da área do pico de cada padrão versus a sua concentração.

3.6.2 – Liberações controladas de α -tocoferol e retinil palmitato em cremes hidratantes

Para os ensaios de liberação controlada via administração tópica, foram escolhidas três marcas de cremes hidratantes comerciais do mercado nacional. Para isso, os cremes foram fortificados com 1% (m:m) de α -tocoferol ou retinil palmitato, ou com microesferas contendo a mesma proporção dessas vitaminas. As homogeneizações com as vitaminas e com as microesferas modificadas foram realizadas em agitadores mecânicos. De acordo com os fabricantes, as amostras apresentam as seguintes composições (*ipsis litteris*):

Creme I – D

Água, óleo mineral, glicerina, cetearret - 6, álcool estearílico, propileno glicol, carbômero, fenoxietanol, estearato de glicerila, perfume, metilparabeno, hidróxido de potássio, propilparabeno, farnesol, EDTA

dissódico, laurato de glicerila, alfa-isometil ionona, butilfenilmetilpropional, citronelol, limoneno, linalol.

Creme II – M

Água, hidroxietil, uréia, parafina líquida, propileno glicol, estearato de glicerila, ácido esteárico, PEG-2 estearato, octenilsuccinato de alumínio, poliacrilato de sódio, perfume, óleo de amêndoa doce, trietanolamina, extrato de Aloebarbadensis, metilparabeno, triclosan, propilparabeno.

Creme III – J

Água, óleo mineral, glicerina, carbômero, cetear-6, álcool estearílico, fragrância, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno, citrato de sódio, hidróxido de sódio, monooleato de glicerila e esqualano.

3.6.2.1 – Preparação das membranas para liberação controlada em cremes

Nos experimentos realizados para determinação das cinéticas de permeabilidade cutâneas, foram utilizadas peles de orelhas de porcos domésticos adultos (*Sus domesticus*) (Matadouro - Águas Lindas, GO), em função da menor densidade dos folículos pilosos nesta área, que é desprovida de pelos.

As peles (24 h *post mortem*) foram mantidas congeladas a -20°C e descongeladas a temperatura ambiente no momento do experimento. Com

auxílio de um bisturi, a parte externa da pele foi removida da cartilagem da orelha e com o auxílio de uma pinça retiraram-se restos de vasos sangüíneos e tecidos, para uma melhor homogeneidade na espessura da pele. A espessura média das membranas foi estabelecida em 2,0 mm e a área da membrana foi de 2,0 cm². As peles de orelha de porco foram mantidas imersas em tampão de fosfato, pH 7,4 (o mesmo da pele humana) por 24 h. As Figuras 15 a 18 mostram a seqüência de preparo.

As orelhas foram removidas da face do porco (Figura 15):



Figura 15. Corte da orelha do porco da sua face.

A orelha do porco, da qual foram removidas as membranas para o estudo de difusão das vitaminas, pode ser observada em maior detalhe na Figura 16.



Figura 16. Imagem da orelha de porco.

A membrana foi removida da orelha de porco com o auxílio de um bisturi, conforme Figura 17.



Figura 17. Imagem da remoção da membrana da orelha de porco.

Uma vez removidas, as membranas (Figura 18) foram aplicadas nas células de difusão Franz-type:

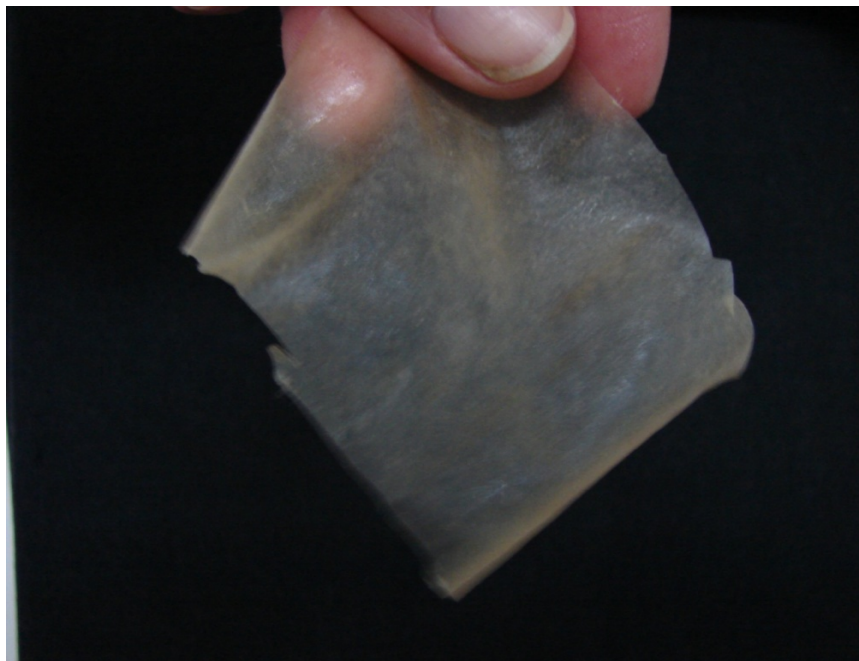


Figura 18. Imagem da membrana usada para os experimentos de difusão.

3.6.2.2 – Permeação em células de difusão Franz-type

Os estudos de permeação das vitaminas e das vitaminas imobilizadas em microesferas de quitosana foram realizados retirando-se alíquotas em triplicata de uma célula de difusão Franz-type de 25 cm³ de volume total, que continha os três cremes fortificados a 37 °C. Células de difusão Franz-type são aparatos relativamente conhecidos em estudos de difusão e têm sido amplamente utilizadas quando se pretende investigar a permeação de determinada substância. Esta célula deve permitir a agitação eficaz do fluido receptor (normalmente por meio de agitação magnética), o

controle da temperatura e um volume tão reduzido quanto possível. A sua estrutura corresponde ao esquema que está representado na Figura 19.

A partir dos dados obtidos, após quantificação da substância na porta coletora da célula, em determinados intervalos de tempo, é possível obter o perfil cinético de permeação da substância.

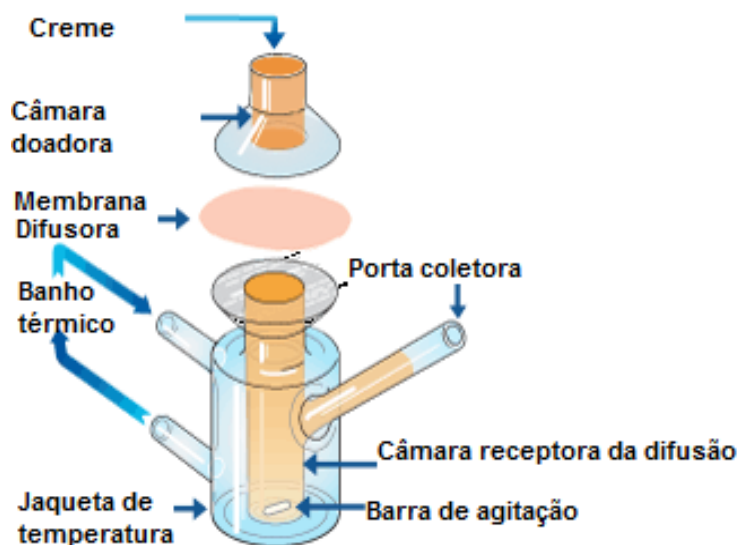


Figura 19. Célula de difusão Franz-type.

Em um ensaio típico, 10 cm^3 do creme foram colocados na câmara de doadora. A célula de difusão Franz-type foi mantida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e 12 cm^3 de tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ em pH 7,4 foram usados como solução receptora. Alíquotas de $50 \text{ }\mu\text{L}$ foram recolhidas em triplicata em intervalo de tempo de aproximadamente 10 min até o final do experimento (360 min), com posterior injeção em um sistema de cromatografia líquida HPLC-UV 920 (Varian).

Para quantificação do α -tocoferol foi utilizada uma coluna analítica Pursuit 5 C₁₈ (diâmetro de partícula: 5 μ m, 250 mm \times 4,6 mm, Varian). O comprimento de onda de detecção foi de 229 nm. A temperatura da coluna foi ajustada em 30°C. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/acetonitrila (75:25, v/v), a um fluxo de 1,0 cm³ min⁻¹. A fase móvel foi filtrada sobre uma membrana de filtro de 0,2 μ m de tamanho de poro (PEAD, Millipore) e desgaseificada por ultrassom após misturados os solventes, sem ajuste de pH.

Para quantificação do retinil palmitato, o equipamento empregado foi o mesmo já descrito, com modificações relativas ao comprimento de onda de detecção, que foi de 326 nm. A temperatura da coluna foi ajustada em 30 °C. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol/hexano (70:30, v/v), a um fluxo de 0,6 cm³ min⁻¹. A fase móvel foi filtrada sobre uma membrana de filtro de 0,2 μ m de tamanho de poro (PEAD, Millipore) e desgaseificada por ultrassom depois de misturados os solventes.

A etapa de identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais de α -tocoferol e retinil palmitato.

O processo de quantificação de α -tocoferol e retinil palmitato presentes nas amostras foi realizado por meio de curvas de calibração externa obtidas para cada padrão comercial das vitaminas. As curvas de calibração foram montadas por meio da relação da área do pico de cada padrão versus a sua concentração.

4.0 – Resultados e Discussão

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Caracterizações

4.1.1 – Síntese das microesferas de quitosana

A solução de quitosana 10% (m/v), preparada com 10% (v/v) de ácido acético, apresentou uma alta viscosidade e coloração castanha escura. Com ausência de um fluxo de ar pelo sistema de gotejamento construído, Figura 20, a solução de quitosana, ao chegar à ponta da agulha formava gotas com aproximadamente 3,0 mm de diâmetro. Assim, para produzir um diâmetro de gota de aproximadamente 1,0 mm encontrou-se como um fluxo de ar ideal $5,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.⁴⁸

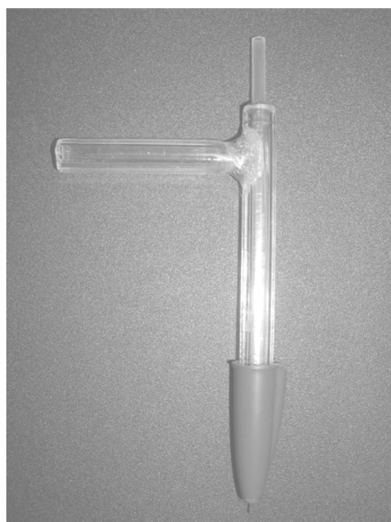


Figura 20. Imagem do gotejador construído.

Ao entrar em contato com a solução de hidróxido de sódio, a gota de solução de quitosana gelificou-se em alguns segundos. Estas esferas

gelificadas foram mantidas na solução coagulante por 12 h, para assegurar sua completa formação e a total neutralização do ácido.⁵¹

4.1.2 – Espectroscopia de infravermelho das microesferas de quitosana

O espectro de FTIR da quitosana (Figura 21) apresenta algumas bandas típicas, as quais são: uma banda larga característica entre 3500 e 2900 cm^{-1} relacionada ao modos de vibração νNH_2 , $\nu\text{O-H}$ e à água adsorvida; um pico e um ombro em 2915 e 2879 cm^{-1} , respectivamente, os quais estão relacionados aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação $\nu\text{C-H}$ (sp^3); uma banda intensa em 1655 cm^{-1} , relacionada tanto ao estiramento da ligação ($\nu\text{C=O}$), presente em grupos acetoamido remanescentes da estrutura da quitina, como ao estiramento de uma ligação imina ($\text{RN}=\text{CR}_2$) da reação de reticulação. Os picos situados em 1411, 1319 e 1263 cm^{-1} são relacionados às vibrações δCH , $\text{CH}_{2\text{balanço}}$, $\text{CH}_{2\text{torção}}$. Os picos de 1144, 1067, 1024 e 898 são relacionados às vibrações $\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-OH}$, $\nu\text{C-NH}_2$, $\nu(-\text{C-O-C-})_{\text{anel glicosídico}}$ e os picos em 664 e 634 são relacionados ao modo $\text{NH}_{2\text{balanço}}$ dos estiramentos de NH_2 de 1700 a 1300 cm^{-1} .^{52,59}

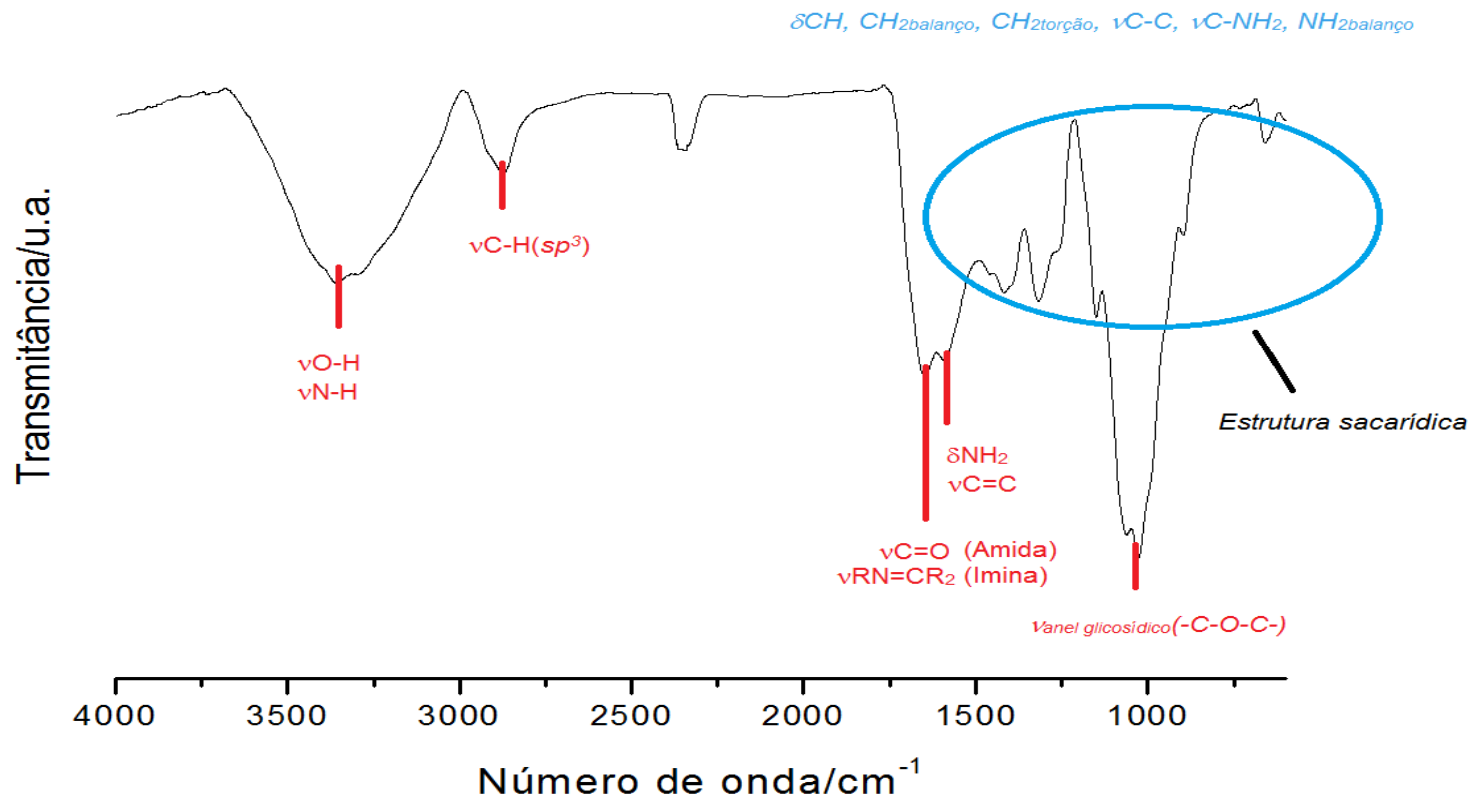


Figura 21. Espectro de FTIR da quitosana pura.

A formação da ligação imina pode ser mais bem compreendida na Figura 22. Esta ocorre como resultado da modificação de alguns grupos amino da quitosana durante a reação de reticulação, de acordo com a literatura canônica.⁶³

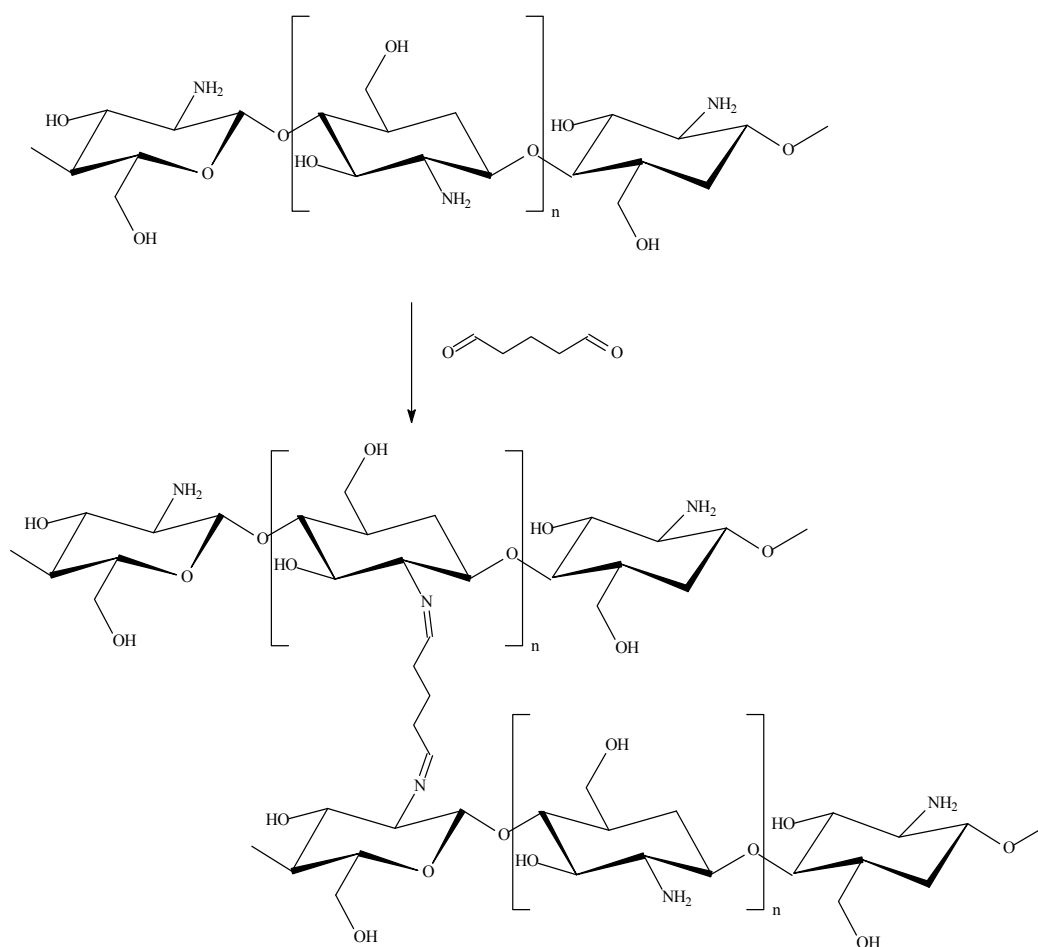


Figura 22. Reação de formação da ligação imina e bloqueio de grupos amino reativos na quitosana.

A partir dos espectros de FTIR da quitosana, o grau de desacetilação do material pôde ser determinado. Este dado é muito importante para

entender corretamente as interações da quitosana, visto que ele permite determinar a porcentagem de grupos amino reativos.

O cálculo do grau de desacetilação da quitosana é baseado no método da relação das absorvâncias em 1655 cm^{-1} , relacionada aos estiramentos da amida; e 3450 cm^{-1} , relacionado os estiramentos O-H, que permanecem praticamente constantes tanto na quitina quanto na quitosana. Assim, o grau de desacetilação da quitosana pôde ser determinado pela Equação 4:^{52,59}

$$\overline{GD} = 100 - \left(\frac{\frac{A_{1655}}{A_{3450}}}{1,33} \cdot 100 \right) \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde, A_{1655} e A_{3450} representam os valores de absorvância em 1655 e 3450 cm^{-1} , respectivamente. O coeficiente 1,33 é um número empírico de referência, obtido da razão A_{1655}/A_{3450} para uma quitina completamente acetilada ($GD = 0\%$).⁶⁰ As intensidades de absorção no IR foram inseridas na Equação 4, o que forneceu o valor de GD médio de 79,04%, em boa concordância com a literatura.^{61,62}

4.1.3 – Microscopia óptica das microesferas de quitosana.

A Figura 23 mostra uma imagem típica de microscopia óptica das microesferas de quitosana e a distribuição gaussiana do diâmetro médio das partículas. Na imagem, é possível visualizar uma morfologia globular do

material, com tamanho de partícula com diâmetro médio de $128 \pm 18 \mu\text{m}$. A microesfera adquire esta forma em função do impacto da gota sobre a superfície da solução coagulante.

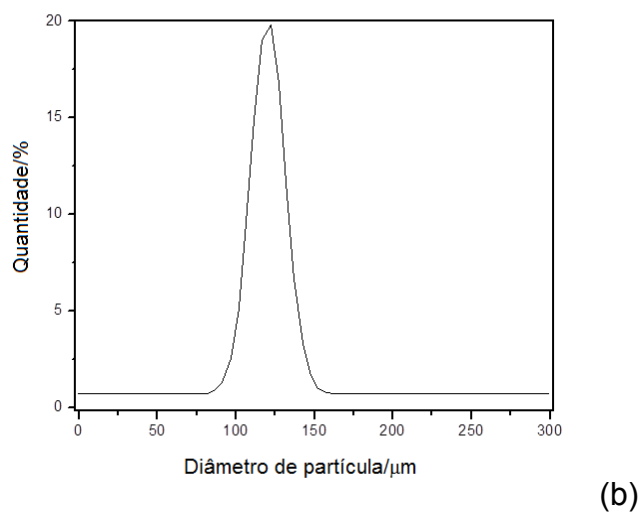
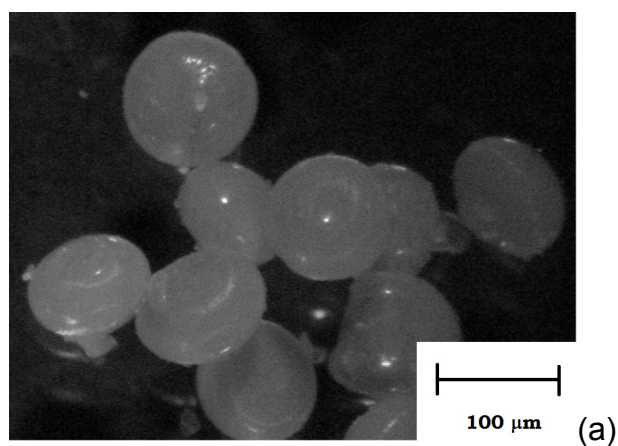


Figura 23. (a) Imagem de microscopia óptica e (b) distribuição do tamanho médio das microesferas de quitosana.

4.2. – Interações das vitaminas com as microesferas de quitosana

4.2.1 – Estudos de FTIR

Os espectros de FTIR das microesferas, das vitaminas e das microesferas-vitaminas estão dispostos na Figura 24. As principais atribuições nos espectros estão relacionadas a grupos da quitosana, Figura 24 (a), tais como: uma banda larga entre 3400 e 3200 cm^{-1} , associada aos modos de estiramentos O-H e N-H; dois picos em 2950 e 2870 cm^{-1} , associados aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H do carbono sp^3 ; uma banda intensa em 1655 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação C=O presente no grupo amida da quitina e ao estiramento de uma ligação imina ($\text{RN}=\text{CR}_2$) da reação de reticulação; um pico em 1562 cm^{-1} , que está associado a uma ligação etilênica (C=C); um pico em 1420 cm^{-1} , atribuído a uma deformação angular do grupo NH_2 ; um ombro em 1220 cm^{-1} , relacionado modo de estiramento C-OH; e vibrações entre 1153-890 cm^{-1} , relativas a estrutura polissacarídica da quitosana.

O espectro do tocoferol puro, Figura 24 (d), mostra seus modos de vibração característicos: uma banda larga de baixa intensidade em 3500 cm^{-1} , relacionada ao estiramento O-H, picos em 3000 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C-H sp^3 , e a região entre 1500 e 1100 cm^{-1} , característica do anel substituído.

Para o caso do espectro do ácido retinóico, Figura 24 (e), os principais modos de vibração observados correspondem a estiramentos C-H olefínicos (acima de 3000 cm^{-1}), alifáticos (2800-2990 cm^{-1}), C=C (etilênicos)

(1460 cm^{-1}) e C=O (1750 cm^{-1}), além de uma banda larga de baixa intensidade em 3500 cm^{-1} , relacionada ao estiramento O-H do ácido.

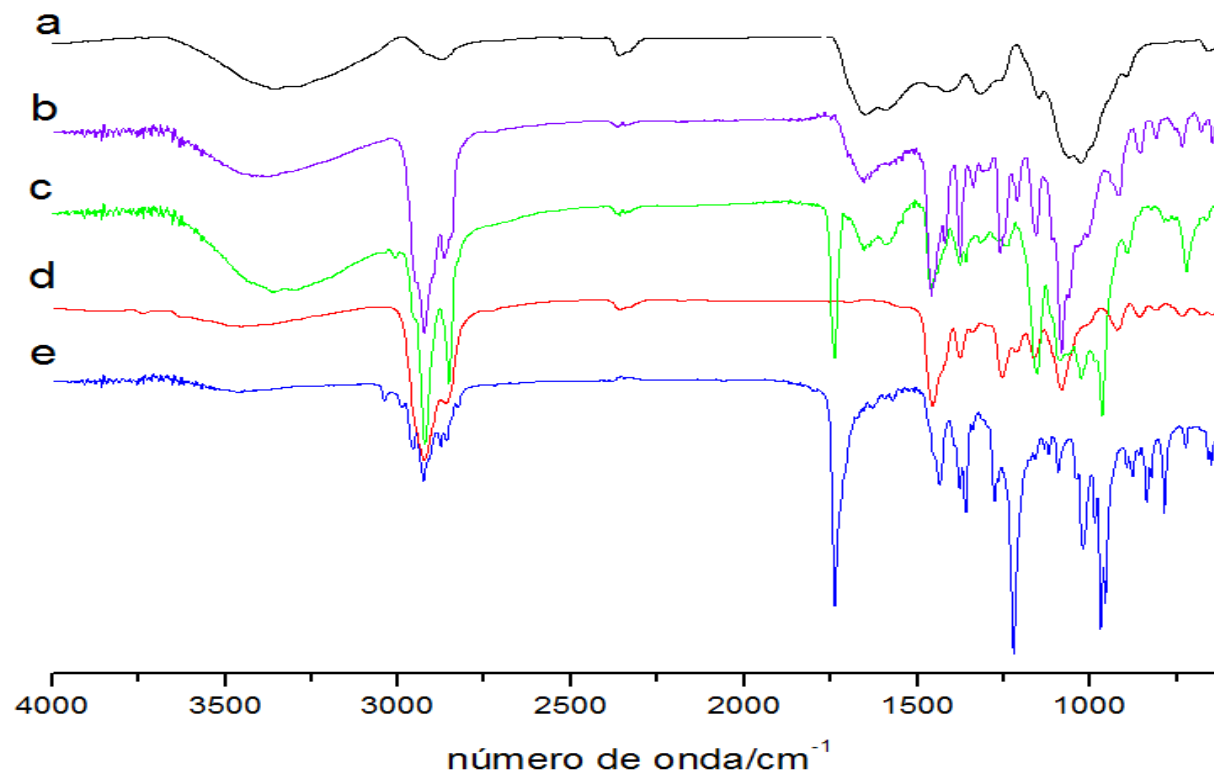


Figura 24. Espectros de infravermelho das microesferas de quitosana (a), quitosana-tocoferol (b), quitosana-ácido retinóico (c), tocoferol (d), ácido retinóico (e).

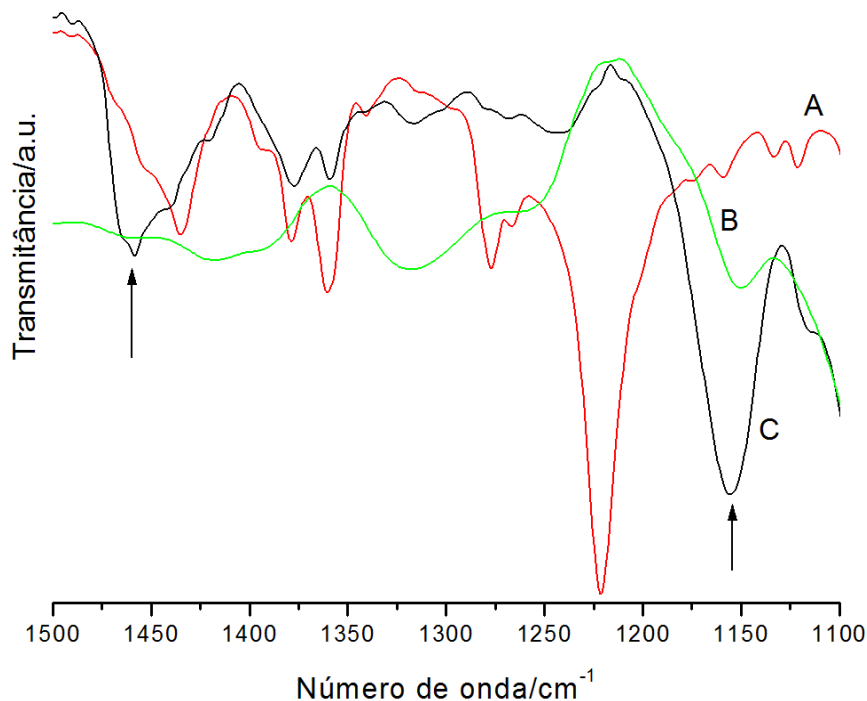


Figura 25. Seção correspondente dos espectros contendo as bandas de interação entre quitosana e ácido retinóico [ácido retinóico (A), quitosana (B) e quitosana-ácido retinóico (C)].

Após a interação entre a quitosana e o ácido retinóico, Figura 24 (c) e Figura 25 (c), é possível observar o deslocamento do pico N-H em 1417 cm^{-1} para 1458 cm^{-1} . Este fato sugere a formação de íon amônio pela interação entre os grupos OH do ácido retinóico e NH_2 da quitosana⁵⁹. Também é possível observar nessa interação que o pico em 1220 cm^{-1} da vibração da ligação C-OH no espectro do ácido retinóico foi deslocado para 1155 cm^{-1} devido a interação com quitosana, o que corrobora a idéia da formação de um aduto de Lewis, entre a hidroxila do ácido e o grupo amina do biopolímero, como proposto na Figura 26.

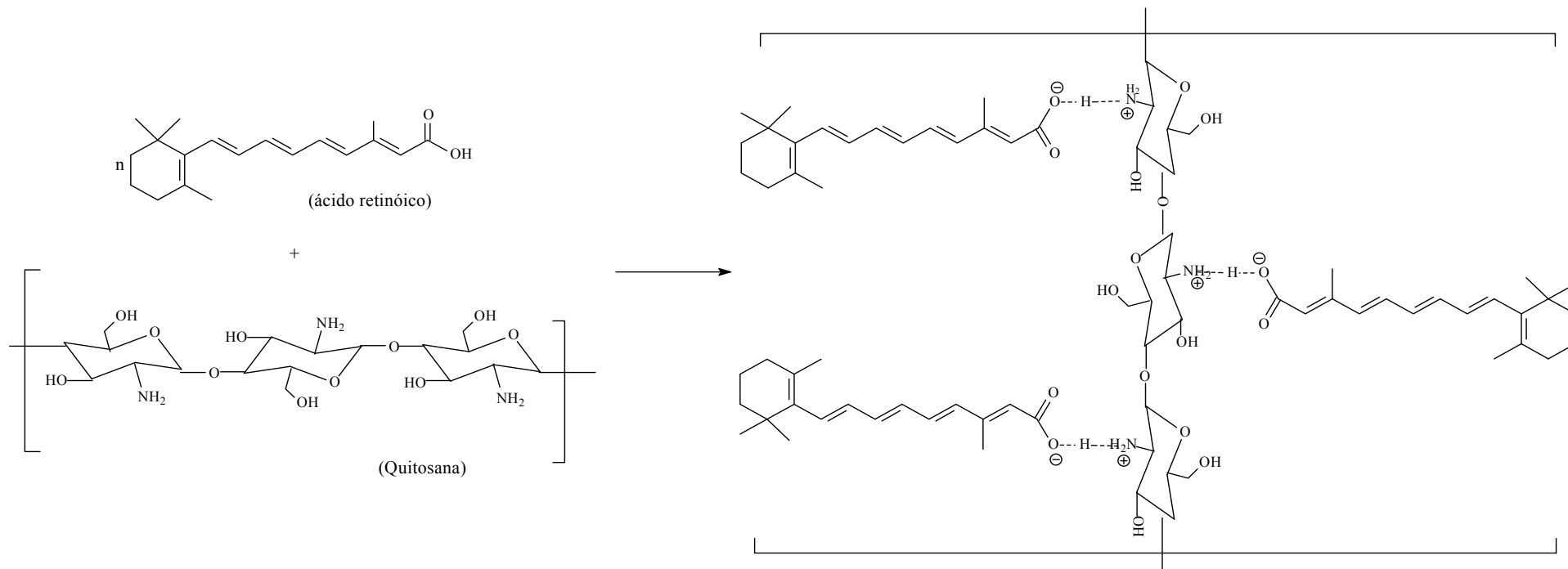


Figura 26. Esquema da interação entre ácido retinóico e microesferas de quitosana.

Já a interação do α -tocoferol com a quitosana pode ser observada em detalhe na Figura 27. Um pico marcado é o pico deslocado do tocoferol de 1210 para 1225 cm^{-1} , relacionado ao aumento da força da interação C-O do C-O-H do α -tocoferol, o que representa uma diminuição na energia da ligação O-H fenólica do α -tocoferol. Ao contrário da natureza da ligação entre a quitosana e o ácido retinóico, onde o grupo carboxila estabiliza a formação de um par ácido-base, o hidrogênio do grupo fenol não é transferido totalmente para o grupo amino, ainda que ele seja o mais ácido da molécula. Isso significa que o α -tocoferol deve se ligar às aminas da quitosana por ligações de hidrogênio, como representado na Figura 28.

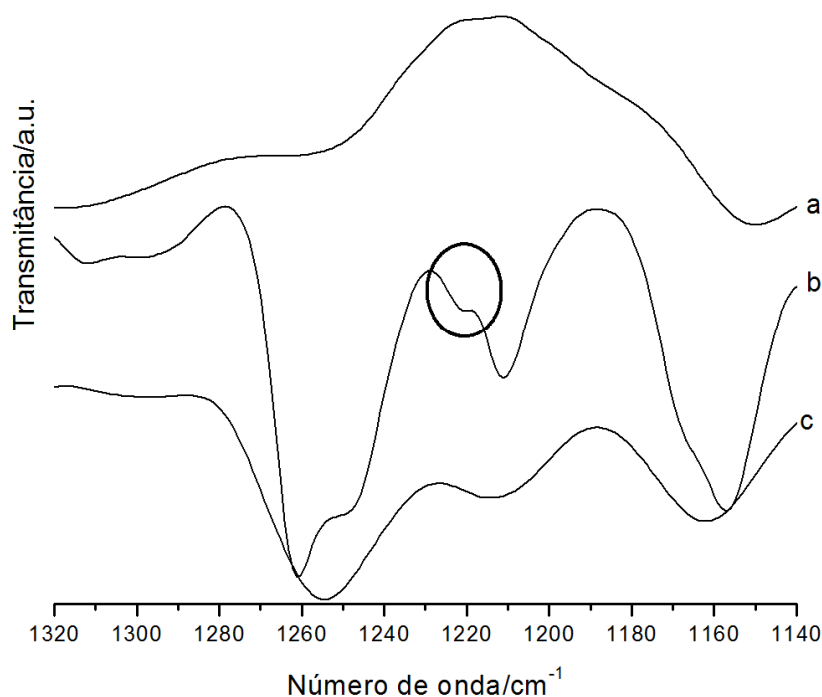


Figura 27. Ampliação do espectro de FTIR, mostrando a quitosana (a), a interação microesferas de quitosana- α -tocoferol (b) e o espectro de α -tocoferol (c).

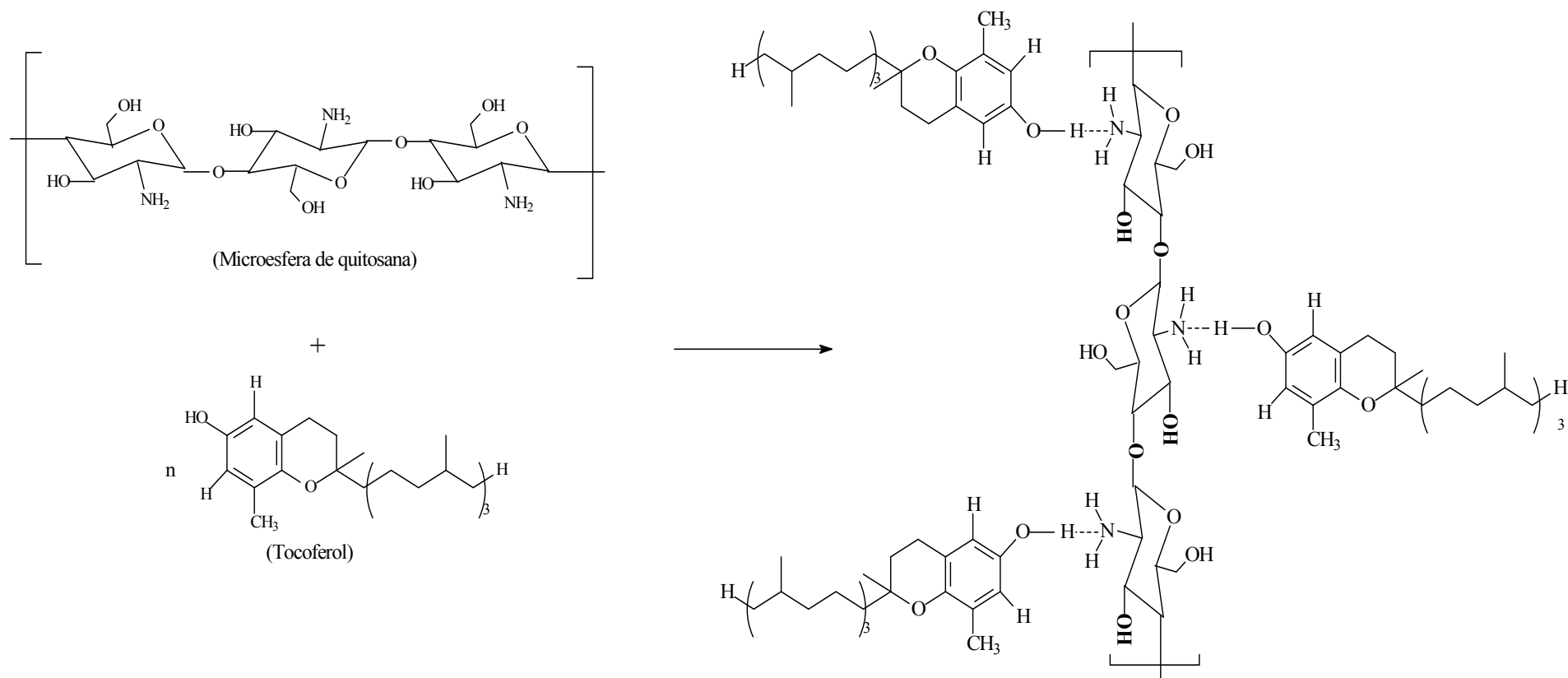


Figura 28. Representação esquemática da interação das microesferas de quitosana com α -tocoferol.

4.2.2 – Quantificação de α -tocoferol e ácido retinóico ancorados nas microesferas de quitosana

As quantidades de α -tocoferol e ácido retinóico ancorados nas microesferas após 24 h reacionais foram determinadas por HPLC, e os cromatogramas das corridas estão dispostos na Figura 29.

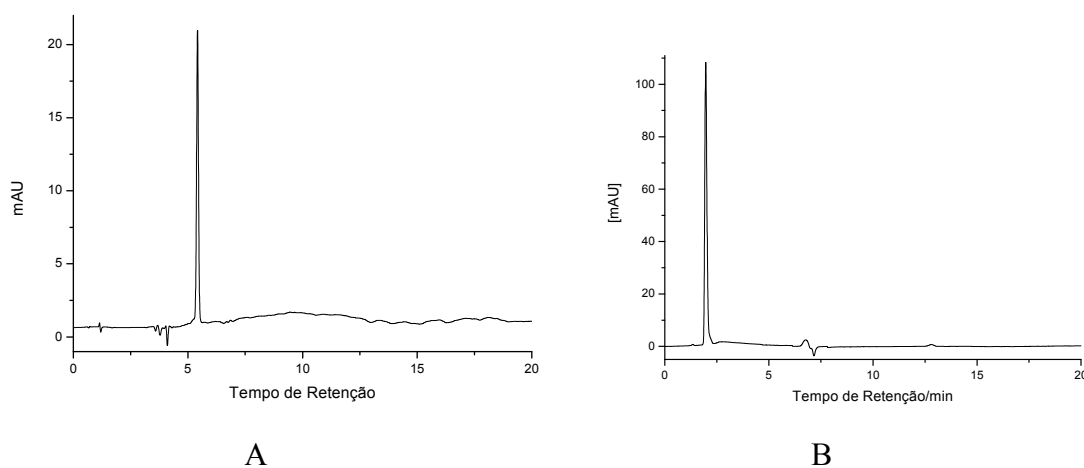


Figura 29. Cromatogramas do α -tocoferol (A) e ácido retinóico (B).

Os resultados obtidos indicaram que $19,3 \pm 0,5$ e $13,4 \pm 0,4$ mg de ácido retinóico e α -tocoferol foram ancorados em um grama de microesferas de quitosana. Esses valores corroboram o que foi postulado nas interpretações dos espectros de FTIR, que a interação entre as microesferas de quitosana ($pK_a = 6,5$) e o ácido retinóico é mais forte do que com o α -tocoferol, o que justifica a diferença na quantidade de vitamina adsorvida.

4.2.3 – Microscopias das interações microesferas-vitaminas.

Imagens de microscopia óptica foram obtidas para observar possíveis alterações na estrutura após a interação das microesferas com as vitaminas. Porém, a Figura 30 mostra claramente que as microesferas continuaram homogêneas e não sofreram alteração no diâmetro médio das partículas.

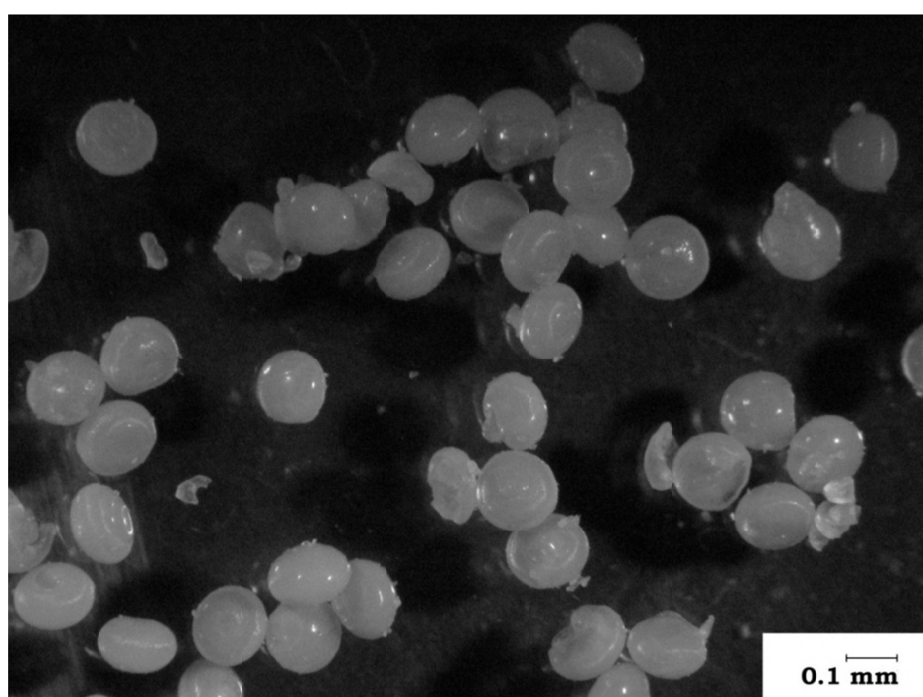


Figura 30. Imagem de microscópio ótico das microesferas de quitosana após o ancoramento com α -tocoferol.

Em um estudo anterior a este trabalho, foram realizadas medidas de área superficial dos materiais desenvolvidos, aplicando-se a equação de BET às isotermas de adsorção de N_2 , o que forneceu os valores de 4,2; 14,1 e $9,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para a quitosana pura, as microesferas de quitosana sem reticulação e as microesferas reticuladas, respectivamente.⁶⁶ Esse fato

evidencia que a transformação da quitosana de pó em microesferas aumenta significativamente a área superficial do material, por meio de uma organização morfológica do biopolímero, o que confere uma maior qualidade adsorvente às microesferas, quando comparadas com o material de partida.

Por outro lado, a reticulação causa uma redução da área superficial por causa da introdução da estrutura do glutaraldeído entre as cadeias poliméricas lineares da quitosana, o que além de reduzir a área superficial, diminui a capacidade de incorporação das vitaminas no núcleo das microesferas. Esse fato sustenta a hipótese de adsorção das vitaminas apenas sobre a superfície do material.

4.2.4 – Interações termodinâmicas das microesferas-vitaminas.

As interações das microesferas com cada uma das vitaminas em meio aquoso foi acompanhada por isotermas de sorção, por meio das quais o número de mols adsorvidos (N_f) por grama de material sólido foi obtido. Este valor foi calculado a partir do número inicial de mols de vitaminas (n_i), e do número de mols em condição de equilíbrio (n_s) para uma dada massa de adsorvente (m), em gramas, de acordo com a Equação 5:

$$N_f = \frac{n_i - n_s}{m} \quad \text{Eq. (5)}$$

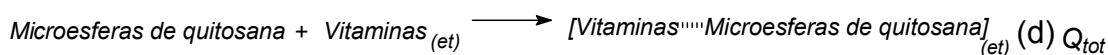
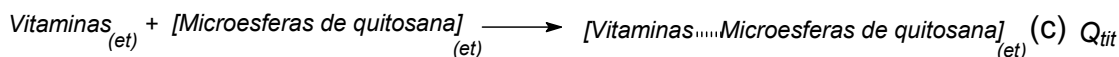
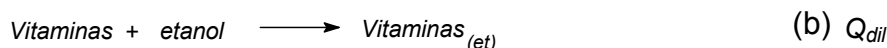
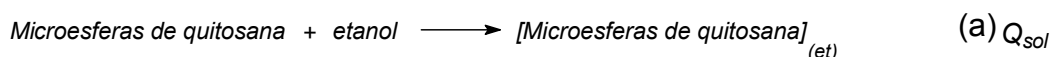
Os dados experimentais foram, então, aplicados à equação geral para o modelo modificado de Langmuir:

$$\frac{C_s}{N_f} = \frac{C_s}{N_s} + \frac{1}{N_s \cdot K} \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde C_s é a concentração da solução de vitamina em equilíbrio (mol dm^{-3}), N_f é a quantidade de vitamina adsorvida na quitosana (mol g^{-1}) e N_s é a quantidade máxima de vitamina adsorvida por grama de microesferas (mol g^{-1}), respectivamente, e K é a constante de equilíbrio ($\text{g mol}^{-1} \text{dm}^{-3}$).

Todos os estudos de interação foram baseados tomando-se as formas linearizadas das isotermas de sorção, pois, a partir da construção de um gráfico de C_s/N_f como uma função de C_s .⁵⁹

O ciclo termodinâmico completo, e a reação química global das interações vitaminas-microesferas pode ser resumido a seguir:



O que resulta na Equação 7:

$$\Sigma Q_{tot} = \Sigma Q_{tit} + \Delta Q_{sol} - \Delta Q_{dil} \quad \text{Eq. (7)}$$

Sendo Q_{tot} o efeito térmico resultante de todas as interações termodinâmicas; Q_{tit} o efeito térmico da titulação entre as microesferas de quitosana suspensas em etanol com as vitaminas diluídas em etanol; Q_{sol} o efeito térmico da suspensão das microesferas de quitosana em etanol, e Q_{dil} o efeito térmico da diluição das vitaminas em etanol.

Desta forma, é possível calcular o calor de interação entre as vitaminas e as microesferas de quitosana na interface sólido/líquido. Pode-se observar que existe um excesso de vitaminas no processo de diluição. Por essa razão, a titulação Q_{tit} é realizada até a obtenção dos mesmos dados obtidos em Q_{dil} , isto é, o processo é realizado até que o valor de cada cálculo individual seja: $Q_{tit} - Q_{dil} \approx 0$, minimizando qualquer efeito térmico gerado pelo excesso de vitaminas.

Como as quebras de ampola com a quitosana no solvente (Q_{sol}) possuíram efeito térmico próximo a zero, a Equação 7 pode ser reduzida a:

$$\Sigma Q_{tot} = \Sigma Q_{tit} - \Delta Q_{dil} \quad \text{Eq. (8)}$$

Os resultados obtidos nos estudos calorimétricos das interações de ácido retinóico e de α -tocoferol com as microesferas de quitosana, aplicados à Eq. 8 estão dispostos na Figura 31. Estes dados evidenciam e corroboram as interpretações dos espectros de FTIR, em consonância às medidas anteriores de área superficial e as quantidades de cada substância adsorvida, que apontam para uma interação termodinâmica mais favorável entre a quitosana e a vitamina A.

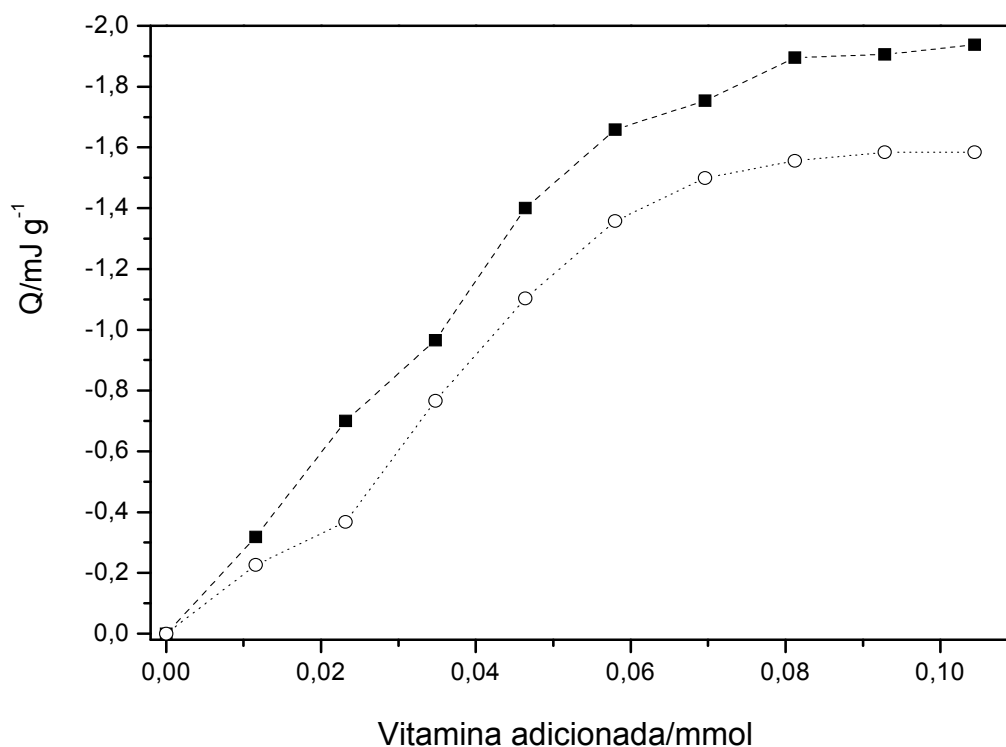


Figura 31. Valores de calor liberado pela interação do ácido retinóico (■) e α-tocoferol (○) com as microesferas de quitosana.

A partir dos dados de efeito térmico das interações vitaminas-microesferas, foi possível obter os parâmetros termoquímicos dos processos, por meio da relação entre os dados obtidos na adsorção e os dados de calorimetria. Para isso, os resultados calorimétricos são aplicados à equação modificada de Langmuir (Equação 9):

$$\frac{\Sigma X}{\Sigma \Delta_r H} = \frac{1}{(K-1)\Delta_{mono} H} + \frac{\Sigma X}{\Delta_{mono} H} \quad \text{Eq. (9)}$$

em que ΣX é a soma das frações molares de vitamina em solução após a adsorção, $\Sigma \Delta_r H$ é a integral da entalpia de adsorção ($J g^{-1}$), $\Delta_{mono} H$ é a

entalpia de adsorção para formação da monocamada, e K é constante de equilíbrio.

A entalpia integral ($\Delta_r H$) é calculada pelo quociente entre o efeito térmico integral resultante (em joule, J), e a massa (g) do adsorvente utilizado no processo, de acordo com a Equação 10:

$$\Delta_r H = \frac{\sum Q_{\text{int}}}{m} \quad \text{Eq. (10)}$$

Aplicando os valores da entalpia integral ($\Delta_r H$) à forma linear da equação modificada de Langmuir, é possível obter o valor de entalpia envolvida na formação da monocamada por unidade de massa do adsorvente, $\Delta_{\text{mono}} H$, por meio da determinação do coeficiente angular de um gráfico $\Sigma X / \Delta_r H$ versus ΣX .

A partir dos valores de $\Delta_{\text{mono}} H$ e da quantidade de substância, em mols, adsorvida na microesfera (N_s), determinados em um trabalho anterior,⁶⁶ a entalpia da reação pode ser obtida pela expressão:

$$\Delta H = \frac{\Delta_{\text{mono}} H}{N_s} \quad \text{Eq. (11)}$$

A energia de Gibbs pode ser obtida aplicando-se os dados da constante de equilíbrio presente na Tabela 4 à Equação 12:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad \text{Eq. (12)}$$

em que R é a constante universal de gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T é a temperatura em Kelvin.

A variação de entropia é calculada a partir da equação fundamental da termodinâmica:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. (13)}$$

Na impossibilidade de realização de estudos espectroscópicos e termodinâmicos que caracterizassem a natureza da interação entre as microesferas de quitosana e a vitamina A, sob a forma de retinil palmitato, levantaram-se dados na literatura que corroborassem sua aplicação nos testes de liberação controlada. Entretanto, parâmetros específicos como entalpia e entropia, tratando-se exclusivamente de retinil palmitato imobilizado em quitosana, não foram encontrados. Porém, investigações relativas à interação deste fármaco com outros tipos de matrizes, como fosfatidilcolina⁶⁷ e fulerenos⁶⁸ podem auxiliar a traçar paralelos entre os dados termodinâmicos obtidos para o ácido retinóico e seu respectivo éster.

Os valores de energia de Gibbs, entropia e entalpia para as interações vitaminas-matrizes estão dispostos na Tabela 4, bem como as quantidades de fármacos impregnados nas microesferas objetos deste estudo.

Tabela 4. Constante de equilíbrio, K e funções de estado, ΔH , ΔG e ΔS para as interações do ácido retinóico e tocoferol com as microesferas de quitosana.

Substância	Variável Termodinâmica				
	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$K/\text{g mol}^{-1} \text{dm}^{-3}$	$N_s/\text{mg g}^{-1}$
Ácido retinóico	$-18,59 \pm 0,34$	$-10,36 \pm 0,72$	$+19 \pm 2$	$65,4 \pm 4,6$	$19,3 \pm 0,5$
α -Tocoferol	$-15,17 \pm 0,50$	$-9,42 \pm 0,75$	$+26 \pm 2$	$44,7 \pm 5,1$	$13,4 \pm 0,4$
Retinil palmitato	$-13,80 \pm 0,79^a$	$-10,60 \pm 0,85^a$	$-10,74 \pm 2,55^a$	$70 \pm 2,0^a$	$17,56 \pm 0,5$
	$-32,47 \pm 0,78^b$	$-16,70 \pm 0,88^b$	$-52,88 \pm 2,58^b$	$850 \pm 6,0^b$	

^aValores obtidos da ref. 68 (complexo vitamina-fulereno C-[60]).

^bValores obtidos da ref. 68 (complexo vitamina-fulereno C-[70]).

Os resultados mostram valores muito coerentes entre as variáveis termodinâmicas para as interações das microesferas com o ácido retinóico e o tocoferol. As reações provaram ser espontâneas, entálpica e entropicamente favoráveis, apresentando energias da ordem de ligações secundárias, como interações fracas e ligações de hidrogênio, como fora proposto anteriormente. O fato das energias envolvidas na fisiosorção das moléculas à superfície da quitosana serem relativamente baixas é de suma importância para um dos objetivos deste trabalho, pois espera-se que o fármaco seja lábil o suficiente para que ocorra a liberação *in vivo*.

A comparação dos resultados com os valores da literatura referentes ao retinil palmitato suscitam que o ancoramento deste também atinja um estado energético mais baixo. Observa-se que para o caso do complexo envolvendo fulereno C-[60], os valores de energia de Gibbs e entalpia são próximos aos apresentados neste estudo para o ácido retinóico, assim como a constante de formação do complexo. Contudo, para o caso do sistema envolvendo o fulereno C-[70], esses valores são ligeiramente

superiores. Os autores do referido artigo⁶⁸ creditam as diferenças energéticas entre os dois sistemas às estequiometrias de complexação, dentre outros aspectos. A razão estequiométrica para o par retinil palmitato-C[60] encontrada no estudo foi de 1:2, enquanto que o sistema vitamina-C[70] teve sua razão estequiométrica determinada em 1:1. Outra característica relatada no trabalho é o pico de transferência de carga observado nos espectros de absorção para o complexo éster-C-[60] foi em 703 nm, ao passo que o pico utilizado para verificar possíveis variações na intensidade de absorção do fulereno C-[70] foi em 532 nm. Uma vez que a natureza do mecanismo de transferência de carga entre os fulerenos e o retinil palmitato (doador π) tende a ser a mesma, é possível associar que o pico observado em menor comprimento de onda (λ) representa, portanto, o sistema com a maior frequência de ligação, ou seja, o mais energeticamente estável (C-[70]), e conseqüentemente aquele com a maior constante de formação, como referenciado na Tabela 4.

Em uma primeira análise, poder-se-ia postular que a adsorção das vitaminas mostrassem valores negativos de variação de entropia. De maneira geral, os processos adsorptivos são acompanhados por um decréscimo nos valores de entropia, pois há redução dos graus de liberdade do adsorbato. Contudo, a interpretação da teoria geral é válida para o sistema adsorvente-adsorbato. Em um sistema em solução, há de se considerar que a perturbação nas vizinhanças do sistema (solvente) diminui o gradiente de potencial químico (μ), o que gera um ganho de entropia global ($S_{solv} > S_{ads}$). As diferenças dos valores de entropia encontrados neste

trabalho, para o ácido retinóico, com relação àqueles apresentados para o retinil palmitato da literatura,⁶⁸ não refutam o exposto, pois as complexações entre o éster da vitamina A e os fulerenos não se dão em meio etanólico e os autores não investigaram a liberação a partir da matriz para poderem observar possíveis efeitos sobre as vizinhanças do sistema.

Em termos de espontaneidade, os dados da Tabela 4 demonstram que a interação da quitosana com o ácido retinóico foi mais efetiva do que com o tocoferol, o que, novamente, ratifica as inferências obtidas das análises térmicas, conjuntamente com o modelo proposto por FTIR. Reitera-se que tais silogismos são explicados pela energia de interação do grupo carboxila do ácido retinóico com os grupos amino da quitosana, que é maior do que a energia de interação da quitosana com o grupo fenólico do tocoferol, como mostrados nas Figura 26 e Figura 28, na seção 4.2.1.

4.3 – Sistemas de liberação controlada

4.3.1 – Liberação do tocoferol em fluido gastrointestinal mimetizado

Há um consenso geral de que em adultos humanos saudáveis, o pH estomacal em jejum está na faixa entre 1–3. Após a ingestão de alimentos, o pH normalmente sobe, em decorrência de efeitos tamponantes das substâncias presentes na dieta normal do indivíduo. Por outro lado, sob contínua secreção de suco gástrico, os valores de pH tendem a retornar ao seu estado basal após um certo período de tempo.^{64,69}

Os valores de pH no duodeno em jejum tendem a um nível mais próximo do neutro (6 – 6,5).^{64,69} Do mesmo modo, o potencial hidrogeniônico no íleo terminal (intestino) parece permanecer estável em torno de pH 7,4.⁷⁰ Portanto, há de se supor que a liberação de tocoferol das microesferas de quitosana deve seguir um protocolo através desses distintos valores de pH, como mostra a Figura 32. A cinética de liberação demonstra que o perfil da curva, com liberação acentuada em ambiente intestinal simulado, condiz com estudos presentes na literatura.^{55,71}

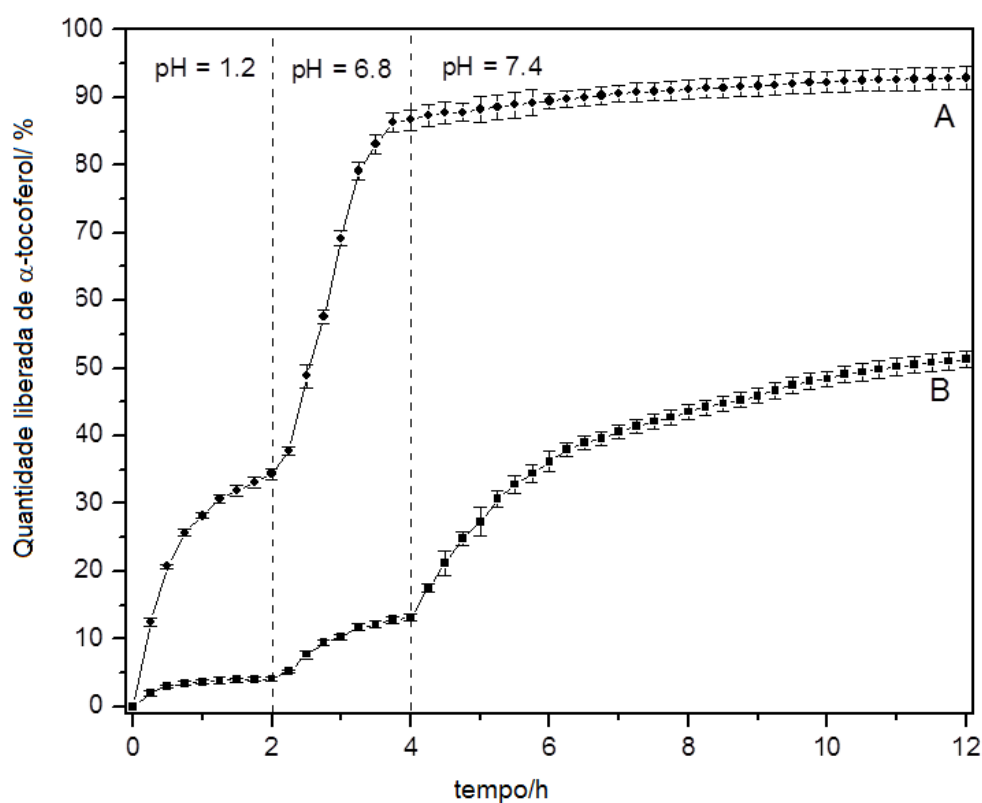


Figura 32. Perfis de liberação gastrointestinal de α -tocoferol livre (A) e ancorado em quitosana (B), erro baseado no SD, n=3, T = 37°C.

Não se verifica uma liberação imediata, ou *burst effect*, no perfil da curva de liberação controlada do tocoferol a partir da matriz de quitosana. Isto reforça a ideia de que não há quantidade significativa de moléculas fisiossorvidas à superfície do material, o que valida a metodologia de impregnação da vitamina às microesferas, bem como a eficácia do sistema de liberação em si.

A quantificação de α -tocoferol liberado foi feita retirando-se alíquotas a cada 15 min, com posterior análise por HPLC, cujos resultados encontram-se dispostos na Figura 33.

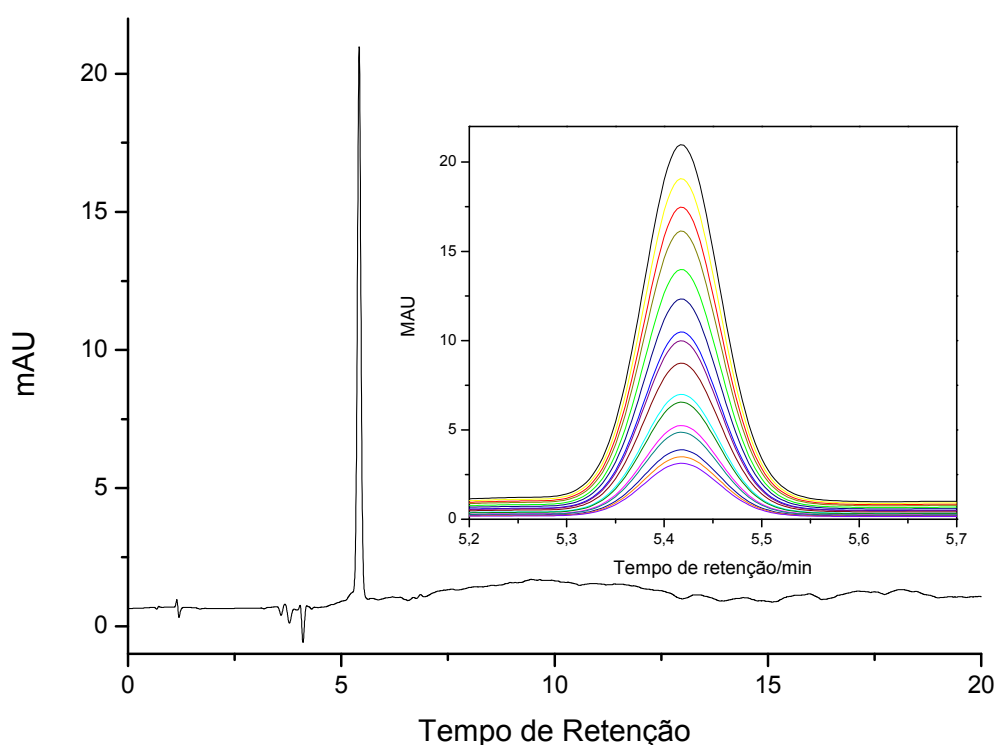


Figura 33. Cromatograma do tocoferol e ampliação com diversas concentrações.

A liberação de α -tocoferol das microesferas de quitosana é consistente com os processos de digestão e absorção que ocorrem primeiramente no estômago e no duodeno, e posteriormente na parte proximal do intestino delgado, cujos valores de liberação sustentam a hipótese da aplicação desse material no balanço nutricional.⁶⁹

Deve ser destacado que nem todo α -tocoferol foi eliminado, e durante 12 h, apenas 50% da vitamina foi liberada, comprovando que a imobilização em microesferas de quitosana gera uma ação de liberação controlada do tocoferol. Dessa maneira, as microesferas de quitosana satisfazem algumas das premissas iniciais deste trabalho, que consistiam em comprovar sua utilização no suprimento vitamínico por via oral, sem os efeitos inconvenientes de doses supra e hipoterápicas. Tais resultados auxiliam o desenvolvimento de uma nova ciência interdisciplinar, e possibilitam uma nova alternativa às pessoas com deficiências em vitamina E.

4.3.2 – Liberações controladas em cremes hidratantes

As três marcas de creme hidratante (10 g) foram fortificadas com 1% em massa de α -tocoferol ou retinil palmitato. Como relatado na seção *Experimental*, o composto ácido retinóico foi substituído por retinil palmitato para seguir as normas da ANVISA e FDA. Assim, foi necessário determinar a quantidade máxima de retinil palmitato ancorado em microesferas de quitosana, para posterior quantificação da massa de vitamina liberada.

As quantificações foram feitas por HPLC com detector de UV-Vis, nas condições já descritas na seção *Experimental*. A massa encontrada de retinil palmitato adsorvida por grama de microesferas foi de 17,56 mg. Assim, aproximadamente 500 mg de microesferas com as vitaminas imobilizadas, foram adicionados em 10 g dos cremes. Todos os cremes foram homogeneizados por meio de um agitador mecânico.

As liberações das vitaminas livres e ancoradas em microesferas de quitosana foram realizadas através do método de difusão, utilizando-se células Franz-type. Na ausência do equipamento, células de difusão Franz-type foram desenvolvidas no próprio laboratório, conforme a Figura 34.

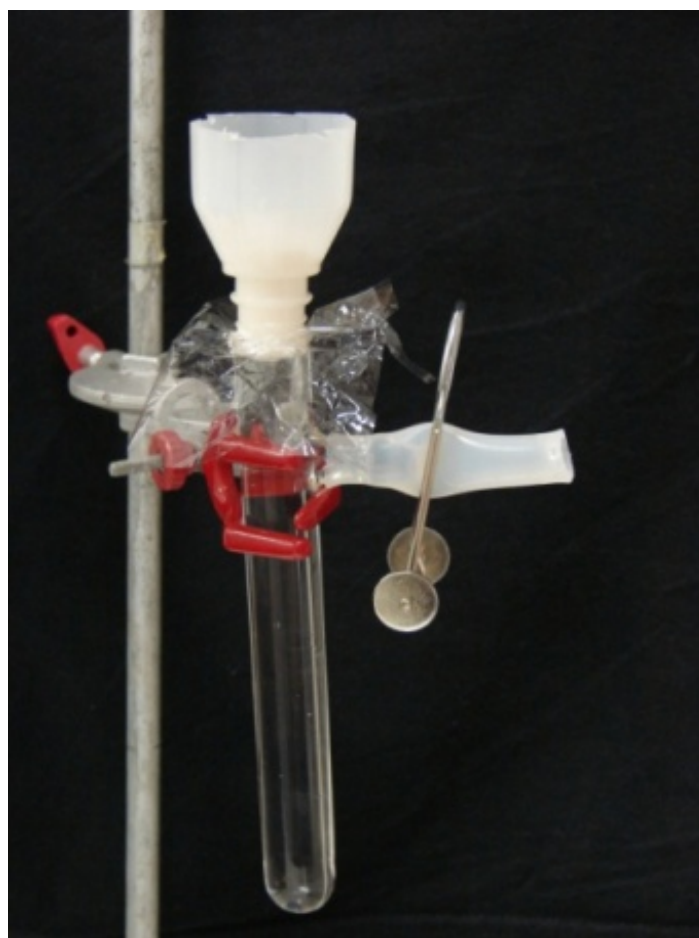
**A****B****C****D****E**

Figura 34. Esquema de células Franz-type e célula montada no laboratório. O sistema de difusão em si (A), visão do encaixe do sistema de difusão no banho térmico (B), visão do banho térmico contendo o sistema de difusão (C), adaptação para o agitador magnético não sofrer danos por estar imerso na água do banho térmico (D), visão superior do banho térmico (E).

As concentrações de α -tocoferol e de retinil palmitato livres e imobilizados em microesferas de quitosana foram quantificadas por meio de análises de HPLC com detector de UV. Os espectros acumulados em função do tempo das alíquotas liberadas de tocoferol podem ser observados na Figura 35, para o α -tocoferol livre e/ou imobilizado; e na Figura 36, para o retinil palmitato livre e imobilizado.

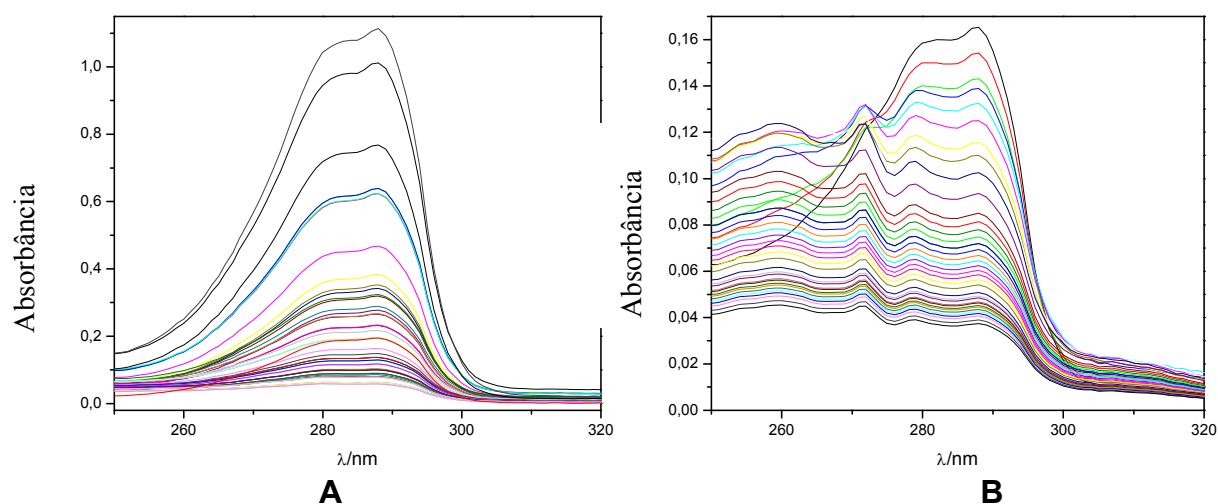


Figura 35. Espectros de absorção molecular (em função do tempo) na região UV da difusão do α -tocoferol em cremes (A) e espectro da difusão do α -tocoferol ancorado em microesferas de quitosana (B) das alíquotas retiradas das células Franz-type.

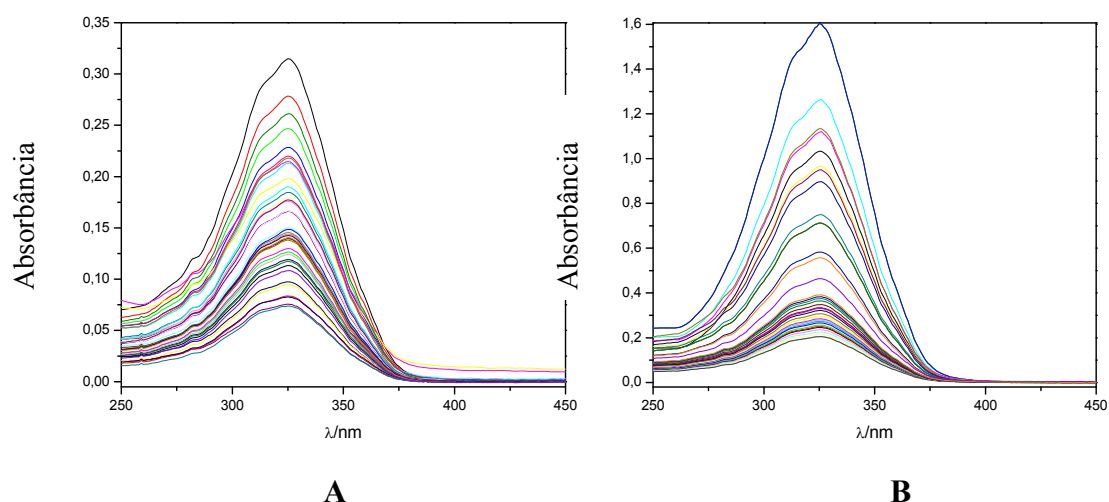


Figura 36. Espectros de absorção molecular (em função do tempo) na região UV da difusão do retinil palmitato em cremes (A) e espectro da difusão do retinil palmitato ancorado em microesferas de quitosana (B) das alíquotas retiradas das células Franz-type.

A Figura 35 mostra que algo das microesferas também é liberado em tempos maiores de difusão, haja vista absorções 270 nm, não presentes na liberação de α -tocoferol livre no creme. Poder-se-ia creditar este efeito a alguma espécie de reação do tocoferol com componentes da pele de porco, o que levaria a degradações parciais da vitamina, haja vista que esta possui elevada atividade antioxidante. Porém, não foi possível determinar com exatidão o que foi liberado pelas microesferas.

A partir da quantificação dos dados de liberação obtidos pela célula de difusão Franz-type, as quantidades permeadas através da membrana, Q (ng cm^{-2}), de tocoferol livre e imobilizado puderam ser determinadas, conforme a Figura 37.

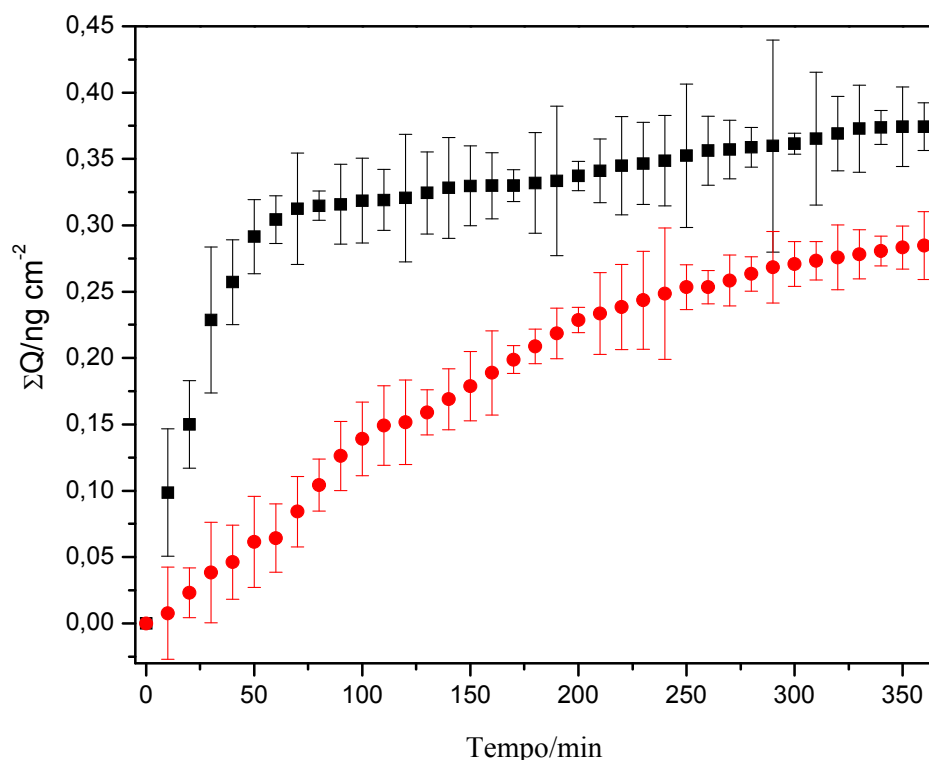


Figura 37. Quantidades permeadas, através da membrana, do α -tocoferol livre (■) e α -tocoferol ancorado em microesferas de quitosana (●) nos três cremes distintos.

Os dados da Figura 37 mostram claramente que o tocoferol na forma livre é difundido mais rapidamente através da pele, com grande liberação em um intervalo de 60 min, enquanto que, ancorado nas microesferas, o processo de difusão foi mais lento. Tal característica demonstra o efeito do tocoferol em doses pequenas e constantes, confirmando a habilidade de liberação controlada desses materiais em cremes hidratantes, como já relatado na literatura.

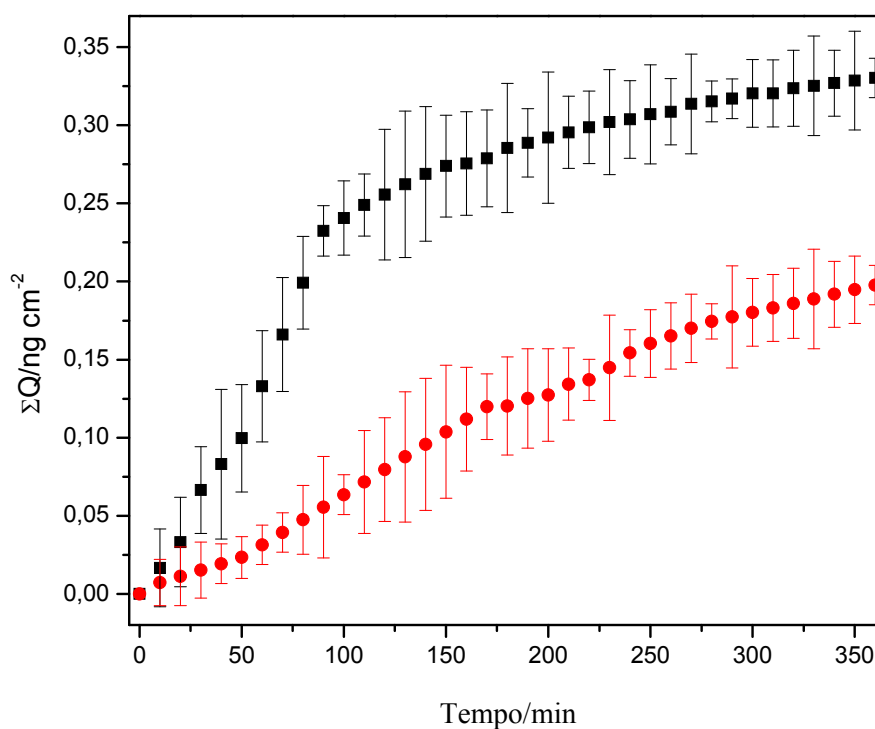


Figura 38. Quantidades permeadas, através da membrana, do retinil palmitato livre (■) e retinil palmitato ancorado em microesferas de quitosana (●) nos três cremes distintos.

A Figura 38 também mostra que o retinil palmitato é liberado rapidamente na forma livre, ao passo que, na forma imobilizada em microesferas, apresenta também uma liberação controlada.

Esses resultados confirmam que as imobilizações tanto de tocoferol como de retinil palmitato, tornam as microesferas de quitosana úteis para serem usadas em cremes hidratantes, visto que os testes realizados consistiram na fortificação de três cremes hidratantes distintos e os resultados apresentaram um comportamento similar.

Outro ponto a se ressaltar em favor da hipótese de um ancoramento efetivo é o fato de não se verificar uma liberação imediata, ou *burst effect*,

logo no início das liberações, o que indica que o gradiente das concentrações das vitaminas talvez seja função do tempo.

4.3.2 – Determinação de um modelo cinético das difusões nos cremes

A etapa de liberação da substância ativa a partir de sistemas de matrizes hidrofílicas resulta de uma interação complexa. Conseqüentemente, a abordagem matemática que abrange todos estes mecanismos nem sempre pode ser determinada empiricamente. Para isso, procura-se fazer desde correlações empíricas e semi-empíricas simples e facilmente aplicáveis, até algoritmos mais robustos, nos quais se consideram o tamanho e a forma geométrica das matrizes poliméricas, além dos processos de dissolução, difusão e os mecanismos de erosão.

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais hidrofílicos, alguns modelos bem conhecidos são usados extensivamente para analisar a liberação da substância ativa a partir destes sistemas. O primeiro modelo,⁷³ designado por cinética de ordem zero baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam, desde que suas áreas não se modifiquem e que condições de equilíbrio não sejam atingidas. As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, seguindo uma tendência linear.

Este modelo pode ser matematicamente descrito pela seguinte expressão:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_0 t + b \quad \text{Eq. (14)}$$

Na qual Q_t representa a quantidade absoluta (podendo ser expressa em mol, g, %, ou outras formas de concentração) de um fármaco liberada no tempo t e Q_∞ a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito, a qual deverá corresponder à quantidade total de fármaco incorporado ao sistema polimérico em $t = 0$; k_0 é a constante cinética e b é a quantidade inicial de fármaco na solução. Muitas vezes, esta quantidade inicial do fármaco resulta de uma liberação imediata (“*burst effect*”) motivada seja pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema matricial ou por alterações que se verificam na estrutura deste, com conseqüente liberação imediata da droga, seguida de liberação mais lenta.

O modelo denominado de cinética de primeira ordem aplica-se a sistemas que contenham fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas, liberando o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente na matriz, de tal modo que a quantidade de substância liberada por unidade de tempo diminui e sua representação matemática está disposta na Equação 15.^{73,76}

$$\ln Q_t = -kt + \ln Q_\infty \quad \text{Eq. (15)}$$

Outro modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi,⁷³ freqüentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. A equação de Higuchi expressa como fração de massa liberada (ou concentração) assume a forma:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_H \sqrt{t} + b \quad \text{Eq. (16)}$$

Onde k_H corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características do desenho da formulação. A equação 15 permite descrever o mecanismo de liberação de fármacos como um processo de difusão baseado na segunda Lei de Fick (Equação 16), sendo este dependente da raiz quadrada do tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[D \frac{\partial C}{\partial x} \right] \quad \text{Eq. (17)}$$

Onde o fluxo ($D \frac{\partial C}{\partial x}$) varia com o tempo t , através de uma determinada distância x .

Porém, o uso da equação de Higuchi em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Desta forma, a equação de Higuchi apresenta

fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada. No entanto, é mais realista que o modelo de ordem zero, por poder ser aplicado com maior exatidão a matrizes unidimensionais pouco solúveis, que não apresentem capacidade de intumescimento, como por exemplo, a quitosana.

Outros modelos matemáticos bem detalhados na literatura, como os de Korsmeyer-Peppas,^{74,75} ou ainda Peppas e Sahlin,^{74,76} levam em consideração as hipóteses quanto a um mecanismo misto, onde além do processo de difusão Fickiana, há também entumescimento e erosão da matriz polimérica. Uma vez que, durante os ensaios, as microesferas de quitosana reticulada demonstraram que, para os intervalos de tempo trabalhados nesta tese, não houve destruição significativa da matriz, o teste para verificação das cinéticas de permeabilidade cutâneas utilizando tais modelos foi descartado, restando somente os modelos de ordem zero (prescinde da concentração do fármaco), primeira ordem (depende da concentração da substância), e Higuchi (assume que os processos de difusão seguem a Lei de Fick).

Portanto, na tentativa de propor um modelo cinético da difusão, obteve-se da plotagem dos dados presentes na Figura 37 e Figura 38 as equações de regressão para os três modelos elencados.

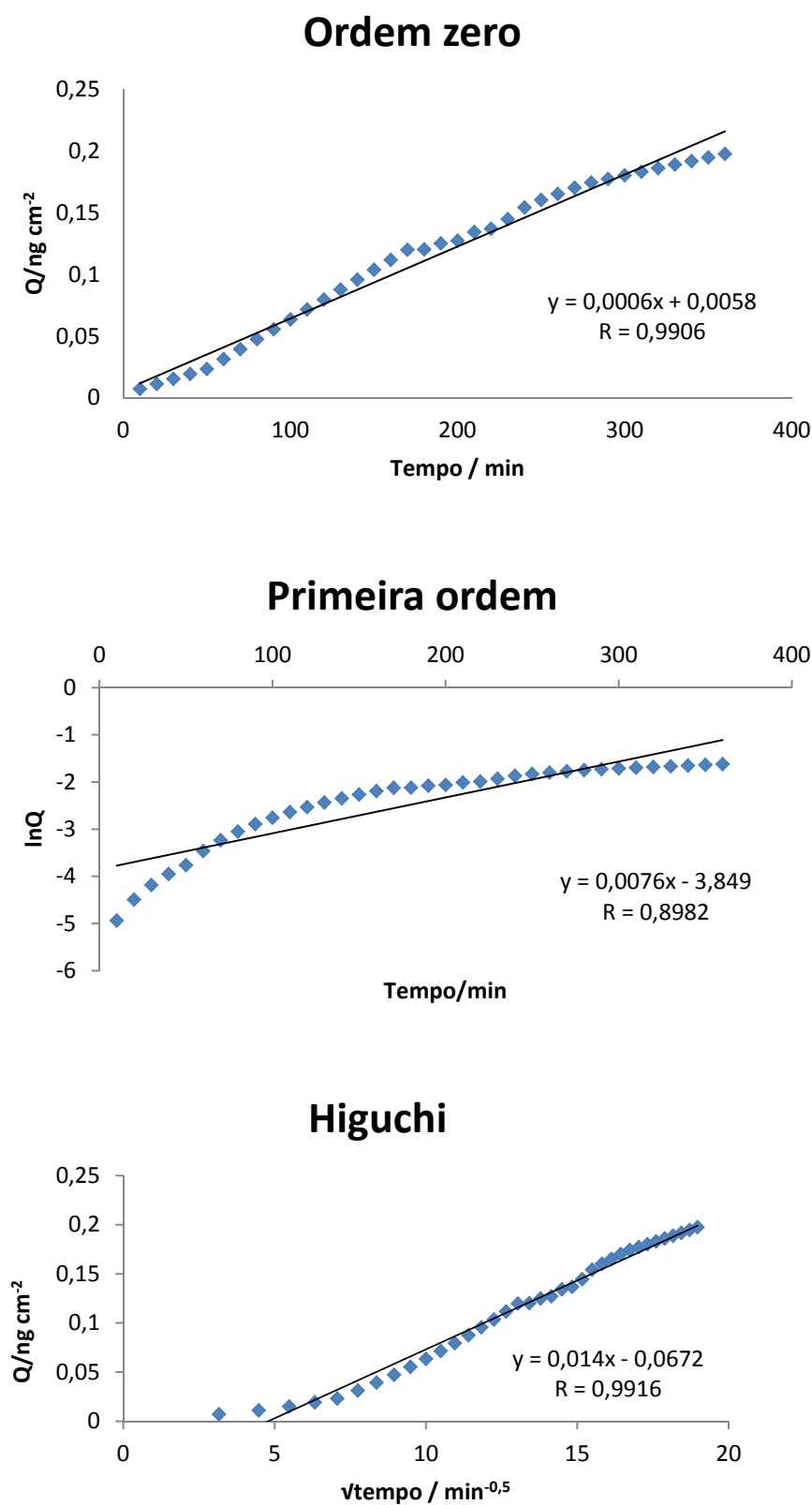


Figura 39. Modelos de regressão da cinética de permeabilidade cutânea para a vitamina A (retinil palmitato).

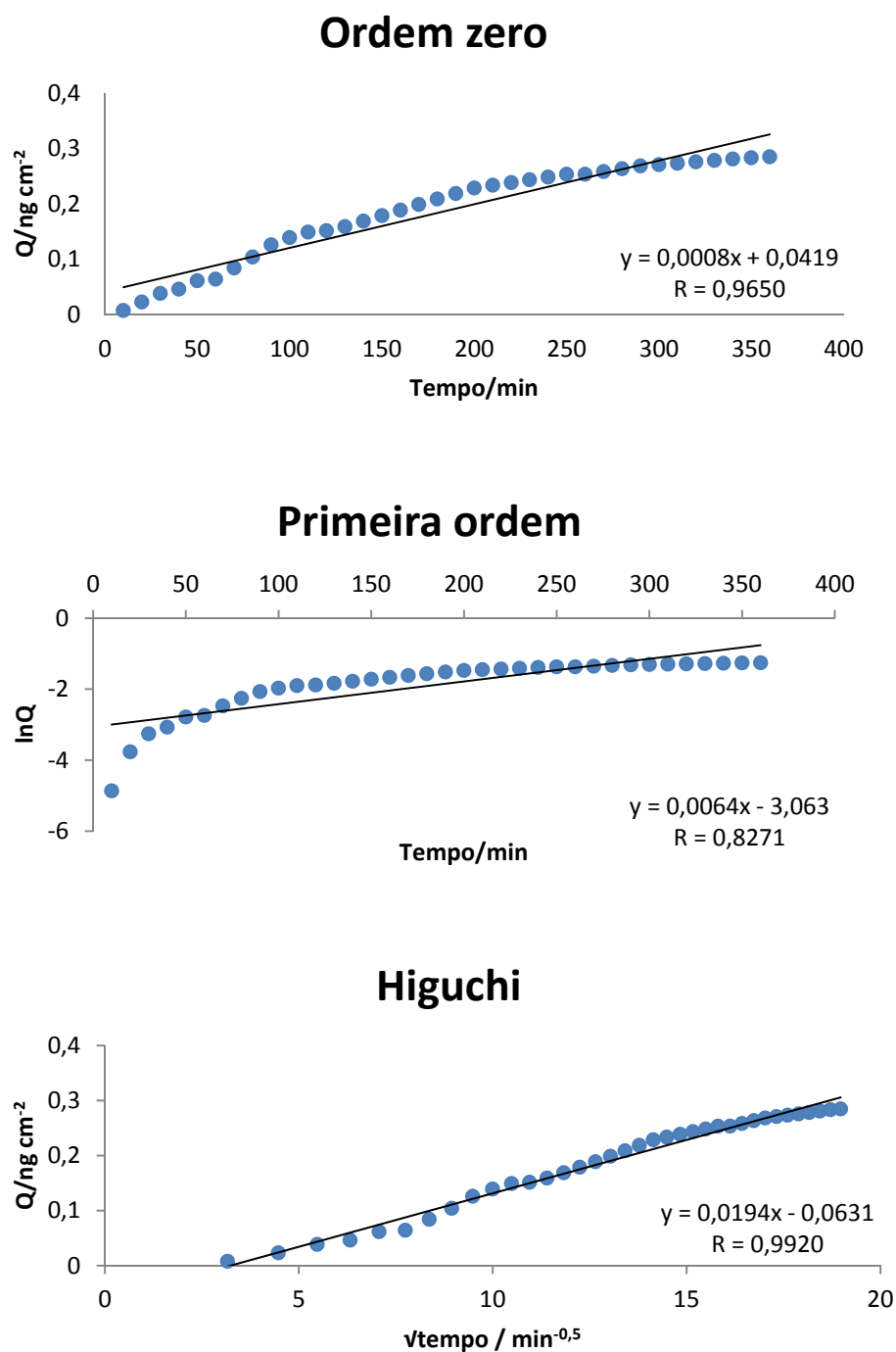


Figura 40. Modelos de regressão da cinética de permeabilidade cutânea para a vitamina E (tocoferol).

Observa-se que, para ambas as vitaminas, o modelo que mais se adequou foi aquele onde se aplicou a equação de Higuchi, ainda que, para o caso do retinil palmitato, a diferença no coeficiente linear tenha sido pequena comparando-se com a cinética de ordem zero. Tal fato pode ser explicado pela magnitude dos erros associados aos dados da vitamina A. Contudo, a liberação da vitamina não foi completa, o que sustenta a hipótese de que o processo de difusão seja dependente da concentração, reiterando a probabilidade da equação de Higuchi ser mais adequada. Ressalta-se que os erros dos dados são relativamente grandes para se dizer efetivamente qual é de fato o perfil cinético do processo.

5.0 – Conclusões

5 – Conclusões

O sistema de desenvolvimento de microesferas funcionou com sucesso, produzindo microesferas de quitosana homogêneas em torno de 100 µm.

Os ancoramentos de ácido retinóico e tocoferol nas microesferas também foram exitosos, o que pôde ser comprovado por espectroscopia de infravermelho e pelos ensaios termodinâmicos. Os dados calorimétricos comprovaram que as interações de ácido retinóico e tocoferol com as microesferas de quitosana foram espontâneas, além de entálpica e entropicamente favoráveis.

As microesferas de quitosana modificadas com tocoferol mostraram que podem ser aplicadas em formulações orais para pessoas com deficiência de vitamina E. Os resultados apresentados nesta tese confirmam que o tocoferol foi liberado em pequenas quantidades na região estomacal mimetizada e em maiores quantidades na região intestinal mimetizada, conforme o esperado.

Os resultados dos testes de liberação dérmica indicaram que a possibilidade das microesferas de quitosana modificadas com tocoferol e retinil palmitato serem utilizadas em formulações cosméticas. Cremes fortificados com as microesferas de quitosana apresentaram uma difusão lenta e permanente do tocoferol e do retinil palmitato, comprovando que as microesferas de quitosana também podem ser usadas em sistemas de liberação controlada em cremes hidratantes.

Portanto, os resultados contidos nesta tese estabelecem o estudo da interação química de vitaminas com biopolímeros como um importante campo

de sucesso para a indústria de cosméticos, possibilitando o desenvolvimento de novos materiais de alta especificidade química.

Perspectivas de trabalhos futuros

Nesta tese, procurou-se investigar aspectos físico-químicos e farmacocinéticos relativos à síntese de microesferas de quitosana impregnadas com vitaminas A e E e suas respectivas liberações controladas. Contudo, a amplitude do tema permite ainda que mais estudos sejam feitos, dando continuidade e agregando, ou refutando, hipóteses levantadas neste trabalho. Os ensaios farmacocinéticos, por exemplo, envolveram apenas a biodisponibilidade dos fármacos liberados pela matriz polimérica. O trabalho pode ser expandido com metodologias que possibilitem compreender melhor os mecanismos de absorção e biotransformação, bem como os sítios de ação das substâncias (*in vivo*). Para demonstrar a viabilidade comercial do material desenvolvido, fazem-se necessários ensaios de citotoxicidade, análises de reologia e estabilidade oxidativa da formulação oral e dos cremes. Estudos espectroscópicos e termodinâmicos também necessitam ser realizados para elucidar completamente o tipo de interação entre o retinil palmitato e as microesferas de quitosana, que por questões técnicas não pode ser avaliada neste trabalho. Modificações no preparo ou na estrutura das moléculas de quitosana também ampliariam o espectro de aplicações.

6.0 – Referências Bibliográficas

6 – Referências

1. Houaiss, A. *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*, Editora Objetiva Ltda., 2009.
2. http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=2004&fase=imprime, acessado em março de 2011.
3. Junqueira, L. C.; Carneiro, J.; *Histologia Básica*, 10^a ed.; Guanabara Koogan, 1997.
4. ABIHPEC, *Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos*, 2010.
5. ABDI, Unicamp, *Relatório de Acompanhamento Setorial – Cosméticos*, 2008.
6. <http://www.euromonitor.com/brazil>, acessado em março de 2011.
7. <http://www.sbcd.org.br>, acessado em março de 2011.
8. Seite, S.; Fourtanier, A. M. A.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**; 58, 160.
9. Manela-Azulay, M.; Bagatin, E.; *Clin. Dermatol.* **2009**; 27, 469.
10. Zussman, J.; Ahdout, J.; Kim, J.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**; 63, 507.
11. http://www.vitaminas.bayer.pt/scripts/pages/pt/vitaminas/vitamina_a/index.php, acessado em março de 2011.
12. Keller, K. L.; Fenske, N. A.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **1998**; 39, 611.
13. Moretto, E.; Fett, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*, Varela: São Paulo, 1998.
14. Oblong, J. E.; Bisset, D. L.; *Retinoids. In: Draelos Z D. Cosmeceuticals. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005*, 35.
15. Darvin, M.; Zastriw, L.; Sterry, W; Lademann; *J. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2006**; 19, 238.
16. Sabliov, C. M.; Fronczek, C.; Astete, C. E.; Khachatryan, M., Khachatryan, L.; Leonardi, C.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**; 86, 895.
17. Lehman P. A.; Slattery, J. T.; Franz, T. J.; *J. Invest. Dermatol.* **1988**; 91: 56.
18. Berkland, C.; Kim, K. K; Pack, D. W.; *J. Control. Rel.* **2001**; 73, 58.
19. Dinarvand, R; Rahmani, E.; Farbod, E.; *Int. J. Pharm. Res.* **2003**; 2, 47.
20. http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_retinoides.htm, acessado em julho de 2012.
21. http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_vitamina.htm, acessado em julho de 2012.
22. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/215_05rdc.pdf, acessado em julho de 2012.
23. Wang, B.; Siahaan, T.; Soltero, R.; *Drug Delivery*, 1^a ed.; Wiley: New York, 2005.
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1264306/pdf/biochemj01030-0072.pdf>, acessado em março de 2011.
25. Jiang, Q.; Christen, S.; Shigenaga, M. K.; Ames, B. N.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**; 74, 714.
26. Oliveira, K. J. F.; Koury, J. C.; Donangelo, C. M.; *Rev. Nutr.* **2007**, 20, 171.
27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1304226/pdf/westjmed00345-0014.pdf>, acessado em março de 2011.

28. <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>, acessado em março de 2011.
29. Dressman, J. B.; Vertzoni, M.; Goumas, K.; Reppas, C.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, 591.
30. Khetan, S. K.; Collins, T. J. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2319.
31. <http://www.drugdel.com/polymer.htm>, acessado em março de 2011.
32. Das, N. G.; Das, S. K.; *Formulation, Fill&Finish*, **2003**, 10.
33. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75, 1.
34. Langer R.; *Nature* **1998**, 30, 5.
35. Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P.; *Progress in Polymer Science* **2009**, 34, 641.
36. Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M.; *Journal of Controlled Release* **2004**, 100, 5.
37. Soppimath, K. S.; Aminabhvi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. J.; *Journal of Controlled Release*. **2001**, 70, 1.
38. Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S.; Costa. P.; *Rev. Bras. Cien. Farm.* **2005**, 41, 143.
39. Lyra, M. A. M.; Soares-Sobrinho, J. L.; Brasileiro, M. T.; La Roca, M. F.; Barraza, J. A.; Viana, O. S.; Rolim-Neto, P. J.; *Lat Am. J. Pharm.* **2007**, 26, 784.
40. Klee, S. K.; Farwick, M.; Lersch, P.; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2009**, 338, 162.
41. Cabral, E. C. M.; Zollner, R. L.; Santana, M. H. *First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology-RedeNanobiotec*, 171, 2002.
42. Romeiro, L. A. S.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. *Quím. Nova* **2003**, 26, 347.
43. Oliveira, R. B.; Lima, E. M.; *Revista Eletrônica de Farmácia* **2006**, 3, 29.
44. Rios, M. *Pharm. Tech.* **2005**, 29, 42.
45. Chellat, F.; Merhi, Y.; Moreau, A.; Yahia, L. *Biomaterials* **2005**, 26, 7260.
46. Signini, R.; Campana Filho, S. P.; *Polym Bull.* **1999**; 42,159.
47. Prashanth, K. V. H.; Tharanathan, R. N.; *Trends in Food Science & Technology* **2007**, 18, 117.
48. Prado, A. G. S.; Pescara, I. C; Albuquerque, R. D. A.; Honorato, F. N.; Almeida, C. M.; *Analytica* **2010**; 44, 62.
49. Klug, M.; Sanches, M. N. M.; Laranjeira, M. C. M.; Fávère, V. T.; *Quim. Nova* **1998**, 21, 410.
50. Arayachukeat, S.; Wanichwecharungruang, S. P.; Tree-Udom, T.; *Int. J. Pharm.* **2011**, 404, 281.
51. Rorrer, G. L.; Hsein, T. Y.; Way, J. D.; *Ind Eng Chem Res.* **1993**; 32, 2170.
52. Prado, A. G. S.; Torres, J. D.; Faria, E. A.; Dias, S. C. L.; *J. Colloid Interface Sci.* **2004**; 277, 43.
53. Torres, J. D.; Faria, E. A; SouzaDe, J. R.; Prado, A. G. S.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, 182, 202.
54. Mi, F. M.; Shyu, S. S.; Chen, C. T.; Schoung, J.Y.; *Biomaterials* **1999**, 20, 1603.
55. Alishahi, A.; Mirvaghefi, A.; Tehrani, M. R.; Farahmand, H.; Shojaosadati, S. A.; Dorkoosh, F. A.; Elsabee, Maher Z.; *Food Chemistry* **2011**, 126 935.

56. Xin-Yuan, S.; Tian-Wei, T.; *Biomaterials* **2002**, *23*, 4469.
57. http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b7ee140047f8ce26bcd7be9f306e0947/Parecer_n_4_etinoides.pdf?MOD=AJPERES, acessado em outubro de 2011.
58. Chagas, M. H. C.; Flores, H.; Campos, F. A. C. S.; Santana, R. A.; Lins, E. C. B.; *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* **2003**, *3*, 247.
59. Prado, A. G. S.; Macedo, J. L.; Dias, S. C. L.; Dias, J. A.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, *35*, 23.
60. Sabnis, S.; Block, L. H.; *Polymer Bulletin* **1997**, *39*, 67.
61. Kasaai, M. R.; *Carbohydrate Polymers* **2008**, *71*, 497.
62. Kasaai, M. R.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1667.
63. Monteiro Jr., O. A. C.; Airoldi, C.; *Int. J. Biol. Macromolecules* **1999**, *26*, 119.
64. Dressman, J. B.; Berardi, R. R.; Dermentzoglou, L. C.; Russell, T. L.; Schmaltz, S. P.; Barnett, J. L.; Jarvenpaa, K. M.; *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 756.
65. Carvalho, T. O.; Matias, A. E. B.; Braga, L. R.; Evangelista, S. M.; Prado, A. G. S. *submetido*.
66. Prado, A. G. S.; Santos, A. L. F.; Pedroso, C. P.; Carvalho, T. O.; Braga, L. R.; Evangelista, S. M.; *J Therm. Anal. Calorim.* **2011**, *106*, 415.
67. Ho, M. T. P.; Pownall, H. J.; Hollyfield, J. G.; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17759.
68. Saha, A.; Mukherjee, A. K.; *Spectrochimica Acta Part A* **2005**, *61*, 1263.
69. Kalantzi, L.; Goumas, K.; Kalioras, V.; Abrahamsson, B.; Dressman, J.; Reppas, C.; *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 165.
70. Evans, D. F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A. G.; Dyson, T. J.; Hardcastle, J. D.; *Gut* **1988**, *29*, 1035.
71. Dressman, J. B.; Vertzoni, M.; Goumas, K.; Reppas, C.; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 591.
72. Gabbaninia, S.; Materab, R.; Beltraminia, C.; Minghettia, A.; Valgimigli, L.; *J. Pharm. and Biom. Anal.* **2010**, *52*, 461.
73. Mura, C.; Nácher, A.; Merino, V.; Merino-Sanjuán, M.; Manconi, M.; Loy, G.; Fadda, A. M.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *94*, 199.
74. Sun, W.; Zhang, N.; Li, X.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *95*, 115.
75. Dutta, R. K.; Sahu, S.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *97*, 19.
76. Swamy, N. G. N.; Abbas, Z.; *Ind. J. Pharm. Edu. Res.* **2012**, *46*, 52.

Anexos

Andre Luiz Ferreira dos Santos

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Andre Luiz Ferreira dos Santos
Nascimento 08/10/1983 - Brasilia/DF - Brasil
CPF 00487164130

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007 - 2012** Doutorado em Química.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
Título: Estudo das Interações das Vitaminas A e E em Microesferas de Quitosana: Liberação controlada em fluidos gastrointestinais e em cremes hidratantes
Orientador: Alexandre Gustavo Soares do Prado
- 2006 - 2007** Mestrado em Química.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
Título: Produção de bio-óleo a partir do craqueamento térmico de gorduras residuais derivadas de biomassa animal e vegetal, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Paulo Anselmo Ziani Suarez
Bolsista do(a): Fundação Banco do Brasil
- Graduação incompleto(a) em Letras.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
Ano de interrupção: 2009
- 2001 - 2006** Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
Título: A Química Verde no Ensino Médio - alicerce para a construção da cidadania
Orientador: Wildson L. P. dos Santos / Alexandre G. S. Prado
- 2001 - 2006** Graduação em Bacharelado em Química.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

Formação complementar

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em I Treinamento de Utilização do Biosoft.
Ministério do Desenvolvimento Agrário, MDA, Brasília, Brasil
- 2007 - 2007** Tópicos de Cristalografia Estrutural.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Liquid chromatography of synthetic polymers.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2004 - 2004** Interação de íons metálicos com macromoléculas.
-

Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiania, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de Brasília - UNB

Vínculo institucional

2007 - Atual	Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
2006 - 2007	Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
2001 - 2006	Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de Graduação , Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

08/2007 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química <i>Linhas de Pesquisa:</i> <i>Processos eletroquímicos em oleoquímica</i>
08/2006 - 12/2006	Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química <i>Estágio:</i> <i>Estágio em Docência na disciplina Laboratório de Química Fundamental do curso de graduação</i>
04/2006 - 07/2007	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química <i>Linhas de Pesquisa:</i> <i>Combustíveis alternativos derivados de biomassa</i>
03/2005 - 02/2006	Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química <i>Estágio:</i> <i>Bolsista de PIBITI do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq). Área: Tecnologia Química. Modalidade: Iniciação Tecnológica Industrial. Descrição do projeto: Pesquisa na obtenção e análise de biocombustíveis.</i>
03/2005 - 07/2005	Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química <i>Estágio:</i> <i>Atividade de Monitoria: Laboratório de Química Inorgânica</i>
08/2004 - 12/2004	Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química <i>Estágio:</i> <i>Atividade de Monitoria: Laboratório de Química Analítica</i>
04/2004 - 03/2006	Conselhos, Comissões e Consultoria, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química <i>Especificação:</i> <i>Membro de conselho - Representante dos Discentes de Graduação em Química</i>
03/2004 - 07/2004	Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química

Estágio:
Atividade de Monitoria: Química Inorgânica Básica

03/2003 - 07/2003 Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química

Estágio:
Atividade de Monitoria: Fundamentos de Química

08/2002 - 01/2003 Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química

Estágio:
Atividade de Monitoria: Introdução a Química Orgânica

03/2002 - 08/2002 Estágio, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química

Estágio:
Atividade de monitoria: Fundamentos de Química

2. Universidade Católica de Brasília - UCB-DF

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professor Assistente , Carga horária: 24, Regime: Parcial

Atividades

06/2010 - 08/2010 Direção e Administração, CURSO DE QUÍMICA

Cargos Ocupados:
ASSESSOR DE CURSO

03/2009 - 06/2009 Graduação, Biomedicina

Disciplinas Ministradas:
Noções de Físico-Química

02/2009 - Atual Graduação, Engenharia Civil

Disciplinas Ministradas:
Química Geral I

02/2009 - 06/2009 Graduação, Farmácia

Disciplinas Ministradas:
Química Geral e Inorgânica

03/2008 - Atual Graduação, Química

Disciplinas Ministradas:
Tópicos em química , Química Geral I , Físico-Química I , Físico-Química Experimental , Físico-Química II , Pesquisa e prática no ensino de química analítica e físico-química

03/2008 - Atual Graduação, Engenharia Ambiental

Disciplinas Ministradas:
Físico-Química Ambiental

03/2008 - 08/2010 Pesquisa e Desenvolvimento, CURSO DE QUÍMICA

Linhas de Pesquisa:
EDUCAÇÃO EM QUÍMICA

3. Secretaria de Educação do Distrito Federal - SEDF

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor Contrato Temporário , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

10/2007 - 12/2007 Ensino médio
Especificação:
Física

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica**Artigos completos publicados em periódicos**

1. Prado, A.G.S., Santos, A.L.F., Nunes, A.R., Tavares, G.W., Almeida, C.M.
Designed formulation based on tocopherol anchored on chitosan microspheres for pH-controlled gastrointestinal controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 96, p. 8-13, 2012.
2. Prado, A.G.S, Santos, A.L.F., Pedroso, C.P., Carvalho, T.O., Braga, L.R., Evangelista, S.M.
Vitamin A and Vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 106, p. 415, 2011.
3. SANTOS, A.L.F., Martins, Danilo U., Iha, Osvaldo K., Ribeiro, Rafael A.M., Quirino, Rafael L., Suarez, Paulo A.Z.
Agro-industrial residues as low-price feedstock for diesel-like fuel production by thermal cracking. *Bioresource Technology*, v.101, p.6157 - 6162, 2010.
4. SUAREZ, P.A.Z., SANTOS, A.L.F., RODRIGUES, J.P., ALVES, M.B.
Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova (Impresso)*, v.32, p.768 - 775, 2009.
5. POUSA, G. P. A. G., SANTOS, A.L.F., SUAREZ, P.A.Z.
History and Policy of Biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v.35, p.5393 - 5398, 2007.

Capítulos de livros publicados

1. SANTOS, A.L.F.
PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO A PARTIR DO CRAQUEAMENTO TÉRMICO DE GORDURAS RESIDUAIS In: *Biocombustível para o Mercosul – Edição 2008 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia*. 1 ed. Brasília : UNESCO, 2008, v.1, p. 51-76.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SANTOS, A.L.F., RODRIGUES, J.P., OLIVEIRA, F.C.C., BRANDAO, C.R.R., RAMALHO, H.F., COSTA, L.A.F. da, RAMOS, M.B., IHA, O.K., MARTINS, R.S., RUBIM, J.C., SUAREZ,

P.A.Z.

Avaliação da Qualidade do Bio-óleo de Sebo Bovino Produzido na Presença de Diferentes Catalisadores In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília.

II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel - Livro de Trabalhos. , 2007.

2. POUSA, G. P. A. G., SANTOS, A.L.F., SUAREZ, P.A.Z.

Histórico e Política do Biodiesel no Brasil In: II Congresso da rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília.

II Congresso da rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel - Livro de Trabalhos. , 2007.

3. SANTOS, A.L.F., QUIRINO, R.L., RIBEIRO, R.A.M., MARTINS, D. U., IHA, O.K., RUBIM, J.C., SUAREZ, P.A.Z.

Propriedades Físico-Químicas do Bio-óleo de Gordura de Frango In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília.

II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel - Livro de trabalhos. , 2007.

4. RIBEIRO, E. B., QUIRINO, R.L., RIBEIRO, R.A.M., RODRIGUES, J.P., SANTOS, A.L.F., LAVICH, R. R., IHA, O.K., CARDOSO, E. C. V., AGUIAR, G.H.M., MARTINS, R.S., TAVARES, A. P., SOARES, V. C. D., LIMA, D. G., RUBIM, J.C., SUAREZ, P.A.Z.

Contribuições do LMC-UnB para a Pesquisa em Biocombustíveis 2: Desenvolvimento de Processos Termo-Catalíticos para o Craqueamento de Óleos e Gorduras In: I Congresso da rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2006, Brasília.

I Congresso da rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel - Livro de Trabalhos. , 2006. v.2. p.252 -

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Santos, Andre L.F., Silva, F. A. S., GOULART, M. O. F., SUAREZ, P.A.Z.

Processos eletroxidativos aplicados á descarboxilação de derivados do ácido oleico para redução da acidez de materiais graxos In: III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2009, Brasília.

Livro de resumos. , 2009.

2. SANTOS, A.L.F., BRANDAO, C.R.R., OLIVEIRA, F.C.C., RAMALHO, H.F., RODRIGUES, J.P., COSTA, L.A.F. da, IHA, O.K., MARTINS, R.S., RUBIM, J.C., SUAREZ, P. A. Z.

Correlações físico-químicas entre amostras de bio-óleos de sebo bovino obtidos via termólise catalítica heterogênea In: XV ENCAT, 2008, Salvador.

CD de resumos. , 2008.

3. DANTAS FILHO, F.F., FARIA, E. A., SCARASSATI, J., SOUSA, L. B., SANTOS, A.L.F., PRADO, A. G. S., SUAREZ, P.A.Z.

Estudo de estabilidade térmica de bio-óleo, oriundo do craqueamento de óleo de soja e gordura animal In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis - Energia de Resultados, 2007, Teresina.

Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis - Livro de resumos. , 2007.

4. SANTOS, A.L.F., PRADO, A.G.S., SANTOS, W.L.P. dos

A Química Verde no Ensino Médio: alicerce para a construção da cidadania In: I Encontro Regional do Distrito Federal da SBQ, 2006, Brasília - DF.

CD de Resumos. , 2006.

5. SANTOS, A.L.F., RIBEIRO, R.A.M., QUIRINO, R.L., RUBIM, J.C., SUAREZ, P.A.Z.

Bio-óleo obtido pela pirólise de fontes animais e vegetais In: 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia - SP.

29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Livro de Resumos. , 2006.

6. RIBEIRO, R.A.M., SANTOS, A.L.F., QUIRINO, R.L., RUBIM, J.C., SUAREZ, P. A. Z.

Pirólise de fontes animais e vegetais para obtenção de biocombustíveis In: I Encontro Regional do Distrito Federal da SBQ - CD de Resumos, 2006, Brasília - DF.

I Encontro Regional do Distrito Federal da SBQ. , 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SANTOS, A.L.F., RUBIM, J.C., SUAREZ, P.A.Z.
Investigação da Atividade Catalítica de Materiais Heterogêneos Baseados em Metais de Transição Aplicados a Reação de Pirólise de Sebo Bovino In: 15º Congresso Brasileiro de Catálise/MERCOCAT, 2009, Armação dos Búzios.
Livro de Resumos. , 2009.
2. RODRIGUES, J.P., SANTOS, A.L.F., OLIVEIRA, F.C.C., BRANDAO, C.R.R., RAMALHO, H.F., RAMOS, M.B., IHA, O.K., MARTINS, R.S., RUBIM, J.C., SUAREZ, P.A.Z.
Estudo Termo-catalítico do Craqueamento de Sebo Bovino In: XIV Congresso Brasileiro de Catálise, 2007, Porto de Galinhas.
XIV Congresso Brasileiro de Catálise - Livro de Resumos. , 2007.

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. SANTOS, A.L.F.
Tecnologia em oleoquímica, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
2. SANTOS, A.L.F.
O papel do químico no setor de energia e recursos renováveis: desenvolvimento econômico aliado a um mundo sustentável, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. ALEXANDRE RANGEL SCHWEICKARDT. **UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS (LODO) INDUSTRIAL PROVENIENTE DO PROCESSO DE ANODIZAÇÃO DE ALUMÍNIO COMO MATÉRIA-PRIMA INTEGRANTE NA PRODUÇÃO DE TIJOLOS**. 2010. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília
2. MÁRIO JOSÉ BORGES SALES. **A UTILIZAÇÃO DA VÍDEO-AULA COMO IMPORTANTE RECURSO PEDAGÓGICO PARA O SURDO**. 2009. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília
3. RICARDO ZANCHET FERREIRA. **UMA ANÁLISE DISCENTE E OS PARÂMETROS CURRICULARES NACIONAIS**. 2009. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília
4. PAULO CÉSAR MACIEL DA SILVA. **A ENERGIA NUCLEAR NA MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA E SUA CONTEXTUALIZAÇÃO NO ENSINO MÉDIO**. 2008. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília
5. ANDRÉ LUIZ DOS ANJOS GOMES DA SILVA. **APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE GORDURA EM ABATEDOURO DE AVES PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**. 2008. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília
6. RAFAELA SANTOS DE SOUZA. **ELABORAÇÃO DE UM EXPERIMENTO DE**

CONDUTIVIDADE DE MATERIAIS PRESENTES NO COTIDIANO PARA O ENSINO FUNDAMENTAL E MÉDIO. 2008. Curso (Química) - Universidade Católica de Brasília

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações : 21;Número de trabalhos : 2Data : 16/03/2010

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:

santos, alf

SCOPUS Número total de citações : 19;Número de trabalhos : 2Data : 16/03/2010

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:

santos, a.l.f.



Designed formulation based on α -tocopherol anchored on chitosan microspheres for pH-controlled gastrointestinal controlled release

Alexandre G.S. Prado^{a,*}, André L.F. Santos^a, Alecio R. Nunes^a, Guilherme W. Tavares^a, Claudio M. de Almeida^b

^a QuiCSI Team, Institute of Chemistry, University of Brasília, C.P. 4478, 70904-970 Brasília DC, Brazil

^b Department of Biology, UNUCET, State University of Goiás, 75000-000 Anápolis, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2011
Received in revised form 18 February 2012
Accepted 20 February 2012
Available online 28 March 2012

Keywords:

α -Tocopherol
Controlled release system
Chitosan
Biopolymer
Microspheres

ABSTRACT

Chitosan microspheres were prepared and vitamin E (α -tocopherol) was anchored onto the polymer. The amount of α -tocopherol entrapped onto a gram of the microspheres based system was 13.4 ± 0.4 mg. The microspheres modified with α -tocopherol were applied to vitamin E controlled release in a simulated gastrointestinal system. Characterizations were carried out by optical microscopy, FTIR and HPLC-UV techniques. For chitosan microspheres based system there was a 4.10% release, while for pure α -tocopherol the release was 25.53%. The percentage of α -tocopherol released at pH 6.8 was 13.10% for chitosan microspheres and 60.00% for free α -tocopherol. At pH 7.4, α -tocopherol release reached 51.30% and 92.88% for chitosan microspheres and pure α -tocopherol, respectively. α -tocopherol immobilized onto chitosan presented three distinct landings at each studied pH, whereas pure α -tocopherol presented only two established solubilization regions, one at pH 1.2, while between pH 6.8 and 7.4 it did not present any difference, establishing after 3.5 h. Thus, the immobilization of α -tocopherol onto chitosan microspheres figures it as an efficient controlled release system.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Drugs and micronutrients losses, as a result of the application of creams and pharmaceutical formulations, have been extensively studied, and many propositions to diminish these losses are mainly based on supports for those chemicals. In order to prevent this problem, vitamins can be immobilized on biocompatible polymeric matrices, such as chitosan microspheres, reducing their degradation. These macromolecules form a group of materials with special chemistry, known as controlled release systems (CRS) [1].

Besides its cosmetics effects, vitamin E (mainly formed by tocopherols and tocotrienols) is essential to health, and its deficiency within human body can cause many illnesses. Among its major compounds, α -tocopherol is the most biologically active form of vitamin E, since it has the property to inhibit lipid peroxidation and free radicals formation, preventing cell damages and cardiovascular diseases. It is known that specific doses of vitamin E can regenerate tissues and improve immunological resistance in humans.

Regarding nutrient absorption, although the stomach may not be the main absorption site of it, the organ plays an important role

as the first site where an oral administered formulation may release its bioactive substances. Concerning highly soluble compounds in gastric pH, complete dissolution may occur into this organ. For these compounds, gastric emptying can limit the small intestine absorption rates [2].

For partially neutral compounds, such as α -tocopherol, dissolution will slowly occur into gastric region and, in many cases, it will not be complete before the drug reaches the small intestine. Incomplete dissolution of these substances into gastrointestinal tract can severely restrict their oral bioavailability. This can result in a supersaturation, while the drug moves from a lower gastric pH to a higher small intestine pH [2].

Recommended daily intakes (RDI) for vitamin E in human diet were at first proposed in 1922 [3] and the lack of tocopherol in diet has also been raised as a cause for sterility in both male and female rats [3]. Since human beings are unable to perform vitamin E biosynthesis, its RDI is 10.0 mg of α -tocopherol for adults in Brazilian regulation, which follows recommended World Health Organization (WHO) values [4].

Regarding vitamin E ingestion, many studies have been conducted in order to investigate its importance in human feeding, as well as the relation between the ingestion and the loss of that micronutrient by excretion. For instance, it is reported that studying the levels of micronutrients in teenagers' blood plasma, inadequate intakes of vitamin E (40% of the group) were registered,

* Corresponding author. Tel.: +55 61 31073898; fax: +55 61 31073900.
E-mail address: agscrixus@gmail.com (A.G.S. Prado).

when compared to reference levels. This feature can lead to blood dysfunctions and skin problems [5,6].

One of the main problems related to micronutrients and drugs ingestion is the great loss rate, since 90% of the ingested substance is eliminated through human excretions. Thus, CRS have become useful in developing ideal systems that can make doses last a longer period of time [7].

A controlled release system is designed to maintain drug levels between its maximum and minimum for an extended period of time with a single application. Biodegradable polymers are among the main group of materials studied for CRS [8]. These polymers include chitosan, a polysaccharide with a very similar structure to cellulose, with linear chain and primary amine groups that give chitosan special properties for applications in health and pharmaceutical sciences [9,10].

Considering its use into health area as a low toxicity polymer for CRS, chitosan has attracted major attention, since it shows favorable features, besides its low cost, such as hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability, and muco-adhesivity [11–14].

Chitosan microspheres have been studied as a support to vitamins C and D oral release [15,16]. Vitamin C has been immobilized onto chitosan nanoparticles, and an evaluation of the vitamin–chitosan based system life-span was made, as well as a comparison between the controlled releases *in vitro* (mimicked gastrointestinal fluids) and *in vivo* (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) systems [15]. It is related a faster release at intestinal simulated pH (phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4), while at gastric pH (HCl 0.1 mol L⁻¹) the release was slower. The vitamin release profile into the fish's organism presented also the same tendency of the *in vitro* tests [15].

This work spreads the applications of an original study [17] about the use of chitosan microspheres as a support to controlled release of vitamins. The purpose of this study was to investigate whether the matrix α -tocopherol–chitosan could function as a friendly reservoir of vitamin E, providing a slow release and a constant concentration of the drug into human body.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chitosan was obtained from Genix Pharmaceutical Industry (Brazil) and α -tocopherol was obtained from Sigma. The reagents such as acetic acid, sodium hydroxide, methanol, ethanol and glutaraldehyde were obtained from Vetec and used as received.

2.2. Preparation of chitosan microspheres

Chitosan microspheres were prepared according to an original previous method published elsewhere [18]. Chitosan 10% (w/v) in ethanol was dissolved in a 5% (v/v) acetic acid/ethanol solution at room temperature. The solution was homogenized for 2 h and after, dripped in a coagulant solution of sodium hydroxide 10% (w/v) kept under stirring. Then, the microspheres were washed with deionized water until reaching pH 7.0. Once neutralized, the gelled beads were crosslinked in a 25% glutaraldehyde ethanolic solution for 2 h, without stirring. After that, microspheres were filtered, washed with deionized water and then with acetone and dried [18].

2.3. Characterization of chitosan microspheres

Chitosan was characterized by FTIR spectroscopy in a spectrophotometer JASCO 4100 by accumulating 250 scans with resolution of 4 cm⁻¹ [19].

The sample surface images were morphologically observed and measured by a trinocular optical microscope coupled to a Vision

Plus L2000C camera. From these images the particle size distribution of chitosan microspheres was calculated [20].

The chitosan and microspheres surface areas were determined by adsorption–desorption isotherms, employing a Quantachrome Nova 2200 analyzer and have been previously well detailed [17].

2.4. Interaction between vitamins and chitosan microspheres

The microspheres interactions with the vitamins were promoted in triplicate by suspending 100 mg of microspheres in a 2.0 g dm⁻³ ethanolic solution of α -tocopherol. The reaction mixture was maintained without stirring for 24 h at room temperature and the ethanol was removed by vacuum line at 50 °C during 3 h.

The amount of vitamin adsorbed onto microspheres was determined in a HPLC-UV 920 equipment. The column was a Pursuit 5 C₁₈ (particle diameter: 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm, Varian). Detection wavelength was 229 nm. Column temperature was adjusted to 30 °C. Mobile phase was a methanol/acetonitrile mixture (75:25, v/v), at a 1.0 cm³ min⁻¹ flux. Mobile phase was filtered over a 0.2 μ m size pore membrane (Millipore) and degassed by ultrasound after mixing the solvents.

2.5. Release experiments

To perform the drug delivery trials, 3.0 g of chitosan microspheres modified with α -tocopherol were eluted with 500 cm³ of simulated gastrointestinal (GI) fluids, based on the following solutions: HCl, 0.04 mol dm⁻³, pH 1.2, made isotonic with NaCl; phosphate buffer, pH 6.8, 0.13 mol dm⁻³, made isotonic with NaCl; and phosphate buffer, pH 7.4, 0.13 mol dm⁻³, isotonic. These solutions were used in sequence: the solution at pH 1.2 and that at pH 6.8 for 2 h each; and then the 7.4 pH solution was used until the end of experiment. Following the release tests, the sample was completely depleted of drug by extracting it with 10.0 cm³ of methanol, in order to determine the initial drug content in the microspheres, as the sum of released and extracted amounts [21,22].

The α -tocopherol amounts released from the microspheres at each simulated pH region were determined by collecting samples and performing liquid chromatography analyses in a HPLC-UV 920 system, under the conditions already described in Section 2.4.

3. Results and discussion

3.1. Chitosan microspheres

Chitosan biopolymers differ from pendant groups attached to the common backbone structure, as represented in Fig. 1. The degree of deacetylation (DD) is a distinguishable feature, which can be followed by infrared spectroscopy [23,24]. The DD can be obtained by Eq. (1), through the absorbance ratio between 1655 and 3450 cm⁻¹ wavenumbers of the infrared spectra shown in Fig. 1.

$$\overline{DD} = 100 - \left(\frac{A_{1655}/A_{3450}}{1.33} \times 100 \right) \quad (1)$$

By applying this equation, the DD found was 81.20%, confirming the presence of free amino groups in chitosan, which are capable to form adducts with α -tocopherol molecule [23].

This deacetylation data are very important in order to correctly understand the interaction between α -tocopherol and biopolymers with distinct deacetylation degrees, such as chitosan, due to the fact these polysaccharides only present changes in the acetyl and amino functional groups on their surfaces.

Fig. 1 displays FTIR spectra of chitosan microspheres, vitamin E, and chitosan–vitamin interactions. The main features in the spectra are related to chitosan groups such as: a broad band between

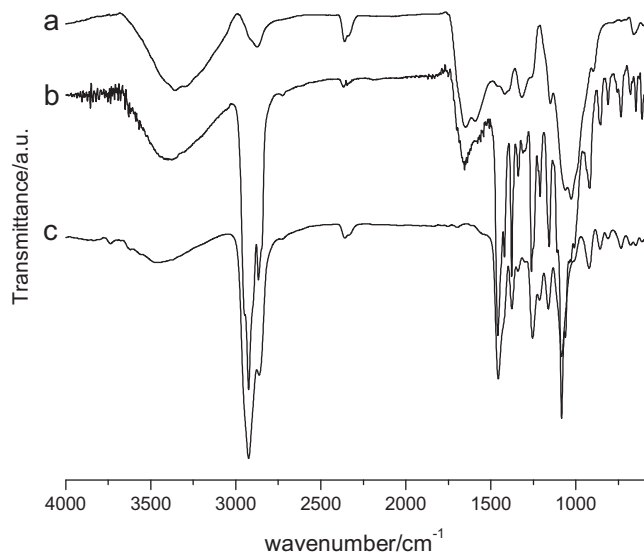


Fig. 1. Infrared spectra of chitosan microspheres (a), chitosan microspheres- α -tocopherol (b), and, α -tocopherol (c).

3400 and 3200 cm^{-1} , associated to O–H and N–H stretches; two peaks at 2950 and 2870 cm^{-1} , related to symmetrical and asymmetrical stretches of sp^3 C–H bonds; an intense band at 1655 cm^{-1} , related to C=O deformation mode of the acetoamide group, originated by an imine (N=C) bond of the crosslinking reaction; a peak at 1562 cm^{-1} , due to an ethylenic bond (C=C); a peak at 1420 cm^{-1} , due to a N–H angular deformation; a shoulder at 1220 cm^{-1} , related to C–OH stretch; and polysaccharides vibrations between 1153 and 890 cm^{-1} [23].

The formation of an imine bond can be better depicted in Fig. 2 which occurs as a result of the modification of some amino groups in chitosan during the crosslinking reaction according to literature [26].

The tocopherol spectrum, Fig. 1(c), shows its characteristic vibration modes: a low intensity broad band at 3500 cm^{-1} , related to O–H stretch; peaks at 3000 cm^{-1} and 2900 cm^{-1} , related to symmetrical and asymmetrical stretches of sp^3 C–H bonds; and the region between 1500 and 1100 cm^{-1} , a feature of the substituted ring.

3.2. α -Tocopherol interaction with chitosan microspheres

In spectrum b of Fig. 1, which is related to α -tocopherol anchored onto chitosan, it can be observed the presence of the shoulder at 1222 cm^{-1} , as better shown in Fig. 3(b). This peak must be related to a hydrogen bond interaction between the groups OH of α -tocopherol and NH_2 of chitosan, which is schematically represented in Fig. 4. In the detail of Fig. 3(b), the marked peak is a dislocated tocopherol peak at 1210 and 1225 cm^{-1} , related to a strengthening in the interaction involving the C–O group of the α -tocopherol C–O–H bond, which represents a decrease in energy bond of the O–H phenolic group in α -tocopherol. This means that the vitamin must be bound to amino groups present in chitosan by hydrogen bonds, as represented in Fig. 4 and more detailed elsewhere [17].

A typical optical image of the chitosan microspheres modified with α -tocopherol can be seen in Fig. 5. This image reveals that the average particle size of particle single bead is homogeneous and globular. The equipment allows the determination of the spheres' medium diameter, which is $128 \pm 18 \mu\text{m}$. The particle size distribution pattern of the microspheres is shown in Fig. 6.

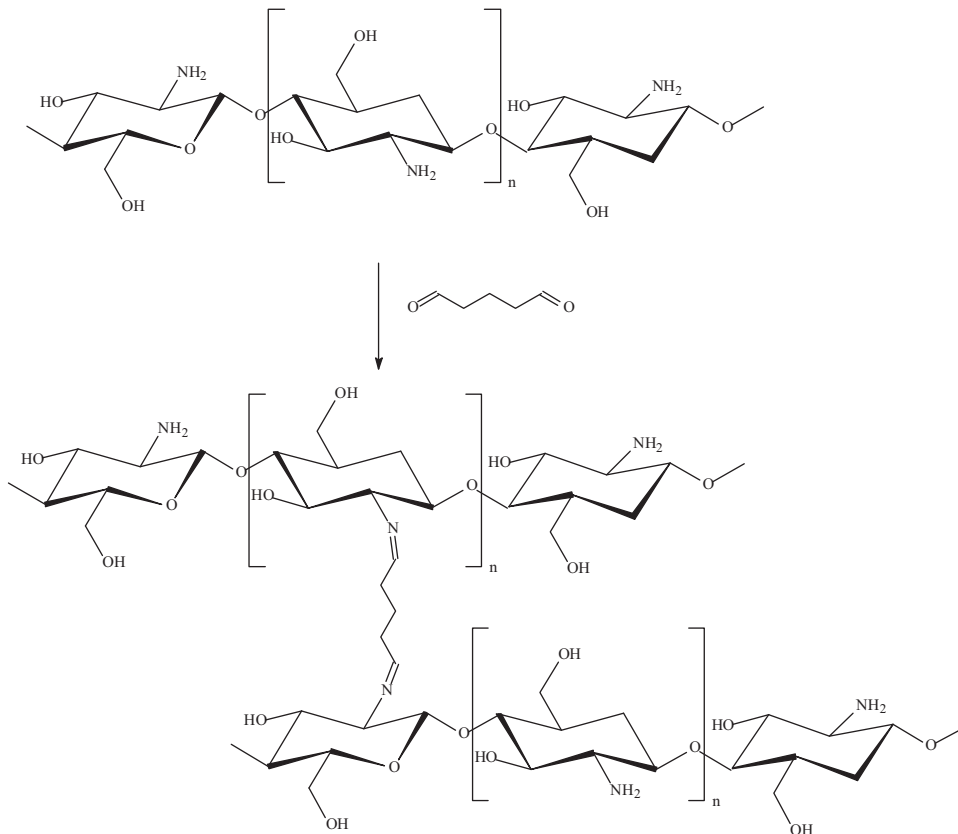


Fig. 2. Imine bond formation during crosslinking reaction.

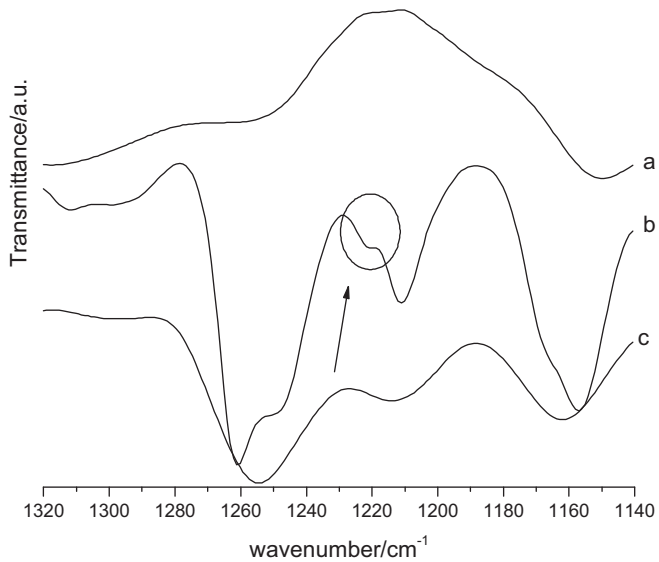


Fig. 3. The zoom of FTIR region of chitosan (a), presenting the effects in structure caused by interaction between chitosan- α -tocopherol (b), and α -tocopherol spectra (c).

The amount of α -tocopherol anchored on the microspheres after 24 h of reaction was determined by HPLC, and the result is displayed in Fig. 7.

The result obtained indicates that 13.4 ± 0.4 mg of α -tocopherol were adsorbed per one gram of chitosan microspheres. As expected, this value corroborates with FTIR spectra data, showing an effective adsorption of the drug onto the polymer. Although heating for ethanol removal (50°C) could denature vitamin E activity, interpretations from FTIR combined with the results from HPLC-UV appear no significant changes in tocopherol structure.

3.3. *In vitro* α -tocopherol release

The general consensus in healthy adult humans is that pH range in the stomach is 1–3. After meal intake, pH in the stomach generally rises due to dietary contents buffering effects. On the other hand, under continuous secretion of gastric acid, pH value trends back down to baseline over a period of several hours [25,27]. pH values in the duodenum in fasted state tend to reach neutral pH (pH 6–6.5) [25,27], whilst in the distal ileum (intestine) pH values appear to remain stable at about pH 7.5 [28]. Therefore, tocopherol

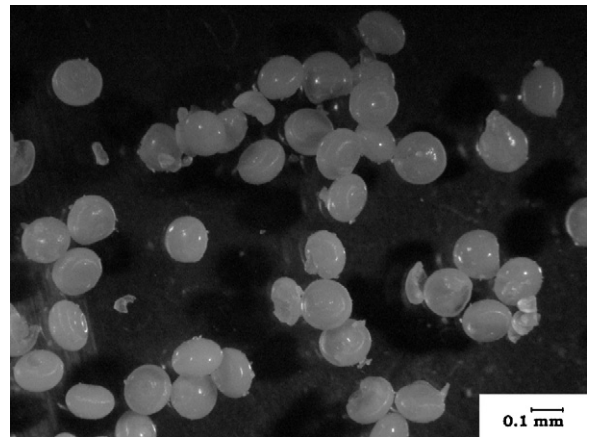


Fig. 5. Optical microscopy image of the chitosan microspheres modified with α -tocopherol.

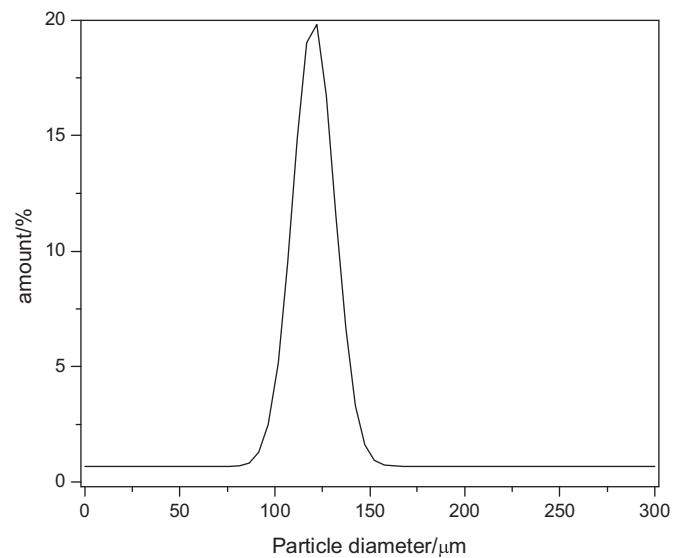


Fig. 6. Particle size distribution curve for chitosan microspheres.

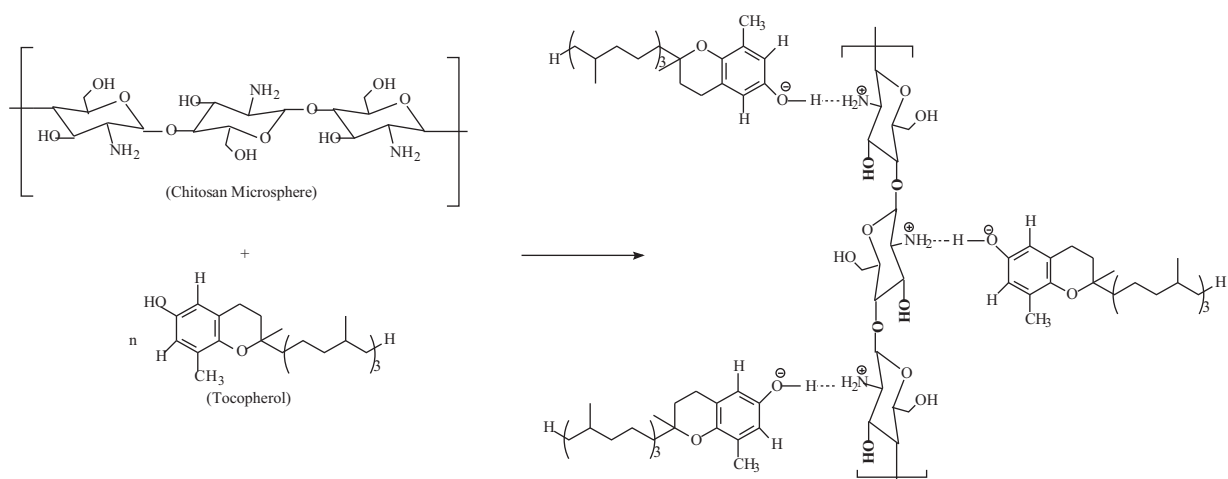


Fig. 4. Schematically representation of the interaction between chitosan microspheres and α -tocopherol.

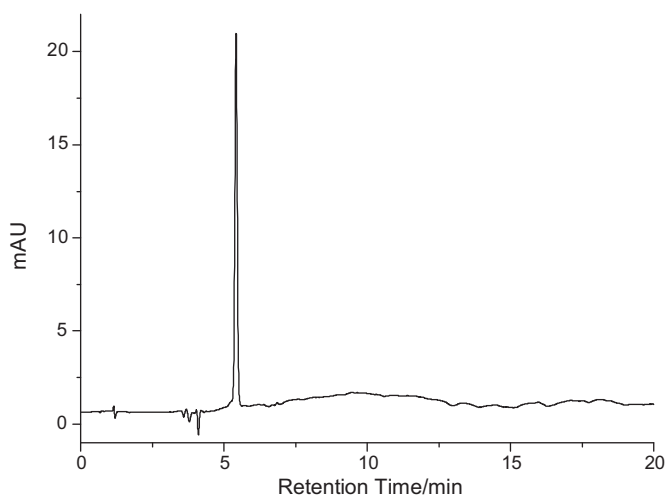


Fig. 7. HPLC-UV α -tocopherol chromatogram.

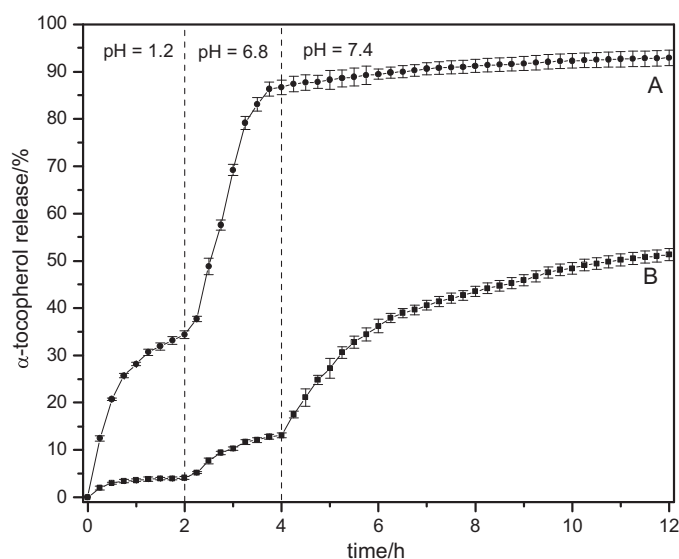


Fig. 9. *In vitro* gastrointestinal release profiles for α -tocopherol solubilization (A) and for α -tocopherol anchored onto chitosan microspheres (B); error bar is based on SD, $n=3$.

release from chitosan microspheres must be a process through these distinct pH values.

The released tocopherol amount was quantified in an HPLC analyzer by obtaining aliquots at each 15 min, whose profiles are displayed in Fig. 8.

Fig. 9 shows that pure tocopherol presented low solubilization at pH 1.2, with a smooth landing. Above this pH value, solubilization increased up to 3.5 h at pH 6.8 reaching 92.88%. The designed CRS based on immobilizing tocopherol onto chitosan microspheres presented 3 distinct established regions. One at pH 1.2, reaching maximum at 1.75 h with 4.00% of release; other at pH 6.8 reaching maximum at 3.75 h with 12.80% of release and the last one at pH 7.4, reaching maximum at 12 h with 51.30% of release. These graphs corroborate the success of the designed CRS on delivering the vitamin at a lower rate.

α -Tocopherol release from chitosan microspheres is consistent with digestion and absorption processes, which occur primarily in the stomach and duodenum, with major release at the proximal part of the small intestine. *In vitro* experiments followed this trend, reassuring the material's ability to sustain nutritional balance [27].

It must be noticed that not all α -tocopherol was desorbed, and during 12 h, only 51.30% of the vitamin was released, proving that immobilizing vitamin E onto the chitosan matrix may lead to a controlled release into human body.

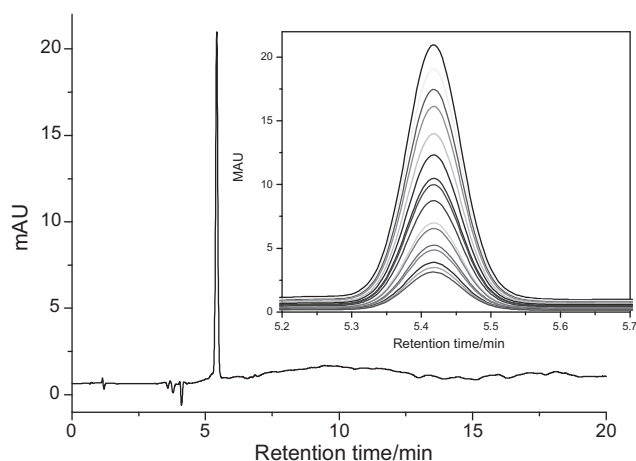


Fig. 8. Tocopherol release chromatogram and amplifications in different concentrations.

4. Conclusion

The chitosan microspheres modified with tocopherol showed they can be used in oral formulations for people with vitamin E deficiency. The simulated modeling study performed in this work revealed small amounts of α -tocopherol released into stomach region and larger amounts released within the mimicked intestinal area, as expected and in accordance to literature. Therefore, the modified chitosan microspheres positively answered to some initial assumptions of this work, which consisted in making this material viable for vitamin oral supply, avoiding the side effects of hypo and supratherapeutic doses. The results reinforce the development of a new multidisciplinary science, and offer a new alternative to people with deficiency in vitamin E.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support and fellowships given by FAP-DF, CNPq and CAPES-REUNI.

References

- [1] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, J. Controlled Release 100 (2004) 5.
- [2] J.B. Dressman, M. Vertzoni, K. Goumas, C. Reppas, Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (2007) 591.
- [3] K.E. Mason, J. Nutr. 1 (4) (1925) 312.
- [4] Office of Dietary Supplements USA, <http://ods.od.nih.gov/HealthInformation/> (accessed November 2011).
- [5] Q. Jiang, S. Christen, M.K. Shigenaga, B.N. Ames, Am. J. Clin. Nutr. 74 (2001) 714.
- [6] K.J.F. Oliveira, J.C. Koury, C.M. Donangelo, Rev. Nutr. 20 (2007) 171.
- [7] S.K. Khetan, T.J. Collins, Chem. Rev. 107 (2007) 2319.
- [8] L.A.S. Romeiro, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, Quím. Nova 26 (2003) 347.
- [9] E.A. Faria, A.G.S. Prado, React. Funct. Polym. 67 (2007) 655.
- [10] S. Kaihara, Y. Suzuki, K. Fujimoto, Colloids Surf. B 85 (2011) 343.
- [11] R.B. Oliveira, E.M. Lima, Rev. Electr. Farm. 3 (2006) 29.
- [12] M. Rios, Pharm. Technol. 29 (2005) 42.
- [13] F. Chellat, Y. Merhi, A. Moreau, L. Yahia, Biomaterials 26 (2005) 7260.
- [14] Y. Luo, B. Zhang, M. Whent, L. Yu, Q. Wang, Colloids Surf. B 85 (2011) 145.
- [15] A. Alishahi, A. Mirvaghefi, M.R. Tehrani, H. Farahmand, S.A. Shojaosadati, F.A. Dorkoosh, M.Z. Elsabee, Food Chem. 126 (2011) 935.
- [16] S. Xin-Yuan, T. Tian-Wei, Biomaterials 23 (2002) 4469.
- [17] A.G.S. Prado, A.L.F. Santos, C.P. Pedroso, T.O. Carvalho, L.R. Braga, S.M. Evangelista, J. Therm. Anal. Calorim. 106 (2011) 415.

- [18] A.G.S. Prado, I.C. Pescara, S.M. Evangelista, M.S. Holanda, R.D.A. Andrade, P.A.Z. Suarez, L.F. Zara, *Talanta* 84 (3) (2011) 759.
- [19] J.D. Torres, E.A. Faria, J.R. SouzaDe, A.G.S. Prado, *J. Photochem. Photobiol. A* 182 (2006) 202.
- [20] S.B. Patil, K.K. Sawant, *Colloids Surf. B* 84 (2011) 384.
- [21] L. Liang, V.L.S. Line, G.E. Remondetto, M. Subirade, *Int. Dairy J.* 20 (2010) 176–181.
- [22] V. Carelli, S. Coltelli, G. Di Colo, E. Nannipieri, M.F. Serafini, *Int. J. Pharm.* 179 (1999) 73–83.
- [23] A.G.S. Prado, J.L. Macedo, S.C.L. Dias, J.A. Dias, *Colloids Surf. B* 35 (2004) 23.
- [24] A.G.S. Prado, J.D. Torres, E.A. Faria, S.C.L. Dias, *J. Colloid Interface Sci.* 277 (2004) 43.
- [25] J.B. Dressman, R.R. Berardi, L.C. Dermentzoglou, T.L. Russell, S.P. Schmaltz, J.L. Barnett, K.M. Jarvenpaa, *Pharm. Res.* 7 (1990) 756.
- [26] O.A.C. Monteiro Jr., C. Airoidi, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 119.
- [27] L. Kalantzi, K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, J. Dressman, C. Reppas, *Pharm. Res.* 23 (2006) 165.
- [28] D.F. Evans, G. Pye, R. Bramley, A.G. Clark, T.J. Dyson, J.D. Hardcastle, *Gut* 29 (1988) 1035.

Vitamin A and vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres

A calorimetric view

Alexandre G. S. Prado · André L. F. Santos ·
Carolina P. Pedroso · Thiago O. Carvalho ·
Lilian R. Braga · Sheila M. Evangelista

CBRATEC7 Conference Special Issue
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2011

Abstract Chitosan is a biodegradable natural polymer with great potential for pharmaceutical applications due to its biocompatibility, high charge density, and non-toxicity. In this study, chitosan microspheres were successfully prepared by an adapted method of coagulation/dispersion. The degree of deacetylation of chitosan powder was obtained by NMR ^1H and FTIR techniques. Chitosan powder and chitosan microspheres were characterized by BET surface area and scanning electron microscopy (SEM). The interactions among the chitosan microspheres and the vitamins A and E were characterized by FTIR. In order to evaluate the ability of interaction of vitamin A and vitamin E with the chitosan microspheres, the thermodynamic parameters were followed by calorimetric titration. Different experimental approaches were applied, such as adsorption isotherms, kinetics and thermodynamics studies. The obtained results showed that the interactions of chitosan microspheres with the vitamins were spontaneous, enthalpically and entropically favorable, indicating that the chitosan microspheres can be used with success in the controlled release of these vitamins.

Keywords Calorimetry · Chitosan · Vitamins

Introduction

The beauty industry represents a major share in the global market, which has a large growth in recent years. The

biggest market for cosmetics is the U.S. with 15.6% of the market followed by Japan with 10.1% and Brazil with 8.6% of the world. The Brazilian toiletry, perfumery, and cosmetics are an important industrial area corresponding to 5.4% of Brazilian GDP. Sales of cosmetics industry have grown exponentially in Brazil, reaching a turnover of 11.9 billion U.S. dollars in 2008, as shown in Fig. 1 [1]. Cosmetics also have an essential role in Brazilian trade balance. Brazil exported 160.6 million dollars and imported 120.6 million in personal care products and beauty, reaching a surplus of 40 million in 2007. Among the various types of cosmetics, skin creams have an important part of this growing market. Vitamins are among the main compounds used to develop cosmetics.

Vitamins are essential compounds for many functions of the human organism. The most important are vitamins A, B, C, D, E, and K, as well as folic acid. Besides their specific functions, certain vitamins are useful for prevention, being used as drugs or cosmetic products [2]. Vitamin A (also called retinol) has been shown to improve depigmentation of photodamaged skin [3]. Vitamin E contributes to the antioxidant defense of the skin, absorbing UV-light in the solar spectrum region that is responsible for most of the deleterious biologic effects of the sun [4, 5]. Despite the efficacy of retinoic acid and tocopherol, there are some limitations in their uses in cosmetics, such as low water solubility, instability in the presence of light and oxygen, and the occurrence of reactions of local irritation such as erythema, xerosis, and mild scaling [6, 7]. To avoid this problem, these vitamins can be immobilized in chitosan microspheres in order to reduce its degradation by the heat and light. Then, the chitosan microspheres can be a viable alternative channel for retinoic acid and tocopherol in the skin to minimize irritation produced when used topically, because of their

A. G. S. Prado (✉) · A. L. F. Santos · C. P. Pedroso ·
T. O. Carvalho · L. R. Braga · S. M. Evangelista
QuiCSI Team, Institute of Chemistry, University of Brasilia,
C.P. 4478, Brasilia, DF 70904-970, Brazil
e-mail: agspradus@gmail.com



Agro-industrial residues as low-price feedstock for diesel-like fuel production by thermal cracking

Andre L.F. Santos, Danilo U. Martins, Osvaldo K. Iha, Rafael A.M. Ribeiro, Rafael L. Quirino, Paulo A.Z. Suarez *

Laboratório de Materiais e Combustíveis, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70910-970 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2008

Received in revised form 22 February 2010

Accepted 22 February 2010

Available online 19 March 2010

Keywords:

Pyrolysis

Biofuels

Fatty waste feedstock

ABSTRACT

Pyrolysis of industrial fatty wastes (soybean soapstock, beef tallow, and poultry industry waste) was carried out in the absence of catalysts. In all cases, organic mixtures of hydrocarbons and oxygenated compounds were obtained. These mixtures were distilled and diesel-like fractions were isolated and characterized by GC-FID, GC-MS and FT-IR, showing the formation of olefins, paraffins, and some oxygenated compounds such as carboxylic acids and esters. The main physical–chemical properties of those isolated diesel-like fuels (density, viscosity, distillation curve, carbon residue, copper corrosion test, cetane index, cold finger plugging point, acid index and heating value) were determined using ASTM standard methods and matched the Brazilian specification for diesel fuel.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since the Industrial Revolution in the 19th century, the world energy resources are being based mostly upon fossil fuels, at first coal and lately petroleum and natural gas. Those fossil fuels have some disadvantages such as: (i) they are concentrated in few and problematic regions of the world; (ii) showed sporadic shortages and are in an imminent risk of running out; and (iii) are associated to pollutant gases (aromatic compounds, CO_x, NO_x, and SO_x) emissions into the atmosphere (Crabbe et al., 2001) which are assigned to greenhouse and global warming effect.

For these reasons, the search for alternative fuels has been accelerated in the last decades, being one possibility the use of biomass (Muniyappa et al., 1996). For instance, in Brazil during 1970 and 1980 decades, due to the oil shortage, a national program based on alcohol fuel obtained from sugar cane was established in order to completely replace gasoline or to produce ethanol/gasoline blends (Goldemberg et al., 2004). At that time another national program was started in order to substitute diesel fuel by triglyceride derivatives but unfortunately this one was not implemented. However, this program was recently revived and all Brazilian diesel fuel is now blended with fatty acid methyl or ethyl esters (Pousa et al., 2007).

The use of industrial residues derived from oils and fats (biomass) to produce renewable biofuels has remarkable economical and environmental appeals. One important thing is the possibility of using low-cost feedstocks that could increase the economical

feasibility of biofuels, which is still in question. There is an increasing pressure from society, media and governments over the industrial sector to adopt procedures that minimize the industrial residues either by reusing or recycling them, resulting in energetic and environmental benefits. In other words, the use of fatty acid-based biomass from agro-industries to obtain energy could be a direct or indirect form of improving energetic balance, reducing non-renewable energy resources consumption, and reducing residues as well as improving the sustainability of the agribusiness.

The main route to produce biofuels from fatty materials is the alcoholysis or transesterification of triacylglycerides using a mono-alcohol, usually methanol, to form traditional biodiesel using base (Haas et al., 2004; Zhou et al., 2003), acid (Di Serio et al., 2005), thermal (Polavka et al., 2005), enzymatic (Xu et al., 2003), heterogeneous (Abreu et al., 2005; Macedo et al., 2006; Suppes et al., 2004; Tesser et al., 2005) or two-phase (Neto et al., 2007) catalysis. Although this route is commonly practiced, it has some important drawbacks, and the main one is the necessity of high-quality raw material in order to guarantee high reaction yields and the purity of biodiesel required to match its specification. Indeed, most technologies available in the market require edible fats and oils or pretreatment, which compromise the profitability of the process.

Thus, the search for alternative processes able to use low quality feedstocks become important in order to improve the biofuels industry. Indeed, different technologies have been reported in the last years such as esterification/hydro-esterification (Brito et al., 2008), hydrocracking (Gusmão et al., 1989) and pyrolysis (Arvanitoyannis et al., 2007; Demirbas and Dincer, 2008; Huber and Corma, 2007; Maher et al., 2008; Tian et al., 2008). The cracking or

* Corresponding author. Tel.: +55 61 31073850; fax: +55 61 32734149.
E-mail address: psuarez@unb.br (P.A.Z. Suarez).

BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DE ÓLEOS E GORDURAS: DESAFIOS TECNOLÓGICOS PARA VIABILIZÁ-LOS**Paulo A. Z. Suarez*, André L. F. Santos, Juliana P. Rodrigues e Melquizedeque B. Alves**

Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70910-970 Brasília – DF, Brasil

Recebido em 28/1/09; aceito em 3/3/09; publicado na web em 17/3/09

OILS AND FATS BASED BIOFUELS: TECHNOLOGICAL CHALLENGES. Periodically, during petroleum shortage, fatty acids and their derivatives have been used as alternative fuels to those derived from petroleum. Different approaches have been proposed, including the use of neat fats and oils or their derivatives. Indeed, the utilization of biodiesel produced by alcoholysis of triacylglycerides or esterification of fatty acids, or hydrocarbons obtained from cracking of fatty materials were studied and used in several countries. Increasing concerns about energy security and climate changes have lead several countries, including Brazil, to start up biofuels programs. Different technologies are currently being developed in order to produce biofuels with economical feasibility. In this work are discussed alternative fatty raw-materials and processing technologies that are currently being studied in order to produce fuels suitable to sustainable substitute diesel fuel.

Keywords: biodiesel; pyrolysis; transesterification.

INTRODUÇÃO

A crise do petróleo que se instaurou nas últimas décadas, aliada ao aumento da demanda por combustíveis e à crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo.^{1,2} As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, o que coloca a biomassa em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo.³

Além do desenvolvimento científico e tecnológico, uma questão que permeia a utilização de biomassa para produzir combustível é o dilema entre a segurança alimentar e energética. Se, por um lado, Brasil e Estados Unidos incentivam a produção dos biocombustíveis chamados de primeira geração, tais como álcool e biodiesel, por outro lado diversos países e organismos internacionais mostram a preocupação no aumento da crise mundial dos alimentos, argumentando que ela foi agravada pelo deslocamento das áreas tradicionalmente utilizadas para o cultivo de alimentos para a produção de insumos destinados à indústria dos biocombustíveis.

No atual estado da arte é provável que em muitos países ocorra o deslocamento das áreas destinadas à produção de alimentos para que se possa produzir biocombustíveis, mas no Brasil há várias opções viáveis para que não haja tal problema. Por exemplo, pastagens já abandonadas pela agropecuária no Centro-oeste ou áreas degradadas da Amazônia poderiam servir, respectivamente, de terras para o plantio de cana-de-açúcar e palmeiras oleaginosas destinadas à produção dos biocombustíveis, sem prejudicar a produção de alimentos. Vale ressaltar, ainda, que o Brasil detém tecnologia altamente eficiente para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Segundo estimativa do IBGE, em 2008 todo o complexo da cana-de-açúcar ocupou apenas 13,35% da área utilizada para agricultura no Brasil,⁴ sendo suficiente para produzir o açúcar para abastecer o nosso consumo interno e exportação e suprir a nossa demanda crescente por etanol combustível.

Em suma, a realidade brasileira garante alguma tranquilidade no que diz respeito à disponibilidade de áreas para o cultivo de

matérias-primas dos biocombustíveis para abastecer o mercado local, mas a maioria dos países apresenta problemas potenciais de impacto na produção de alimentos. Esta conjuntura torna imperativo o desenvolvimento de novas tecnologias e a busca por matérias-primas alternativas no sentido de melhorar a produção energética e o potencial econômico em relação ao biodiesel ou ao álcool, dentro de um modelo sustentável e capaz de suprir a demanda por alimentos. Há um esforço mundial neste sentido que é compartilhado pelo Brasil porque, apesar de não haver aparente risco de segurança alimentar, o avanço tecnológico poderá permitir ao nosso país se firmar como um dos líderes mundiais na produção de biocombustíveis sem prejudicar a nossa produção de alimentos.

No que diz respeito às matérias-primas para a produção dos biocombustíveis de primeira geração (biodiesel e álcool), uma primeira idéia foi utilizar resíduos domésticos e agroindustriais de baixo valor agregado. As primeiras rotas alternativas a serem exploradas no Brasil, e que já estão em funcionamento comercial, foram o uso de óleos residuais de frituras⁵ e a esterificação de ácidos graxos,⁶ que permitem a produção de biodiesel utilizando passivos ambientais de residências ou restaurantes e das indústrias de processamento de óleos e gorduras. Menos adiantadas, existem também diversas pesquisas para obtenção de álcool a partir de resíduos celulósicos, principalmente utilizando bagaços e palhas oriundos do setor agroindustrial. Mais recentemente, diversos estudos têm reportado, na mídia e literatura especializada, o potencial de fontes oleaginosas não usuais, não raro consorciando oleaginosas perenes, como a macaúba e o pinhão-manso, com produção de gado e grãos, ou, ainda, o desenvolvimento de biorreatores para a produção de óleos a partir de algas.

As rotas de obtenção dos chamados biocombustíveis de segunda geração, tais como a produção de hidrocarbonetos a partir de materiais graxos, também têm sido investigadas. Os processos alternativos mais discutidos atualmente no Brasil são o craqueamento, o hidrocrackeamento (H-Bio) e o eletrocrackeamento. Estas rotas têm a vantagem de permitir o uso de insumos residuais de baixa pureza e baixo custo.

Neste trabalho pretende-se abordar questões relacionadas às tecnologias que estão sendo estudadas no sentido de produzir combustíveis alternativos passíveis de serem utilizados como substitutos ao diesel fóssil utilizando como matérias-primas ácidos graxos e seus derivados.

*e-mail: psuarez@unb.br

Viewpoint

History and policy of biodiesel in Brazil

Gabriella P.A.G. Pousa, André L.F. Santos, Paulo A.Z. Suarez*

Laboratório de Materiais e Combustíveis, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70919-970 Brasília-DF, Brazil

Received 20 March 2007; accepted 9 May 2007

Available online 12 July 2007

Abstract

Historically, during petroleum shortage, vegetable oils and their derivatives have been proposed as alternatives to petroleum diesel fuel. Since 1930, different approaches have been proposed by Brazilian's universities and research institutes, including the use of neat vegetable oils (pure or in blends) or their derivatives, such as hydrocarbons obtained by thermal-catalytic cracking and fatty acids' methyl or ethyl esters (nowadays known as "biodiesel") produced by alcoholysis. Recently, the external dependence on imported diesel fuel and the present petroleum crisis have increased the discussion in Brazil in the sense of starting to use alternatives to diesel fuel, biodiesel being the main alternative for a large petroleum diesel substitution program.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Brazil; Biodiesel; Renewable energy

1. Brief history of usage of oils and fats as fuel in Brazil

The first record of the use of vegetable oils as liquid fuels in internal combustion engines is from 1900 when Rudolf Diesel used peanut oil (Shay, 1993). However, because of its low cost and easy availability, petroleum became the dominant energy source and petroleum diesel was then developed as the primary fuel for diesel engines. Nonetheless, petroleum and its derivatives fuels have periodically been through short supply and, consequently, the search for alternative energy sources has emerged (Parente, 2003; Schuchardt et al., 1998; Zanin et al., 2000). Thus, in the 1930s and 1940s, neat vegetable oils were used in diesel engines under an emergency situation (Ma and Hanna, 1999). At that time, the pyrolysis of different triglycerides was also used for liquid fuel supply in different countries. For example, hydrocarbons were produced in China by a tung oil pyrolysis batch system and used as liquid fuels (Chang and Wan, 1947). Another approach proposed at this time was the use of fatty acids' ethyl or methyl esters, obtained by transesterification or alcoholysis of vegetable

oils (Chavanne, 1937, 1942) or esterification of fatty acids combined with transesterification of triglycerides (Keim, 1945). Furthermore, the petroleum international crises in the 1970s and 1990s, as well as an increasing concern about the depletion of the world's non-renewable resources and environmental awareness, provided new enthusiasm in the search for renewable fuel sources (Hill, 2000; Parente, 2003; Schuchardt et al., 2001).

In Brazil, this history was not different. During the 1940 decade occurred our first attempts of energy exploitation from oils and fats in internal combustion engines. Indeed, there are reports of many studies about the use of neat vegetable oils, such as babassu, coconut, castor seed and cotton seed (for instance, see Borges, 1944), or hydrocarbons produced by their thermal-catalytic cracking (Otto, 1945). It is worth mentioning that during the Second World War the exportation of cottonseed oil, which was the main vegetable oil produced in Brazil at that time, was forbidden in order to force a drop in its price and, thus, to make possible its use as fuel in trains (Chemical & Metallurgical Engineering, 1943), which is probably the first governmental program concerning the use of biofuels.

Afterwards, in response to the petroleum shortage during the decades of 1970 and 1980, Brazil's Federal Government created in the 1980s a program called

*Corresponding author. Tel.: +55 61 33072162.

E-mail address: psuarez@unb.br (P.A.Z. Suarez).