

GISLENE MARI FUJIWARA

MICROENCAPSULAÇÃO DE ESTIGMASTEROL UTILIZANDO ALGINATO DE  
SÓDIO, QUITOSANA E AMIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby Zanin  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2012

Fujiwara, Gislene Mari

Microencapsulação de estigmasterol utilizando alginato de sódio, quitosana e amido / Gislene Mari Fujiwara. – Curitiba, 2012.

119f.: Il. (algumas color.); 30cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby Zanin

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. Micropartículas. 2. Estigmasterol. 3. Alginato. 4. Quitosana.  
5. Amido. I. Zanin, Sandra Maria Warumby. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

# TERMO DE APROVAÇÃO

**GISLENE MARI FUJIWARA**

**Título: MICROENCAPSULAÇÃO DE ESTIGMASTEROL  
UTILIZANDO ALGINATO DE SÓDIO, QUITOSANA E AMIDO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Prof.ª. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin  
Orientadora

  
Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Francisco de Assis Marques  
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de março de 2012.

Aos meus pais Susumi (*in memoriam*) e Diva,  
pela dedicação e amor incondicional.  
Aos meus irmãos, Elaine e Renato, pelo  
incentivo e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre presente em minha vida.

À minha família, sem a qual não venceria tantas batalhas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby Zanin, orientadora e amiga, pelo incentivo à realização do trabalho e colaboração na discussão dos resultados; ao seu esposo, Pedro Zannin, pela confiança, dedicação e comprometimento; e aos seus filhos Rafael e Daniel, pela paciência e acolhida durante todo o trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel e ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela colaboração e palavras oportunas nos momentos difíceis.

As professoras Camila Klocker Costa, Josiane de Fátima Gáspari Dias e Grace Wille, pelo apoio dado ao meu crescimento profissional.

À equipe da Farmácia Escola, os farmacêuticos José Miguel e Maria Cristina, e os técnicos Alexandre, Marilene e Teresa, pelo incentivo, compreensão e suporte durante esta jornada.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacotécnica e Fitoquímica, em especial Ranieri Campos, Milena Kalegari, Cristiane de Paula, Vanessa Canteli e Cristiane Bezerra da Silva, pela colaboração durante as análises.

Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana pela primeira amostra de alginato de sódio cedido ao laboratório de Farmacotécnica e empréstimo do liofilizador.

A FMC Biopolymer do Brasil; a Saporiti do Brasil Ltda; e a Rafael Zannin, pela gentileza e apoio ao fornecer o alginato de sódio.

Ao Prof. MSc. Jorge Guido Chociai e à Maria de Jesus, pelo empréstimo de equipamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sandra Mara Woranovicz Barreira pelo empréstimo do laboratório.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelas imagens obtidas.

Aos colegas farmacêuticos, Gabriel Kaminski, Daniella Sasso e Margani Fin, e aos acadêmicos Caio Tibério e Elen Wataya pela importante colaboração durante os trabalhos.

Às minhas irmãs de coração, Lucianita e Elza, pela amizade sincera, carinho e apoio, tanto na vida profissional quanto pessoal.

A todos os meus amigos, colegas e professores que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

O sucesso nasce do querer, da determinação  
e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e  
vence obstáculos, no mínimo fará coisas  
admiráveis.

José de Alencar

## RESUMO

O estigmasterol é um fitoesterol presente em numerosas espécies vegetais, cuja principal ação farmacológica é a hipocolesterolêmica. Apresenta também atividades antioxidante, hipoglicemiante, antimutagênica, antinociceptiva e anti-inflamatória. Possui estrutura química semelhante ao colesterol e, da mesma forma, está susceptível à oxidação quando exposta ao ar, sendo esta aumentada com o calor e a umidade. A tecnologia de microencapsulação apresenta-se como uma forma viável de evitar o processo de oxidação, permitindo a incorporação do estigmasterol em diversas formas farmacêuticas e aumentar sua absorção. A microencapsulação foi realizada pelas técnicas de gelificação iônica externa e interna, com o intuito de determinar o melhor o processo de obtenção das micropartículas. Foi utilizado como material de revestimento, uma mistura de polímeros composta de alginato de sódio, amido de milho e quitosana, com o processo de uma etapa para recobrimento das micropartículas de alginato de cálcio com quitosana. As micropartículas produzidas foram avaliadas quanto ao rendimento de produção de micropartículas, tamanho, morfologia e eficiência de encapsulação. As análises foram realizadas em triplicata, confrontando os resultados com uma solução clorofórmica de estigmasterol solubilizado em óleo de canola, sendo avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey, com  $p < 0,05$  para indicar significância estatística. Os resultados obtidos apontam que a técnica de gelificação iônica interna é um processo no qual as micropartículas obtidas apresentam tamanho reduzido, não dependente do sistema extrusor e com formato esférico. Porém, apresenta dificuldade no processo de lavagem das mesmas, sendo necessário o desenvolvimento de técnica adequada para o mesmo. O processo de gelificação iônica externa apresentou rendimento de produção de 94,87%, micropartículas com formato esférico, com tamanho aproximado de 1,4mm e eficiência média de encapsulação de 90,42%, mostrando ser uma técnica viável para a microencapsulação do estigmasterol.

Palavras-chaves: Estigmasterol. Microencapsulamento. Alginato. Quitosana. Amido.



## ABSTRACT

Stigmasterol is a phytosterol present in several plant species. While its main pharmacological action is hypocholesterolemic, stigmasterol also shows antioxidant, hypoglycemic, antimutagenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities. Its chemical structure is similar to cholesterol and, similarly, it is also susceptible to oxidation when exposed to air. Such process is increased by heat and humidity. Microencapsulation technology is a viable way to avoid oxidation, as it allows stigmasterol to be added to several pharmaceutical forms while its absorption is increased. Microencapsulation was achieved with external and internal gelation techniques, in order to determine the best process to obtain the particles. The coating material is a blend of polymers made of sodium alginate, starch and chitosan, with a one-stage process to coat the alginate particles with chitosan. The microparticles produced were evaluated according to their size, morphology and encapsulation efficiency. Each analysis was carried out three times and the results were compared with a chloroform stigmasterol solution solubilized in canola oil. Statistical significance is determined through Tukey's test with  $p < 0.05$ . The results show that the microparticles obtained with internal gelation exhibit reduced size and spherical shape, and are independent of the extruder system. Nevertheless, adequate technique is needed in order to wash the microparticles properly, since such procedure is potentially harmful. The productivity with external gelation was 94.87%. The microparticles were spherical, 1.4- $\mu$ m small with average encapsulation efficiency of 90.42%, which means it is a viable technique for stigmasterol encapsulation.

Key words: Stigmasterol. Microencapsulation. Alginate. Chitosan. Starch.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS ESTERÓIDES COM CADEIA LATERAL LIGADA AO C-17 .....	22
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO COLESTEROL E DE ALGUNS FITOESTERÓIS .....	22
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DO 4-MONOMETILESTEROL, 4-DIMETILESTEROL E 4-DESMETILESTEROL .....	23
FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS ESTERÓIS E ESTANÓIS.....	23
FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE FITOESTERÓIS E OUTROS TRITERPENOS .....	25
FIGURA 6 - VIAS DE AUTOXIDAÇÃO DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO B-SITOSTEROL .....	34
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIGMASTEROL .....	36
FIGURA 8 - MICROESFERAS (A) E MICROCÁPSULAS (B) .....	40
FIGURA 9 - COMPOSIÇÃO DE ALGINATOS.....	46
FIGURA 10 - LIGAÇÃO ENTRE AS CADEIAS HOMOPOLIMÉRICAS ATRAVÉS DOS ÍONS CÁLCIO SITUADOS ENTRE OS GRUPOS COM CARGA NEGATIVA .....	47
FIGURA 11 - REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA .....	49
FIGURA 12 – ESQUEMA DO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA .....	62
FIGURA 13 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA .....	64
FIGURA 14 - MICROPARTÍCULAS SEM AMIDO LIOFILIZADAS, AO MO (AUMENTO 40X) .....	86
FIGURA 15 - MICROPARTÍCULAS SEM AMIDO LIOFILIZADAS, AO MEV (AUMENTO 350X) .....	86
FIGURA 16 - MICROPARTÍCULA SEM AMIDO SECA EM COLUNA DE AR, AO MO (AUMENTO 40X) .....	87
FIGURA 17 - MICROPARTÍCULA COM AMIDO LIOFILIZADA, AO MO (AUMENTO 40X) .....	87
FIGURA 18 - MICROPARTÍCULAS COM AMIDO SECAS EM COLUNA DE AR, AO MEV (AUMENTO 150X).....	88
FIGURA 19 – MICROPARTÍCULAS ÚMIDAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA .....	89
FIGURA 20 - MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS COM SOLUÇÃO DE ALGINATO 3,0% + CaCO <sub>3</sub> 3,75% .....	90
FIGURA 21 - MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO INTERNA, AO MEV (180X).....	91
FIGURA 22 – REAÇÃO SALKOWSKI POSITIVA .....	95
FIGURA 23 – REAÇÃO DE LIEBERMANN-BURCHARD POSITIVA.....	95
FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ST POR CCD APÓS SAPONIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE ÓLEO .....	96

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA DA QUITOSANA ....	73
GRÁFICO 2 – VISCOSIDADE REDUZIDA <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA DILUÍDA EM SOLUÇÃO 0,3 M CH <sub>3</sub> COOH / 0,2 M CH <sub>3</sub> COONa, 25°C + 0,1°C .....	75
GRÁFICO 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DIRETA DE ST EM ÓLEO DE CANOLA.....	97
GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA OBTIDA PELA QUANTIFICAÇÃO DE ST NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO DE CANOLA .....	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FORMULAÇÕES PARA GELIFICAÇÃO EXTERNA .....	61
TABELA 2 – FORMULAÇÕES PARA GELIFICAÇÃO INTERNA.....	63
TABELA 3 – RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR GELIFICAÇÃO EXTERNA .....	88
TABELA 4 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO .....	93
TABELA 5 – DADOS OBTIDOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ST DIRETAMENTE NO ÓLEO DE ÓLEO DE CANOLA.....	98
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO DE ST (mg/g) OBTIDA PELA QUANTIFICAÇÃO DIRETA NO ÓLEO RECUPERADO DAS MICROPARTÍCULAS.....	98
TABELA 7 – DADOS OBTIDOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ST NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO DE CANOLA.....	99
TABELA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE ST (mg/g) ENCAPSULADO PELOS MÉTODOS DIRETO NO ÓLEO E NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO RECUPERADO DAS MICROPARTÍCULAS .....	100
TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE ST MICROENCAPSULADO.....	100

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – FITOESTERÓIS PRESENTES EM ALIMENTOS VEGETAIS .....	21
QUADRO 2 – ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM FITOESTERÓIS / FITOESTANÓIS OU ÉSTERES .....	28
QUADRO 3 – FAMÍLIAS TAXONÔMICAS CONTENDO ESTIGMASTEROL .....	37
QUADRO 4 – EXPRESSÕES DE VISCOSIDADE .....	51
QUADRO 5 – MÉTODOS DE SAPONIFICAÇÃO DO ÓLEO DE CANOLA .....	68

## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac <sub>2</sub> O	- anidrido acético
Ba <sup>+2</sup>	- íons bário
°C	- graus Celsius
C	- carbono
Ca <sup>+2</sup>	- íons cálcio
CaCl <sub>2</sub>	- cloreto de cálcio
CaCO <sub>3</sub>	- carbonato de cálcio
CCD	- cromatografia em camada delgada
CHCl <sub>3</sub>	- clorofórmio
CHI	- quitosana
CH <sub>3</sub> COOH	- ácido acético glacial
CH <sub>3</sub> COONa	- acetato de sódio
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	- coenzima A
- COO <sup>-</sup>	- grupos carboxílicos ionizados
Da	- Dalton
DPR	- desvio padrão relativo
EE	- eficiência de encapsulação
EHL	- equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EtOH	- etanol
G	- gramas
H	- hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
HDL	- <i>high density lipoprotein</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- ácido sulfúrico
HMG-CoA	- hidroxí-3-metil-glutaril coenzima A
K <sub>H</sub>	- constante de Huggins
KOH	- hidróxido de potássio
kDa	- quilo Dalton
LDL	- <i>low density lipoprotein</i>
M	- molar

MeOH	- metanol
MEV	- microscópio eletrônico de varredura
Mg <sup>+2</sup>	- íons magnésio
mg	- miligramas
mL	- mililitros
mm	- milímetros
MO	- microscópio óptico
mol / g	- moles por grama
mPas	- mili Pascal
Na <sup>+</sup>	- íons sódio
NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- sulfato de sódio
- NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	- grupo amina protonada
NH <sub>4</sub> OH	- hidróxido de amônia
nm	- nanômetros
H	- viscosidade
O	- oxigênio
O / A	- óleo / água
O / A / O	- óleo / água / óleo
p / p	- peso / peso
p / v	- peso / volume
®	- marca registrada
Sr <sup>+2</sup>	- íons estrôncio
ST	- estigmasterol
v / v	- volume / volume
Zn <sup>+2</sup>	- íons zinco
µg	- microgramas
µL	- microlitros
µm	- micrômetros
µS / cm	- micro Simens por centímetros

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 FITOESTERÓIS .....	21
2.1.1 Atividades farmacológicas .....	28
2.1.1.1 Atividade hipocolesterolêmica .....	28
2.1.1.2 Ação antiaterogênica.....	30
2.1.1.3 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.....	31
2.1.1.4 Atividade anticancerígena .....	31
2.1.2 Segurança e efeitos colaterais .....	32
2.1.3 Oxidação .....	33
2.2 O ESTIGMASTEROL.....	36
2.3 MICROPARTÍCULAS .....	39
2.3.1 Aplicação da técnica de microencapsulação .....	40
2.3.2 Métodos de microencapsulação .....	42
2.3.3 Encapsulante.....	44
2.3.3.1 Alginato de sódio .....	45
2.3.3.2 Quitosana .....	49
2.3.3.3 Amido .....	54
2.3.4 Caracterização das micropartículas .....	54
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	57
3.1.1 Reagentes .....	57
3.1.2 Equipamentos .....	58
3.2 SOLUBILIZAÇÃO DO ESTIGMASTEROL.....	58



3.3 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	59
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	59
3.4.1 Grau de desacetilação.....	59
3.4.2 Viscosidade intrínseca.....	60
3.5 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO-AMIDO-QUITOSANA ....	60
3.5.1 Obtenção de micropartículas por gelificação iônica externa .....	60
3.5.2 Obtenção de micropartículas por gelificação iônica interna .....	62
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS .....	65
3.6.1 Morfologia.....	65
3.6.2 Rendimento de produção .....	65
3.6.3 Determinação do teor de umidade .....	65
3.6.4 Granulometria.....	66
3.6.5 Determinação do conteúdo de óleo encapsulado .....	66
3.6.6 Quantificação de estigmasterol encapsulado nas micropartículas .....	67
3.6.6.1 Saponificação do óleo de canola com estigmasterol encapsulado .....	67
3.6.6.2 Curva analítica para o estigmasterol .....	69
3.6.6.3 Quantificação de estigmasterol por espectrofotometria UV-VIS.....	70
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
4.1 SOLUBILIZAÇÃO DO ESTIGMASTEROL .....	71
4.2 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	71
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	72
4.3.1 Grau de desacetilação.....	72
4.3.2 Viscosidade intrínseca.....	74
4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO- CÁLCIO-AMIDO-QUITOSANA .....	76
4.4.1 Gelificação iônica externa .....	76
4.4.1.1 Justificativa da escolha do tipo de alginato de sódio, quitosana, amido, óleo de canola e poloxâmico 407 .....	77
4.4.1.2 Gelificação e Revestimento simultâneo da micropartícula .....	82
4.4.1.3 Influência do pH na ligação alginato-quitosana .....	84
4.4.1.4 Processo de secagem das micropartículas .....	86
4.4.1.5 Rendimento de produção .....	88
4.4.1.6 Morfologia, teor de umidade e granulometria .....	89

4.4.2 Gelificação iônica interna .....	89
4.4.3 Determinação do conteúdo de óleo encapsulado .....	92
4.4.4 Quantificação de estigmasterol contido no óleo encapsulado .....	93
4.4.4.1 Saponificação do óleo encapsulado .....	94
4.4.4.2 Quantificação de estigmasterol por espectrofotometria UV-VIS.....	97
4.4.4.2.1 Quantificação de estigmasterol diretamente no óleo recuperado das micropartículas .....	97
4.4.4.2.2 Quantificação de estigmasterol na matéria insaponificável do óleo recuperado das micropartículas .....	99
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fitoesteróis são substâncias químicas encontradas e extraídas de diversas partes de espécies vegetais, incluindo sementes, frutos e óleos vegetais e possuem estrutura e função relacionadas ao colesterol (MOGHADASIAN, 2000; FERNANDES; CABRAL, 2007). Dentre os já identificados os mais abundantes são sitosterol, estigmasterol e campesterol, classificados como 4-desmetilesterol (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; KRITCHEVSKY; CHEN, 2005).

O interesse pelos fitoesteróis iniciou na década de 1950, quando uma equipe de pesquisadores demonstrou a relação do consumo destas substâncias com a redução dos níveis de colesterol em aves (PETERSON; NICHOLS; SHENOUR, 1952). Porém, somente nas duas últimas décadas é que pesquisas avançaram para a melhor compreensão das atividades farmacológicas e das possibilidades de uso dos fitoesteróis (QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003).

Devido a sua comprovada ação hipocolesterolêmica e antiaterogênica, houve a tendência de se enriquecer alimentos como margarinas, molhos de saladas, biscoitos e iogurtes com ésteres de fitoesteróis, na tentativa de aumentar o consumo destas substâncias (SÄYNÄJOKI *et al.*, 2003; FOLEY *et al.*, 2010).

Outras atividades já foram atribuídas aos fitoesteróis, como a de proteção contra alguns tipos de câncer, incluindo os de cólon, mama e próstata, além de ações imuno-moduladoras e anti-inflamatórias (AWAD; FINK, 2000; QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004).

No entanto, apesar do seu potencial farmacológico, os fitoesteróis são pouco absorvidos pelo organismo e facilmente oxidados quando expostos ao oxigênio, exigindo o desenvolvimento de metodologias que minimizem estes problemas (BERGSTRÖM; WINTERSTEINER, 1942; SÄYNÄJOKI *et al.*, 2003).

O estigmasterol é um fitoesterol normalmente isolado da soja ou da Fava-de-Calabar, cujas atividades farmacológicas estão relacionadas aos demais. Possui grande importância na indústria farmacêutica, pois devido a sua abundância na mistura de esteróis em óleo de soja, é utilizado como matéria-prima na síntese de medicamentos esteroidais (SUNDARARAMAN; DJERASSI, 1977; BRUNETON, 1993; KAMETANI; FURUYAMA, 2006).

Com o propósito de desenvolver formas efetivas para incorporação de fitoesteróis em veículos apropriados, principalmente para favorecer a absorção, pesquisadores realizaram o enriquecimento de emulsões com fitoesteróis livres e/ou esterificados, microcristalizados ou solubilizados em diferentes meios, além de sugerirem a forma microencapsulada como uma alternativa viável (ZAWISTOWSKI, 2001; CHRISTIANSEN *et al.*, 2002; FERNANDES; CABRAL, 2007).

A microencapsulação de substâncias, tanto na forma sólida como líquida, apresenta inúmeras aplicações em vários setores, como no agroquímico, de produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios entre outros (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

A tecnologia das micropartículas consiste na formação de uma fina camada de um agente encapsulante, geralmente um polímero que atua como filme protetor, separando substâncias ativas, evitando assim, efeitos sobre sua exposição inadequada (SUAVE *et al.*, 2006).

Na indústria farmacêutica, a microencapsulação permitiu também o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, cuja substância ativa protegida é liberada gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução entre outros (FREIBERG; ZHU, 2004; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

O material utilizado para encapsulamento deve ser selecionado em função das propriedades físicas e químicas da substância ativa, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas (SUAVE *et al.*, 2006). Portanto, a escolha do material e da técnica utilizada é importante para conferir ao estigmasterol vantagens como proteção contra perda por oxidação e melhora da absorção.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Obter micropartículas de alginato-amido-quitosana contendo estigmasterol, produzidas pelos métodos de gelificação iônica externa e interna.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Microencapsular estigmasterol utilizando alginato de sódio, amido e quitosana como material encapsulante, pelos métodos de gelificação iônica externa e o interna.

Caracterizar a quitosana quanto ao grau de desacetilação, por titulação condutométrica.

Caracterizar a quitosana quanto a massa molecular viscosimétrica média, por viscosimetria.

Avaliar as micropartículas obtidas quanto ao tamanho e morfologia.

Determinar o rendimento de produção das micropartículas obtidas pelos diferentes métodos.

Comparar os métodos de quantificação de estigmasterol por espectrofotometria na região do UV-VIS, com amostra saponificada e não-saponificada.

Determinar a eficiência de encapsulação dos métodos de obtenção das micropartículas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FITOESTERÓIS

Os fitoesteróis, ou esteróis vegetais, são substâncias cuja estrutura e função são similares ao colesterol de mamíferos. Mais de 250 fitoesteróis e compostos derivados já foram identificados em várias espécies vegetais, porém, os mais abundantes são sitosterol, estigmasterol e campesterol, responsáveis por cerca de 98% dos fitoesteróis ingeridos (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004; KRITCHEVSKY; CHEN, 2005; MARANGONI; POLI, 2010). Em menor quantidade, também podem ser encontrados, brassicasterol, D5-avenasterol, sitostanol e campestanol (PIIRONEN *et al.*, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2002).

As principais fontes de fitoesteróis são os óleos vegetais, sementes e frutos (Quadro 1), porém, podem ser encontrados em fontes não vegetais, como gema de ovo, fígado de mamíferos e crustáceos (MARANGONI; POLI, 2010). Industrialmente são isolados de óleos vegetais, principalmente dos subprodutos obtidos durante a produção de óleo de soja, sendo utilizada em diversas áreas, como a farmacêutica (produção de esteróides), nutrição (alimentos funcionais) e cosmética (produção de cremes batons) (FERNANDES; CABRAL, 2007; BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

Produto	Total de fitoesterol (mg/100g)
Óleo de milho	809 - 1557
Óleo de canola	513 - 979
Óleo de soja	229 - 459
Óleo de oliva	144 - 150
Milho	178
Trigo	60,3 - 69
Brócolis	39
Maçã	13
Laranja	24

QUADRO 1 – FITOESTERÓIS PRESENTES EM ALIMENTOS VEGETAIS  
 FONTE: PIIRONEN *et al.* (2000)

Similar às demais substâncias esteroidais, apresentam os quatro anéis do núcleo fundamental, o ciclopentanoperidrofenantreno, ao qual é ligada uma cadeia lateral em C-17 (Figura 1) (MARANGONI; POLI, 2010).

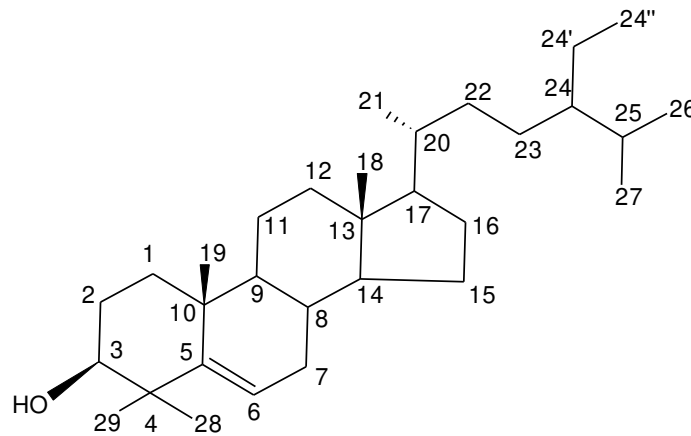


FIGURA 1 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS ESTERÓIDES COM CADEIA LATERAL LIGADA AO C-17

Os fitoesteróis diferenciam-se do colesterol, que possui oito carbonos em cadeia lateral, pela adição de ligações insaturadas e/ou grupamentos metila ou etila (Figura 2). O sitosterol e o estigmasterol apresentam um grupo etila no C24, enquanto o campesterol possui um grupo metila na mesma posição. O estigmasterol apresenta ainda, uma insaturação adicional no C22 da cadeia lateral (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007).

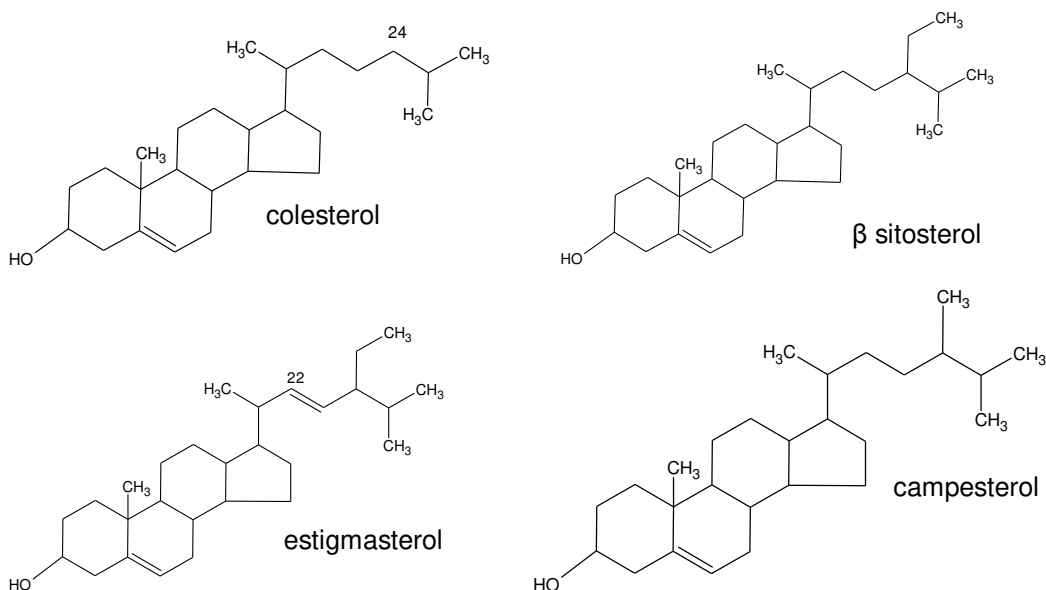


FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO COLESTEROL E DE ALGUNS FITOESTERÓIS

De acordo com o número de grupos metil no C4, os fitoesteróis podem ser divididos em três grupos: dois carbonos (4-dimetil), um carbono (4-monometil) ou nenhum carbono (4-desmetil) (Figura 3). O 4-dimetilesterol e o 4-monometilesterol são intermediários do produto final, o 4-desmetilesterol, sendo encontrados em baixas concentrações nos tecidos vegetais (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

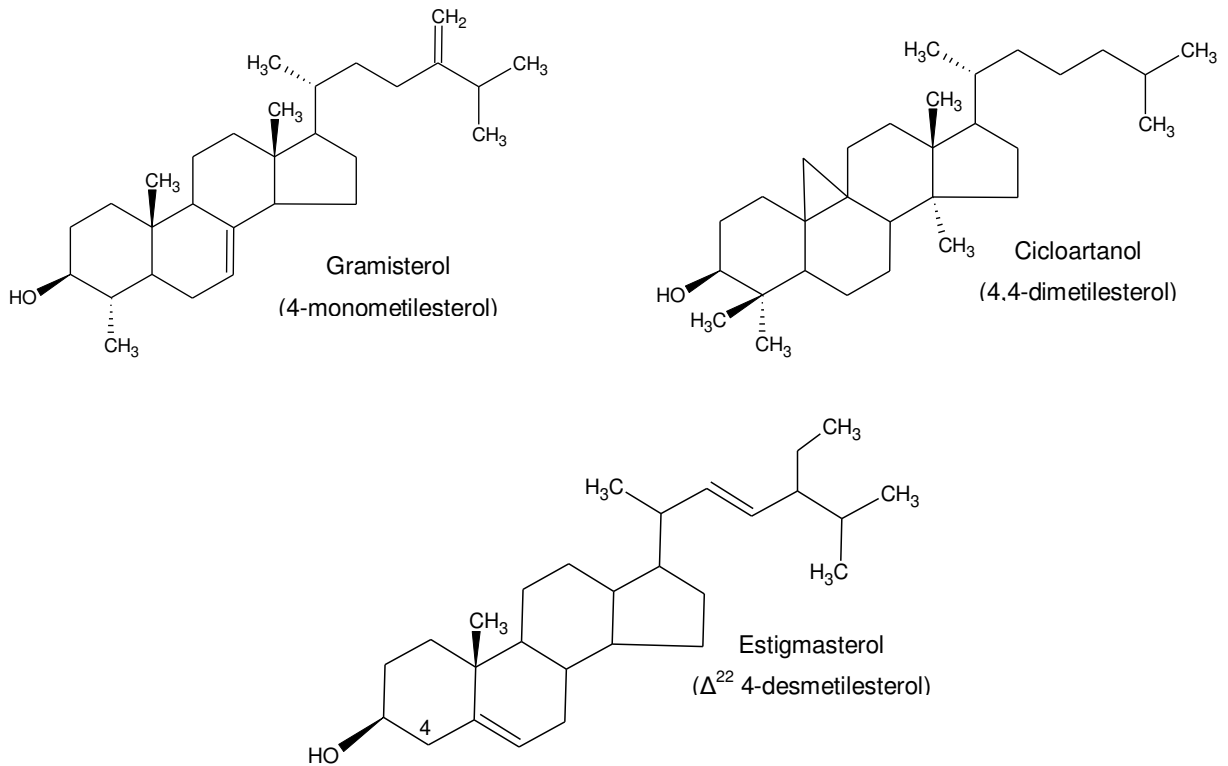


FIGURA 3 - ESTRUTURAS DO 4-MONOMETILESTEROL, 4-DIMETILESTEROL E 4-DESMETILESTEROL

A presença ou não de saturação no C5 do anel tetracíclico, diferem estas substâncias em esteróis ou estanois (Figura 4), respectivamente (MARAGONI; POLI, 2010).

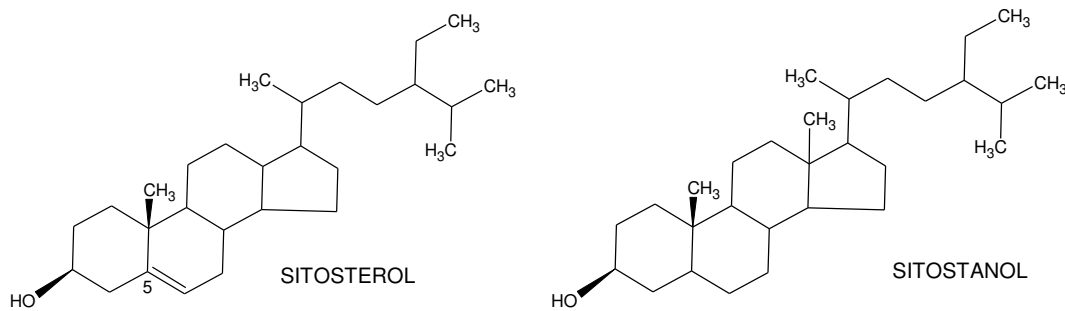


FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS ESTERÓIS E ESTANÓIS



Os fitoesteróis podem ser encontrados nos vegetais como esteróis livres, esterificados com ácidos graxos ou com glicosídeos. Em óleos comestíveis, são encontrados principalmente na forma livre e esterificada (PIIRONEN *et al.*, 2000; QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007; MARANGONI; POLI, 2010).

Assim como o colesterol presente nas membranas biológicas dos animais exerce papel fundamental na manutenção de sua estrutura e funcionalidade, os esteróis livres são incorporados às membranas celulares de espécies vegetais superiores, onde participam da estrutura da bicamada lipídica, estabilizando e regulando sua fluidez (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008). Na forma esterificada, apresentam outras funções na célula vegetal, como na diferenciação e proliferação celular. Quando armazenados em sementes e óleos são utilizados como fonte de reserva para o crescimento de novas células (PIIRONEN *et al.*, 2000; MARANGONI; POLI, 2010).

A estabilidade e fluidez das membranas dependem da relação esterol/fosfolípido. Um aumento nesta relação leva à formação de uma membrana mais rígida. Porém, as propriedades de cada fitoesterol diferem individualmente em seu efeito sobre as membranas. Durante a senescência, por exemplo, ocorre um aumento da proporção de estigmasterol em relação aos outros fitoesteróis, pois este está diretamente relacionado à desordem das membranas celulares (MOREAU; WHITAKER, HICKS, 2002).

Os fitoesteróis são sintetizados a partir da redução da acetil-CoA, tendo como alicerce fundamental o isopentenil-pirofosfato, derivado do mevalonato. A condensação de seis unidades isoprênicas dá origem ao esqualeno, que após ciclização, forma o anel esteróide e sua cadeia lateral (PIIRONEN *et al.*, 2000; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

O processo inicia-se com a formação do mevalonato, que posteriormente é convertido à isopentenil-pirofosfato, pela ação da enzima hidroxil-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase). Esta unidade isoprênica sofre uma sequência de reações de condensação mediadas por enzimas, formando o geranyl-pirofosfato, composto por dez átomos de carbono, o farnesil-pirofosfato, com quinze átomos de carbono e por fim, o esqualeno, composto por trinta átomos de carbono. Após oxidação, o esqualeno, unidade precursora dos esteróides e triterpenos fecha seus anéis para a formação do núcleo ciclo-pentanoperidrofenantreno. O esquema das

reações pode ser visualizado na Figura 5 (PIIRONEN *et al.*, 2000; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

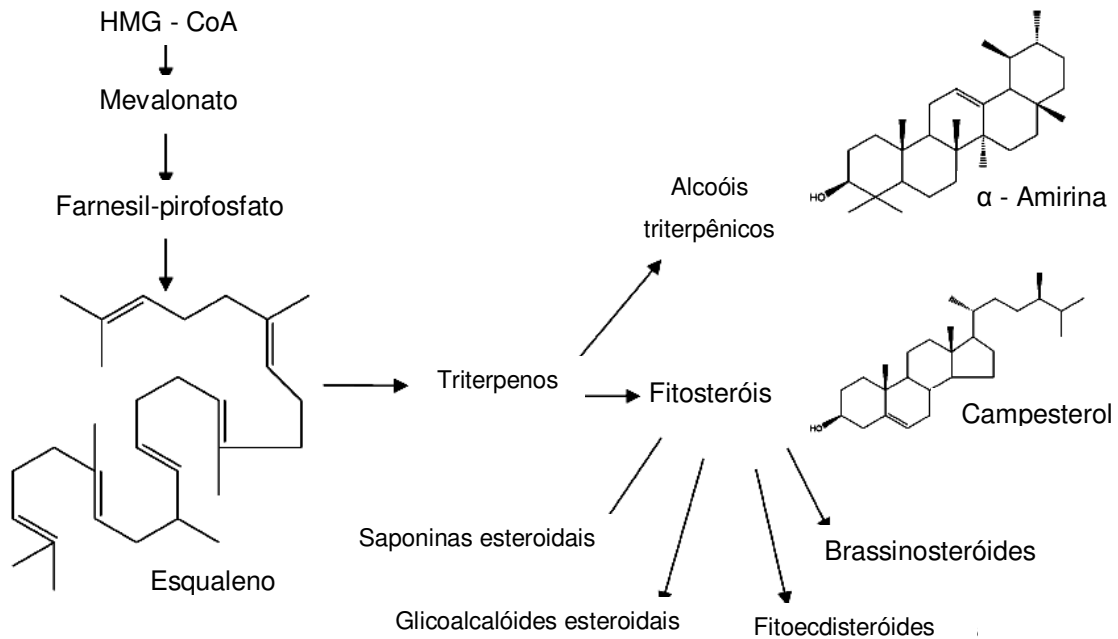


FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE FITOESTERÓIS E OUTROS TRITERPENOS  
 FONTE: MOREAU; WHITAKER e HICKS (2002)

Os fitoesteróis não são sintetizados pelos humanos, sendo sua concentração plasmática e tecidual, dependente da ingestão alimentar e absorção (MOGHADASIAN, 2000; MARANGONI; POLI, 2010).

A absorção dos fitoesteróis ocorre da mesma forma do colesterol e outros lipídios, após sua emulsificação e incorporação às micelas no intestino. Porém, o organismo humano absorve e retém de 55 a 60% do total de colesterol presente na dieta, enquanto apenas 5% de fitoesteróis presentes na alimentação são absorvidos (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008; MARANGONI; POLI, 2010).

Esta diferença de absorção pode ser explicada, em parte, pelas diferenças nas estruturas químicas do colesterol e dos fitoesteróis. A adição de um grupo metil ou etil no C-24 da cadeia lateral e a saturação presente na posição 5, no caso dos estanois, podem aumentar a hidrofobicidade das moléculas, reduzindo assim, sua absorção. Além de serem pouco absorvidos, os fitoesteróis apresentam alta taxa de excreção biliar, o que leva a uma baixa concentração sérica de fitoesteróis (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007; BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

Muitos estudos têm explorado o potencial farmacológico dos fitoesteróis, dentre eles, a ação hipocolesterolêmica tem recebido maior atenção nas pesquisas. Porém, numa revisão sobre as propriedades farmacológicas dos fitoesteróis, Moghadasian (2000) apresentou e discutiu uma série de estudos conduzidos por outros pesquisadores, com a finalidade de avaliar, além das atividades hipocolesterolêmica e antiaterogênica, os efeitos sobre o câncer de cólon e a hiperplasia prostática benígna. Atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antidiabética também já foram atribuídas a estas substâncias, bem como os indícios da efetividade na prevenção e tratamento de alguns tipos de câncer, como o de próstata, cólon e mama (GOMEZ *et al.*, 1999; NÓRMEN *et al.*, 2001; IFERE *et al.*, 2009; GABAY *et al.*, 2010).

Pesquisas mais recentes sobre estas ações farmacológicas, resultaram em tentativas de se obter uma fonte absorvível de fitoesteróis, uma vez que sua administração na forma de pó cristalino é dificultada por serem pouco solúveis em água e fracamente solúveis em óleos comestíveis (FERNANDES; CABRAL, 2007).

O laboratório farmacêutico Eli Lilly, na década de 1950, produziu o medicamento Cytellin<sup>®</sup>, contendo sitosterol cristalizado, para a redução de colesterol. No entanto, devido à necessidade de ingestão de elevada dose do medicamento (25 – 50 g/dia), influenciada pela sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, a produção do medicamento foi descontinuada (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

A esterificação dos esteróis e dos estanois com ácidos graxos de óleos vegetais aumentou a lipossolubilidade destas substâncias, permitindo sua incorporação na porção lipídica de produtos alimentícios (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002). No ano de 1995, o primeiro alimento contendo éster de estanol (Benecol<sup>®</sup>) foi lançado na Finlândia, iniciando assim, a entrada de alimentos enriquecidos com fitoesteróis em sua forma esterificada, na tentativa de se aumentar o consumo e obter as ações hipocolesterolêmica e antiaterogênica desejadas (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; BUFRAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

Os ésteres de esteróis e estanois mostraram a redução de 10% dos níveis séricos de colesterol com a ingestão de 2 a 3g diários, enquanto esta mesma redução é alcançada com 10 a 20g/dia de fitoesterol na forma cristalizada (ENGEL; SCHUBERT, 2005).

No entanto, alguns estudos apontam que, quando apropriadamente formulados, os fitoesteróis livres podem ser facilmente incorporados às micelas no intestino delgado, reduzindo a dose diária a ser tomada. Deste modo, a efetividade dos fitoesteróis livres pode ser satisfatoriamente comparada ao dos esterificados, sendo também importante comercialmente, uma vez que a utilização de fitoesteróis livres, sem a necessidade de hidrogenação para formação de estanois, resulta em um produto de menor custo (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007).

Pesquisas para incorporação de esteróis livres em diferentes veículos ou matrizes mostraram-se promissoras. Christiansen e colaboradores (2001) demonstraram que a utilização de fitoesteróis livres na forma microscristalizada é eficaz na redução do colesterol total e LDL-colesterol, com a administração de 1,5g/dia.

Sistemas emulsionados, com fitoesteróis solubilizados ou associados a outras substâncias, demonstraram efeitos similares aos fitoesteróis esterificados. A emulsificação de fitoesteróis com lecitina resultou na diminuição da absorção de colesterol no intestino delgado, mesmo utilizando dosagens menores que as anteriormente usadas (OSTLUND JR; SPILBURG; STENSON, 1999).

Meguro e colaboradores (2001) compararam fitoesteróis solubilizados em diacilglicerol e triacilglicerol e verificaram que no primeiro, os níveis séricos tanto de colesterol quanto de LDL-colesterol foram significativamente diminuídos. Outra forma de administração evidenciada é a microencapsulação destas substâncias, que possibilitaria sua incorporação em emulsões, produtos com baixo teor ou isentos de gordura (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007).

Portanto, com a esterificação dos esteróis e estanois e o desenvolvimento de formulações que melhoram a disponibilidade dos fitoesteróis livres no intestino, atualmente existem no mercado produtos contendo esteróis livre, esterificados ou em associação, que podem ser incorporados a alimentos como margarinas, iogurte, leite entre outros, como sumariza o Quadro 2 (MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002).

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Componentes</b>
Manteiga / margarina	Unilever Archer Daniels Midland Co. Pharmaconsult Oy. Ltd. Teriakia Ltd.	Ester de fitoesterol Fitoesterol / Fitoestanol Fitoesterol / Fitoestanol Fitoesterol / Fitoestanol
Queijos	Archer Daniels Midland Co. Teriakia Ltd.	Fitoesterol / Fitoestanol Fitoesterol / Fitoestanol
Leite fermentado	Archer Daniels Midland Co.	Fitoesterol / Fitoestanol
Bebidas lácteas	Novartis Consumer Health	Fitoesterol / Fitoestanol
Suco de fruta a base de leite	Teriakia Ltd.	Fitoesterol / Fitoestanol
Produtos lácteos	Archer Daniels Midland Co. Pharmaconsult Oy. Ltd. Unilever Bestfood Europe	Fitoesterol / Fitoestanol Fitoesterol / Fitoestanol Ésteres de fitoesterol
logurtes	Pharmaconsult Oy. Ltd. Teriakia Ltd.	Fitoesterol / Fitoestanol Fitoesterol / Fitoestanol
Sucos e néctar	Coca-cola	Fitoesteróis

QUADRO 2 – ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM FITOESTERÓIS / FITOESTANÓIS OU ÉSTERES  
 FONTE: Extraído de KOSCHUTNIG (2009)

## 2.1.1 Atividades farmacológicas

### 2.1.1.1 Atividade hipocolesterolêmica

A correlação entre os níveis de colesterol e LDL-colesterol e as doenças cardiovasculares já foi estabelecida por diversos estudos, sendo que valores aumentados de LDL-colesterol e reduzidos de HDL-colesterol são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de patologias cardíacas (SANTOS FILHO; MARTINEZ, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC), 2007).

A ação dos fitoesteróis na redução dos níveis séricos de colesterol é relatada desde a década de 1950 (PETERSON; NICHOLS; SHENOUR, 1952; POLLACK, 1953), porém, somente a partir da década de 1990 é que pesquisas para elucidação deste mecanismo e da ação dos fitoesteróis sobre outras patologias foram intensificadas, levando a uma série de conclusões importantes (QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003).

Os fitoesteróis possuem a capacidade de reduzir a concentração sérica de colesterol e LDL-colesterol sem alterar os níveis de HDL-colesterol e triglicerídeos. As pessoas com níveis normais de colesterol e com hipercolesterolemia são beneficiadas por esta ação. A ingestão diária de 1,5g a 3g de fitoesteróis pode levar a uma média de redução de 8 a 15% dos níveis de LDL-colesterol, sendo que a ação de redução do colesterol é mais acentuada com os 4-desmetilesteróis (QUÍLEZ;

GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; FERNANDES; CABRAL, 2007; VERGÈS, 2009).

O principal mecanismo de ação hipocolesterolêmico refere-se à redução de absorção do colesterol. Durante o processo digestivo os ácidos graxos, glicerol e colesterol livres provenientes da ação das enzimas do suco pancreático sobre o bolo fecal, são emulsificados pelos sais biliares em micelas que são estruturas transportadoras destes lipídios alimentares até os enterócitos da parede intestinal, onde são absorvidos (VERGÈS, 2009).

Os esteróis vegetais são mais hidrofóbicos que o colesterol e possuem grande afinidade com as micelas envolvidas na digestão de gorduras, entrando em competição com o colesterol livre. Esta maior afinidade leva ao deslocamento do colesterol das micelas próximas à parede intestinal, que ficarão saturados de fitoesteróis, reduzindo a absorção do colesterol pelos enterócitos (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003; BUFRAU; CANELA; RAFECAS, 2008; VERGÈS, 2009; MARANGONI; POLI, 2010).

O colesterol não absorvido e os fitoesteróis não incorporados às micelas precipitam formando uma mistura de cristais pouco absorvível no trato gastrointestinal, que é eliminado via fecal (KOSCHUTNIG, 2009; MARANGONI; POLI, 2010).

Além da competição pelas micelas intestinais, outros mecanismos de ação são sugeridos. A competição pela atividade da estearase e pelos transportadores de colesterol, como o NPC1L1 na borda da membrana dos enterócitos, levam a redução da absorção do colesterol pela parede intestinal (MARANGONI; POLI, 2010; GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUES-ESTRADA, 2011).

Os fitoesteróis inibem a atividade da enzima colesterol aciltransferase (ACAT), responsável pela esterificação do colesterol absorvido. Esta inibição ocorre devido ao excesso de colesterol intracelular ocasionada pela esterificação mais prolongada dos fitoesteróis. A redução da esterificação do colesterol leva a menor incorporação aos quilomícrons, responsáveis pelo transporte do colesterol esterificado até a linfa (KOSCHUTNIG, 2009; MARANGONI; POLI, 2010; GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUES-ESTRADA, 2011).

A redução de colesterol livre resulta no aumento compensatório da síntese de colesterol endógeno, aumento da expressão de receptores de LDL-colesterol no fígado e redução da concentração de LDL-colesterol circulante (TAPIERO;

TOWNSEND; TEW, 2003; BUFRAU; CANELA; RAFECAS, 2008; VERGÈS, 2009; MARANGONI; POLI, 2010).

#### 2.1.1.2 Ação antiaterogênica

O processo de aterogênese, ou formação de lesões nas artérias tem início com a formação de estria gordurosa, que consiste no acúmulo, sob o endotélio, de células espumosas. As células espumosas são formadas a partir da ação dos macrófagos sobre LDL-colesterol oxidado no espaço subendotelial. Fatores como o aumento da lipoproteína LDL, hipertensão arterial e tabagismo, agredem o endotélio vascular, aumentando sua permeabilidade às lipoproteínas plasmáticas, que ficam retidas na região subendotelial. Este processo ocorre passivamente e é diretamente proporcional à concentração sanguínea de LDL. As micropartículas retidas são então, oxidadas, tornando-se passíveis de serem reconhecidas pelos macrófagos (SBC, 2007).

As estrias gordurosas podem progredir ao longo dos anos para uma placa fibrosa devido à ação de mediadores da inflamação, que estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Posteriormente esta placa fibrosa poderá evoluir para a placa aterosclerótica, constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Quando esta placa é rompida, o material lipídico, altamente trombogênico, é exposto. Este processo é chamado aterotrombose, uma das principais manifestações clínicas da aterosclerose (SBC, 2007).

A ação antiaterogênica está relacionada com os efeitos da redução dos níveis séricos de LDL-colesterol promovido pelos fitoesteróis. A redução do tamanho das lesões ateroscleróticas está acompanhada de redução de outros componentes, como a quantidade de células espumosas, material extracelular e células proliferativas da musculatura lisa (MOGHADASIAN, 2000).

Outras propriedades também contribuem para a ação antiaterogênica, como os efeitos sobre o sistema de coagulação, antioxidante e atividades hepáticas e da lipase lipoprotéica (MARANGONI; POLI, 2010).

### 2.1.1.3 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

Apesar de grande parte das pesquisas serem voltadas para a atividade hipocolesterolêmica dos fitoesteróis, alguns estudos demonstraram propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória destas substâncias.

Santos e colaboradores (1995) demonstraram a atividade antinociceptiva de esteróis isolados de *Phyllanthus corcovadensis*, destacando sua ação tanto na fase neurogênica, quanto na fase inflamatória do teste de dor induzida por formalina.

A resposta inflamatória a determinado estímulo é caracterizada por edema, infiltração neutrofílica, produção de prostaglandinas e aumento da permeabilidade vascular. Os fitoesteróis aplicados topicamente mostraram-se eficazes na inibição desta resposta, por promoverem redução de edema local devido à inibição da atividade da mieloperoxidase enzima presente nos processos inflamatórios e relacionada ao acúmulo de neutrófilos na região inflamada (GARCÍA *et al.*, 1999; NAVARRO; DE LAS HERAS; VILLAR, 2001).

Backhouse e colaboradores (2008) estudaram as ações analgésica, anti-inflamatória e antioxidante dos extratos de *Buddleja globosae* destacaram a ação analgésica e anti-inflamatória dos fitoesteróis como, sitosterol, estigmasterol e ergosterol, administrados por via oral e tópica, quando em comparação com anti-inflamatórios controle, nimesulida e indometacina.

### 2.1.1.4 Atividade anticancerígena

Muitos estudos têm sugerido a ação dos fitoesteróis na prevenção de alguns tipos de câncer entre eles, de próstata, mama e cólon (AWAD; FINK, 2000; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003). Recentemente Woyengo, Ramprasath e Jones (2009) realizaram uma revisão sobre a ação dos fitoesteróis nos casos de câncer de pulmão estômago e ovário, concluindo que além da ação sobre crescimento e morte das células cancerígenas estas substâncias são capazes de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo o estresse oxidativo.



Na hiperplasia prostática benigna em cobaias, o consumo de fitoesteróis reduziu as atividades da 5- $\alpha$ -redutase e da aromatase prostática, indicando que podem suprimir o metabolismo e crescimento da próstata (AWAD; FINK, 2000; TAPIERO, TOWNSEND; TEW, 2003).

Scholtyssek e colaboradores (2009) investigaram a ação dos fitoesteróis sobre a proteína p53 em câncer de próstata, responsável pelo controle do ciclo celular. Observaram que na presença destas substâncias, ocorre aumento da expressão de p53, o que acarreta na diminuição do crescimento e desenvolvimento tumoral. O aumento da expressão de p53 contribui para reparação do DNA celular, ou morte por apoptose.

A redução de crescimento de células MDA-MB-231, relacionadas a casos de câncer de mama, foi observada em estudos conduzidos por Awad, Willians e Fink (2003), na presença do sitosterol e campesterol.

### 2.1.2 Segurança e efeitos colaterais

Os fitoesteróis são substâncias que apresentam poucos efeitos colaterais, sem evidências de atividade mutagênica ou tóxica em ensaios com animais (QUÍLEZ; GARCÍA-LORDA; SALAS-SALVADÓ, 2003; KRITCHEVSKI; CHEN, 2005).

Um dos mais conhecidos efeitos adversos dos fitoesteróis ocorre em indivíduos com sitosterolemia, doença hereditária rara que acomete principalmente pessoas jovens, cuja manifestação clínica caracteriza-se por depósito de gordura nos tendões (xantomas), doença coronária prematura (aterosclerose), formação de eritrócitos anormais, trombocitopenia, artrite e artralgia. Estes indivíduos apresentam níveis elevados de absorção de fitoesteróis e baixa excreção biliar, resultando em altas concentrações plasmáticas e teciduais destas substâncias (BERKOW, 2002; BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

Alguns estudos sugeriram efeitos estrogênico e aterogênico na presença de altas concentrações plasmáticas de fitoesteróis, porém, não existe comprovação, uma vez que outras pesquisas contradizem a existência destes efeitos (MOGHADASIAN, 2000; MOREAU, WHITAKER; HICKS, 2002; KRITCHEVSKI; CHEN, 2005).

O consumo de fitoesteróis provoca redução da absorção de tocoferol e carotenóides, uma vez que estas substâncias também são transportadas por lipoproteínas (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003).

### 2.1.3 Oxidação

Devido a sua natureza química, os fitoesteróis estão sujeitos à oxidação quando expostos ao ar, sendo este processo acelerado pelo aquecimento exposição à luz e a produtos químicos ou enzimáticos, que podem ocorrer durante a manipulação destas substâncias ou longo período de armazenamento (LAMPI *et al.*, 2002; SÄYNÄJOKI *et al.*, 2003; FOLEY *et al.*, 2010).

A oxidação dos esteróis consiste em uma sequência de reações em cadeia de radicais livres, que podem ser iniciadas por diferentes tipos de oxigênio, como singlete e triplete, ozônio, hidroperóxidos e radical hidroxila, podendo ocorrer tanto em nível de anel ciclopentano, quanto em nível de cadeia lateral. O mecanismo de oxidação mais comum para os esteróis é a autooxidação, sendo o oxigênio triplete frequentemente envolvido na reação. A autooxidação iniciada pela perda de um hidrogênio reativo em C7, C24 ou C25, resulta na reação do radical formado com o oxigênio triplete, levando a formação de um radical peroxi (JOHNSSON; ANDERSSON; DUTTA, 2003; JOHNSSON, 2004).

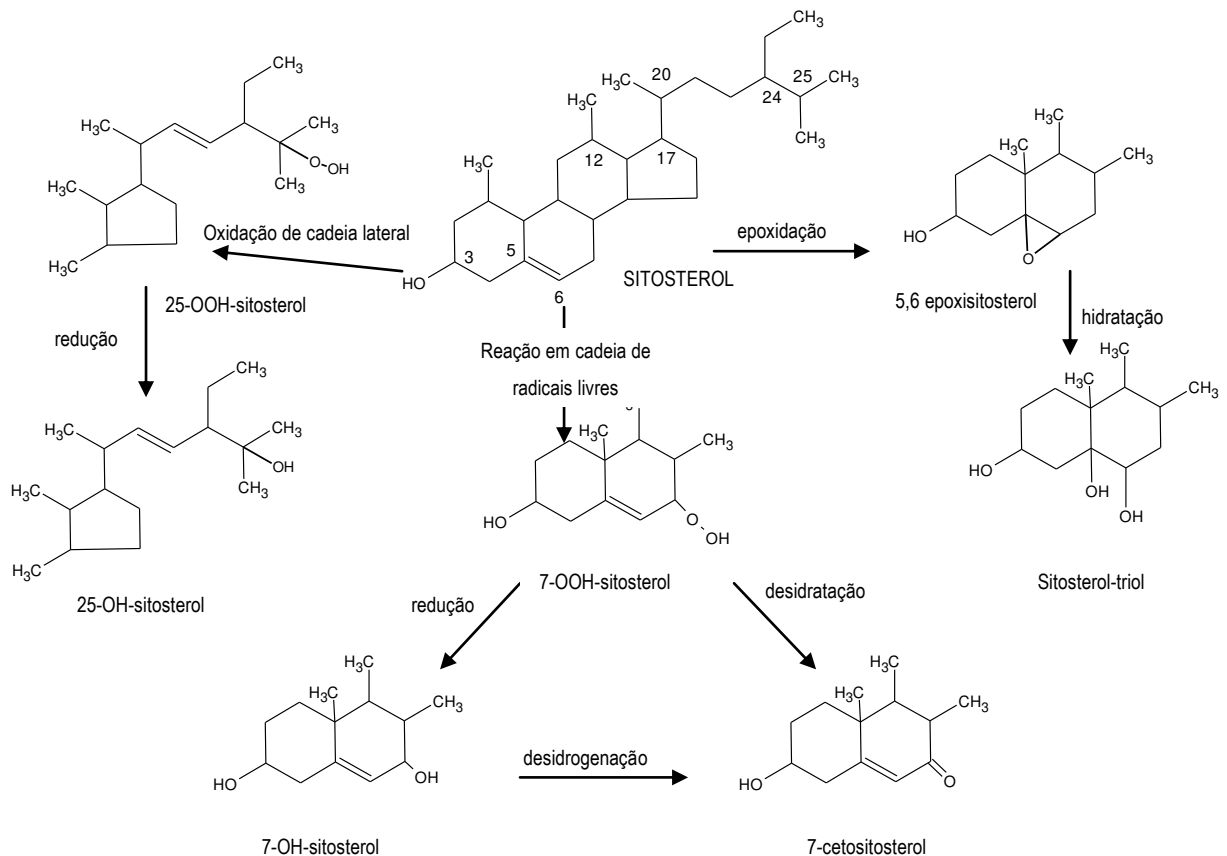


FIGURA 6 - VIAS DE AUTOXIDAÇÃO DE PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO β-SITOSTEROL  
 FONTE: KOSCHUTNIG (2009)

O processo pode ser iniciado também com o ataque de um oxigênio singlete, como na fotoxidação, com presença de oxigênio energia luminosa e foto-sensibilizadores. Este singlete é altamente reativo e eletrofílico, reagindo rapidamente com a dupla ligação do esterol, num mecanismo eno cíclico que resulta na entrada de um átomo de oxigênio em um dos carbonos da dupla ligação. Os produtos primários deste processo são hidroperóxidos, cujos produtos de oxidação secundária apresentam diversos grupos químicos como hidroxí, ceto e epóxi (LAMPI *et al.*, 2000; SÄYNNÄJOKI *et al.*, 2003).

Em virtude do enriquecimento de alimentos com fitoesteróis, pesquisadores têm investigado a formação de produtos de oxidação em relação à temperatura esterificação e matriz lipídica na qual estão veiculados (SOUPAS *et al.*, 2005; KOSCHUTNIG, 2009; GARCÍA-LLATAS; RODRÍGUES-ESTRADA, 2011).

Soupas e colaboradores (2005) verificaram que os ésteres de fitoesteróis mostravam-se mais reativos quando expostos à temperatura de 100°C por um período prolongado de tempo, sendo esta reatividade diminuída a 180°C, temperatura na qual os fitoesteróis livres são degradados.

Em estudos de oxidação dependente das matrizes lipídicas, Lampi e colaboradores (2002) analisaram a formação de produtos de termo-oxidação do estigmasterol na forma cristalizada e em óleo de colza. Os pesquisadores concluíram que em óleo, sua oxidação é menos pronunciada evidenciando a dependência da oxidação com a área de exposição do esteroide ao ar.

Muitos estudos demonstram que os produtos de oxidação do colesterol possuem atividades citotóxica, mutagênica e aterogênica e devido à semelhança estrutural, os produtos de oxidação dos fitoesteróis começaram a receber maior importância em pesquisas, principalmente devido ao enriquecimento de alimentos com fitoesteróis (LAMPI *et al.*, 2002; SBC, 2007; FOLEY *et al.*, 2010).

Os efeitos biológicos dos produtos de oxidação não estão totalmente elucidados e os estudos realizados mostram resultados controversos (GRANDGIRARD, 2002; JOHNSON, 2004). A presença destes produtos em plasma humano e de ratos já foi evidenciada, bem como a absorção entérica e linfática em ratos, sendo estes produtos provenientes de alimentos ou da oxidação *in vivo* no plasma (PLAT *et al.*, 2001; GRANDGIRARD, 2002).

Adcox e colaboradores (2001) demonstraram efeitos citotóxicos semelhantes aos dos produtos de oxidação do colesterol, porém, em menor intensidade. Estes resultados coincidem com os encontrados anteriormente por Meyer e colaboradores (1998).

Apesar da presença de óxidos de fitoesteróis no plasma, aorta e fígado, Tomoyori e colaboradores (2004) não observaram contribuição dos mesmos para o desenvolvimento de aterosclerose em animais apo-E deficiente. Nenhum efeito genotóxico foi observado em ensaio conduzido por Lea e colaboradores (2004), no qual alimentaram ratos por 90 dias, com dieta contendo 30% de produtos de oxidação de fitoesteróis.

## 2.2 O ESTIGMASTEROL

O estigmasterol, quimicamente nomeado (3 $\beta$ , 22*E*)-stigmasta-5,22-dien-3-ol; 3 $\beta$ -hidroxi-24-etil- $\Delta^{5,22}$ -colestadieno (Figura 7), é um esteroide vegetal insaturado, inicialmente isolado por Windaus e Hauth, a partir de Fava-de-Calabar. Atualmente, sua obtenção ocorre a partir do isolamento em mistura de fitoesteróis de feijões de soja ou Fava-de-Calabar (BUDAVARI, 2001).

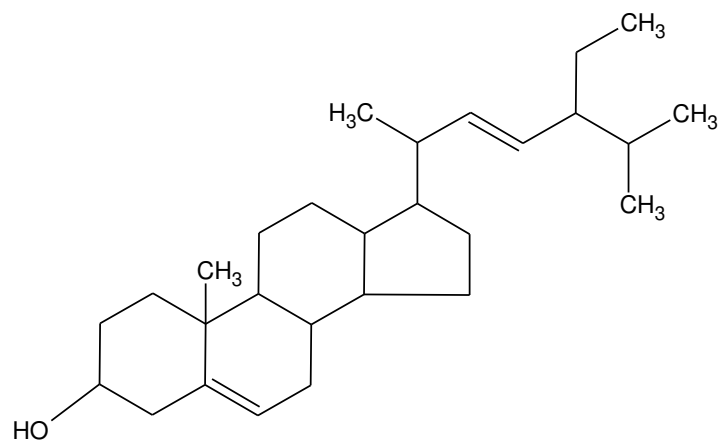


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTIGMASTEROL

Apresenta-se sob a forma de cristais amorfos brancos, pouco solúveis em água, porém, solúvel em solventes orgânicos usuais e com ponto de fusão em torno de 170°C. Estruturalmente, sua fórmula molecular é representada por C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O, apresentando massa molecular de 412,67 g/mol (BUDAVARI, 2001; LIM *et al.*, 2005).

Ocorre naturalmente em diversas espécies vegetais envolvendo várias famílias taxonômicas, conforme Quadro 3.

1 - <i>Acanthaceae</i>	19 - <i>Cannabaceae</i>	37 - <i>Magnoliaceae</i>	55 - <i>Ranunculaceae</i>
2 - <i>Adoxaceae</i>	20 - <i>Caricaceae</i>	38 - <i>Malvaceae</i>	56 - <i>Rosaceae</i>
3 - <i>Aloeaceae</i>	21 - <i>Chenopodiaceae</i>	39 - <i>Menispermaceae</i>	57 - <i>Rubiaceae</i>
4 - <i>Amaranthaceae</i>	22 - <i>Commelinaceae</i>	40 - <i>Moraceae</i>	58 - <i>Rutaceae</i>
5 - <i>Anacardiaceae</i>	23 - <i>Crassulaceae</i>	41 - <i>Moringaceae</i>	59 - <i>Sapindaceae</i>
6 - <i>Annonaceae</i>	24 - <i>Cucurbitaceae</i>	42 - <i>Musaceae</i>	60 - <i>Sapotaceae</i>
7 - <i>Apiaceae</i>	25 - <i>Dioscoreaceae</i>	43 - <i>Myristicaceae</i>	61 - <i>Sarraceniaceae</i>
8 - <i>Apocynaceae</i>	26 - <i>Euphorbiaceae</i>	44 - <i>Myrtaceae</i>	62 - <i>Scrophulariaceae</i>
9 - <i>Araliaceae</i>	27 - <i>Fabaceae</i>	45 - <i>Olacaceae</i>	63 - <i>Smilacaceae</i>
10 - <i>Areaceae</i>	28 - <i>Ginkgoaceae</i>	46 - <i>Onagraceae</i>	64 - <i>Solanaceae</i>
11 - <i>Asclepiadaceae</i>	29 - <i>Hippocastanaceae</i>	47 - <i>Papaveraceae</i>	65 - <i>Sterculiaceae</i>
12 - <i>Asteraceae</i>	30 - <i>Illiciaceae</i>	48 - <i>Passifloraceae</i>	66 - <i>Theaceae</i>
13 - <i>Berberidaceae</i>	31 - <i>Juglandaceae</i>	49 - <i>Pedaliaceae</i>	67 - <i>Tiliaceae</i>
14 - <i>Betulaceae</i>	32 - <i>Lamiaceae</i>	50 - <i>Pinaceae</i>	68 - <i>Urticaceae</i>
15 - <i>Boraginaceae</i>	33 - <i>Lauraceae</i>	51 - <i>Piperaceae</i>	69 - <i>Valerianaceae</i>
16 - <i>Brassicaceae</i>	34 - <i>Liliaceae</i>	52 - <i>Plantaginaceae</i>	70 - <i>Vitaceae</i>
17 - <i>Bromeliaceae</i>	35 - <i>Loganiaceae</i>	53 - <i>Poaceae</i>	71 - <i>Zingiberaceae</i>
18 - <i>Cactaceae</i>	36 - <i>Lythraceae</i>	54 - <i>Polygonaceae</i>	72 - <i>Zygophyllaceae</i>

QUADRO 3 – FAMÍLIAS TAXONÔMICAS CONTENDO ESTIGMASTEROL  
 FONTE: OLIVEIRA, 2007; DUKE, 2011

Assim como o sitosterol, o estigmasterol é de grande importância na indústria farmacêutica, pois devido a sua abundância na mistura de esteróis em óleo de soja, é utilizado como matéria-prima na síntese de medicamentos esteroidais, como anticoncepcionais, anabolizantes e anti-inflamatórios, além de ser precursor de vitamina D<sub>3</sub> (SUNDARARAMAN; DJERASSI, 1977; BRUNETON, 1993; KAMETANI; FURUYAMA, 2006).

O estigmasterol apresenta as atividades farmacológicas relacionadas aos demais fitoesteróis, como ações hipocolesterolêmica, anti-inflamatória e antinociceptiva.

Recentemente Gabay e colaboradores (2010) conduziram estudo no qual demonstram o potencial antiosteoartrítico do estigmasterolevidenciado pela inibição de mediadores pró-inflamatórios e de degradação da cartilagem.

Pesquisas apontam ainda, ações antioxidante, hipoglicêmica e inibidora da tireóide (LIM *et al.*, 2005; PANDA *et al.*, 2009).

Estudando os constituintes de *Gleditsia sinensis*, Lim e colaboradores (2005) verificaram que o estigmasterol apresentava em comparação com os demais constituintes, maior e mais efetiva atividade antimutagênica, obtendo redução no fator de indução contra os mutagenes testados (MNNG – n-metil-n'-nitro-nitrosoguanidina e 4-NQO – 4-nitroquinolina-n-óxido). Os pesquisadores apontaram a necessidades de estudos *in vivo* para viabilização do uso do estigmasterol como agente anticancerígeno.

Panda e colaboradores (2009) testaram a eficácia do estigmasterol isolado de *Butea monosperma* na atividade de regulação dos hormônios da tireóide e alterações nas concentrações séricas de glicose promovida por esta atividade. Os resultados obtidos demonstraram que após 20 dias de administração de 2,6mg/kg/dia em ratos, houve redução das concentrações dos hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> sanguíneo, indicando seu potencial uso para regular o hipertireoidismo. Houve também a redução dos níveis de glicemia, sugerindo atividade hipoglicemiante e estimulante de insulina. Neste estudo foi possível observar a redução das atividades de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, apontando um possível potencial antioxidante do estigmasterol.

Assim como os demais esteróis, o estigmasterol está sujeito à degradação quando exposto ao ar, principalmente devido à presença de duas duplas ligações em sua estrutura química, tornando-o susceptível principalmente à oxidação (LAMPI *et al.*, 2002; SÄYNÄJOKI *et al.*, 2003; FOLEY *et al.*, 2010). Em estudo conduzido por Soupas e colaboradores (2004) foi possível estabelecer a relação do aumento da taxa de degradação com o número de insaturações do fitoesterol.

## 2.3 MICROPARTÍCULAS

A tecnologia de microencapsulação é o processo no qual, pequenas quantidades de substâncias sólidas, líquidas e até mesmo gasosas são englobadas em pequenas partículas, chamadas micropartículas, pela formação de uma fina camada polimérica ao seu redor (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

A microencapsulação surgiu no contexto do modelo celular, onde as membranas celulares envolvem e protegem o conteúdo citoplasmático, local onde ocorrem reações vitais às células. As membranas são responsáveis também pelo controle de entrada e saída de materiais nas células, além de outras funções (PONCELET, 2006; SUAVE *et al.*, 2006).

As micropartículas são sólidas e de forma normalmente esférica. Inicialmente possuíam tamanhos variando de 5 $\mu\text{m}$  até alguns milímetros, porém, a partir da década de 1980, com o desenvolvimento da tecnologia, estas passaram a ser produzidas em tamanhos cada vez menores. Usualmente, as partículas com tamanho entre 0,01 a 0,2 $\mu\text{m}$  são chamadas de nanopartículas e as de tamanho entre 1 a 100 $\mu\text{m}$ , micropartículas (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; SUAVE *et al.*, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2009; MASCARENHAS, 2010).

De acordo com sua estrutura, as micropartículas podem ser subdivididas em microesferas e microcápsulas. Nas microesferas a substância ativa (fármaco) encontra-se homogeneamente dispersa na matriz polimérica, não sendo possível a observação de um núcleo diferenciado. As microcápsulas formam um sistema reservatório, onde a substância ativa encontra-se num núcleo envolto por uma parede polimérica externa (Figura 8) (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; SUAVE *et al.*, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2009).



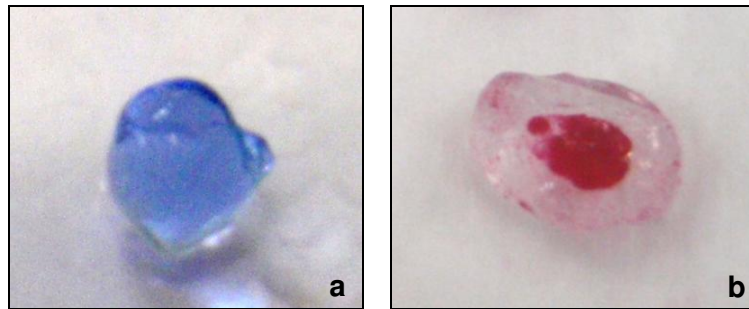


FIGURA 8 - MICROESFERAS (a) E MICROCÁPSULAS (b)  
 FONTE: O autor (2010)

As primeiras tentativas de microencapsulamento de corantes para ser utilizado na indústria de papel foram iniciadas no final da década de 1930, porém, somente em 1954 é que a empresa norte-americana National Cash Register® conseguiu desenvolver a técnica. Pequenas quantidades de pigmento foram encapsuladas e dispostas sobre uma folha de papel, formando um filme. O rompimento das microcápsulas pela pressão da ponta de um lápis em sua superfície, libera o pigmento, que reage com o revestimento ácido aplicado sobre a outra folha, modificando sua coloração em função do pH e propiciando a cópia sem necessidade de papel carbono (SUAVE *et al.*, 2006; ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Na década de 1950 também foram iniciadas pesquisas para uso da microencapsulação na área farmacêutica, permitindo o desenvolvimento da técnica de liberação controlada de fármacos e em outras áreas como na agroquímica, alimentícia, cosmética e farmacêutica (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; SUAVE *et al.*, 2006; CORRÊA, 2008).

### 2.3.1 Aplicação da técnica de microencapsulação

De acordo com Poncelet (2006), para que o processo de microencapsulação seja vantajoso para uma indústria, um dos cinco objetivos principais que são a imobilização ou aprisionamento de substâncias, proteção, liberação controlada, estruturação e funcionalização, deve ser atingido.

Portanto, a microencapsulação de substâncias pode permitir a separação de incompatibilidades, melhorar a estabilidade de produtos, converter líquidos em sólidos, diminuir volatilidade ou inflamabilidade de líquidos, mascarar gosto e odor e

reduzir toxicidade. A utilização de micropartículas pode também facilitar a manipulação de pós coesivos, dispersar substâncias pouco solúveis em água, reduzir ou eliminar irritação gástrica, proteger de condições ambientais como umidade, luz, calor, oxidação, programar e controlar a liberação de fármacos (MAGILL, 1991; SILVA *et al.*, 2003).

A microencapsulação de substâncias pode também ser estendido à imobilização de moléculas complexas como peptídeos e proteínas, DNA, células vivas e microorganismos, para utilização com finalidade terapêutica ou como alimentos funcionais (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; PONCELET, 2006; SUAVE *et al.*, 2006).

A liberação controlada de fármacos através das micropartículas é um processo relacionado às formas farmacêuticas com liberação modificada, a qual pode ser retardada, quando a liberação do fármaco não se inicia logo após sua administração, ou prolongada, quando existe liberação gradual do fármaco, o que reduz sua frequência de tomada e melhora a adesão do tratamento (SUAVE *et al.*, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2009). O controle da liberação do material encapsulado está diretamente relacionado ao material encapsulante estrutura química, espessura, porosidade e solubilidade. O tamanho e a distribuição dos poros nas micropartículas influenciam a difusão de moléculas através da rede de gel (CORRÊA, 2008).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação permite a proteção de compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, corantes, acidulantes enzimas, vitaminas, microorganismos probióticos e agentes antifúngicos (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; CORRÊA, 2008).

As micropartículas são importantes também no setor agroquímico, onde o processo permite a liberação controlada dos pesticidas, importante para evitar a utilização excessiva dos defensivos agrícolas, que pode ocasionar contaminação ao ambiente e ao manipulador do produto (SUAVE *et al.*, 2006).

O encapsulamento de óleos tem sido muito explorado devido a sua aplicação em diversas áreas, pois estes apresentam propriedades como nutritiva, antisséptica, antifúngica, antiparasitária e hidratante (CHANG; DOBASHI, 2003; PENICHE *et al.*, 2004; CHAN, 2011).

Trabalhos prévios demonstraram que a microencapsulação de óleos pode promover a redução do processo de oxidação destas substâncias, permitindo a manutenção de suas propriedades durante seu manuseio e estocagem, além de

mascarar sabor e odor desagradável (MÁRQUEZ-RUIZ; VELASCO; DOBARGANES, 2000; TAN; CHAN; HENG, 2009; CHAN, 2011).

### 2.3.2 Métodos de microencapsulação

A escolha do método mais adequado depende do tipo de material a ser encapsulado, de sua aplicação e do mecanismo de liberação desejado. A liberação da substância ativa pode ocorrer através de ruptura mecânica das micropartículas durante a aplicação do produto, mediante ação da temperatura ou pH, por meio de biodegradação, pela solubilidade no meio ou por difusão (SUAVE *et al.*, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

De modo geral, o processo de microencapsulação ocorre em três etapas. A primeira etapa envolve a incorporação da substância ativa na matriz ou núcleo da cápsula a partir de emulsões, soluções ou suspensões. A segunda é uma operação mecânica, cujo objetivo é manter o material encapsulante ao redor da substância ativa, formando uma micropartícula ainda instável. Esta etapa consiste em emulsificação, gotejamento, aglomeração entre outras técnicas. A última etapa visa estabilização ou solidificação da parede ao redor do núcleo, formando assim, uma micropartícula estável (PONCELET, 2006; SUAVE *et al.*, 2006; CORRÊA, 2008).

As etapas podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias para se conseguir a estrutura desejada, sendo que o primeiro encapsulamento fará a retenção do ativo no núcleo e os demais o controle de liberação e proteção do encapsulado (PONCELET, 2006).

Os métodos de microencapsulação podem ser divididos em físicos (ou mecânicos), químicos e físico-químicos. O processo físico é muito utilizado industrialmente, uma vez que o método é facilmente adaptável à produção em grande escala (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; CABRAL, 2004).

Métodos físicos incluem o *spray drying*, pulverização em banho térmico, revestimento em leito fluidizado e extrusão centrífuga com múltiplos orifícios. De modo geral, as micropartículas formadas são cobertas pelo material encapsulante pulverizado sobre elas, formando a película de revestimento. Dentre os métodos físicos, a secagem por atomização, ou *spray-drying*, é a técnica mais empregada para a obtenção de microcápsulas. Neste método, o fármaco solubilizado ou

disperso é atomizado juntamente com o material de revestimento em uma câmara de evaporação, na qual as micropartículas nebulizadas são rapidamente solidificadas. É um processo que permite o encapsulamento de materiais termosensíveis e produção de micropartículas com características físicas uniformes (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; CABRAL, 2004; PONCELET, 2006).

Os métodos químicos fundamentam-se no desenvolvimento de reações químicas, mais comumente, a polimerização. Uma emulsão contendo monômeros é estabilizada numa fase externa normalmente aquosa, contendo micelas com monômeros dissolvidos e tensoativo. Ao inserir um iniciador no sistema, ocorre a reação de polimerização no interior hidrofóbico das micelas, onde as micropartículas de polímero são estabilizadas pelo tensoativo. Esta técnica pode ser modificada, utilizando pré-polímeros ou invertendo as fases contínuas e dispersas (PONCELET, 2006).

Outro método químico é a gelificação iônica, um processo onde ocorre a formação de micropartículas gelatinosas através da reação de polímeros com polieletrólitos de cargas opostas que se ligam ionicamente, formando um complexo estável. É um procedimento que viabiliza o encapsulamento de células, uma vez que a membrana obtida é permeável e permite a livre difusão de pequenas moléculas. O material encapsulante mais empregado nesta técnica é o alginato de sódio (poliânion), que em contato com o cloreto de cálcio (cátion), forma uma membrana pouco solúvel em água, porém permeável (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; PONCELET, 2006; CORRÊA, 2008).

Este método possui a vantagem de necessitar condições brandas para seu processo, pois não utiliza altas temperaturas, agitação vigorosa e nem solventes orgânicos, permitindo o encapsulamento de substâncias que degradariam sob outras condições (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2005).

Normalmente os métodos físico-químicos estão fundamentados na dissolução das substâncias ativas e encapsulante num solvente, seguida da adição de uma substância não-solvente, que irá precipitar o polímero ou separar as fases (CABRAL, 2004).

Dentre os métodos físico-químicos, a coacervação é o mais antigo para a obtenção de micropartículas. O processo consiste na deposição de material polimérico na superfície do material a ser encapsulado por meio de alteração de

características físico-químicas como pH, temperatura, força iônica ou polaridade (SUAVE *et al.*, 2006; PONCELET, 2006). Existem dois tipos de coacervação, a simples, onde apenas um polímero está envolvido e a complexa, onde ocorre a complexação de polieletrólitos com cargas opostas (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; CABRAL, 2004; PONCELET, 2006; SUAVE *et al.*, 2006). É considerada uma técnica complexa em termos operacionais e necessita de controle minucioso das condições experimentais. No entanto, apresenta rendimentos elevados de encapsulação de fármacos lipossolúveis (SILVA *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Encapsulante

Diferentes substâncias podem ser utilizadas para o encapsulamento, sendo selecionadas em função das propriedades físicas e químicas da substância a ser encapsulada, da aplicação pretendida e do método a ser utilizado (SUAVE *et al.*, 2006).

O encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo, ter baixa higroscopicidade para evitar aglomeração de micropartículas e facilitar manipulação e incorporação aos veículos, não reagir com o material encapsulado, ter capacidade de armazenar adequadamente o material ativo dentro da estrutura da cápsula, proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas (luz, pH, oxigênio, umidade), possuir propriedades desejadas de liberação do material ativo, não possuir sabor desagradável para formulações de uso oral e ser econômico (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; SUAVE *et al.*, 2006).

As substâncias encapsulantes podem ser carboidratos (amido, xarope de milho), celuloses (carboximetilcelulose etil-celulose), gomas (arábica, alginato de sódio), lipídios (ácido esteárico, cera, parafina), proteínas (gelatina, caseína), polímeros naturais ou sintéticos (poliacrilatos, copolímeros de polietileno-co-propileno) e outras substâncias, como a quitosana e as proteínas do soro do leite (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; SUAVE *et al.*, 2006).

Devido à utilização das micropartículas na produção de medicamentos, alimentos e pesticidas, o material encapsulante deve ser preferencialmente

biocompatível e biodegradável, sem gerar produtos tóxicos (CABRAL, 2004; SUAVE *et al.*, 2006).

O material encapsulante deve também ser resistente o suficiente para manter suas funções de proteção e liberação de substâncias, sem que haja degradação da micropartícula no veículo em que se encontra, permanecendo viável até sua aplicação (CABRAL, 2004).

A gelatina é um material comumente empregado, porém, existem vários polímeros, naturais ou sintéticos, que podem ser utilizados, visando à produção de micropartículas cuja liberação do fármaco seja a desejada (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Os polímeros, tanto sintéticos como naturais, merecem destaque pela sua versatilidade de uso. Podem ser desde insolúveis até solúveis pH-dependentes, permeáveis, semi-permeáveis ou impermeáveis e normalmente biodegradáveis. Devido a estas características é possível a utilização dos polímeros para as mais diversas formas de administração e liberação modificada de fármacos (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

#### 2.3.3.1 Alginato de sódio

Muitos trabalhos têm explorado o potencial de uso do alginato de sódio como material encapsulante, por ser um polímero natural, de fácil obtenção, biocompatível e biodegradável, que não necessita utilização de solventes orgânicos e nem condições rigorosas de temperatura para a formação das micropartículas, além de ter relativo baixo custo (FUNDUEANU *et al.*, 1999; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

São comumente utilizados como agente desintegrante em comprimidos, suspensor e espessante em géis, loções e cremes e estabilizador em emulsões, além de seu emprego em sistemas de liberação controlada (TU *et al.*, 2005).

Os alginatos são polímeros lineares formados pela ligação de resíduos dos ácidos  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G) em proporções, ordens e massas moleculares diferentes, arranjados como blocos ao longo da cadeia. Os blocos podem apresentar-se como sequência homopolimérica (MM e GG) ou como sequências alternadas de MG, sendo sua fórmula geral representada por  $(C_6H_8O)_n$ .

A composição, sequência de disposição dos blocos e massa molecular são responsáveis pelas propriedades físicas dos alginatos, sendo parâmetros importantes na formação das micropartículas (CHAN; LEE; HENG, 2001; SIMPSON *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006).

Ocorrem naturalmente, sob forma de sais misto de cálcio, sódio, magnésio e potássio em algas marinhas marrons, como *Laminaria hiperbórea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* e em algumas bactérias do solo (THU *et al.*, 1996; SEGATO, 2007).

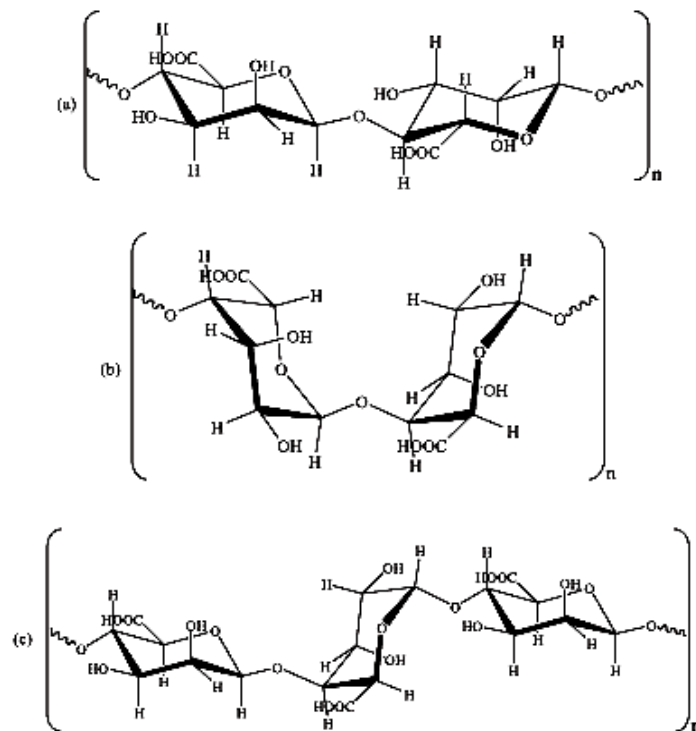


FIGURA 9 - COMPOSIÇÃO DE ALGINATOS: (A) RESÍDUOS DE ÁCIDO MANURÔNICO; (B) RESÍDUOS DE ÁCIDO GULURÔNICO; (C) CADEIA DE RESÍDUOS DE ÁCIDOS MANURÔNICO E GULURÔNICO ALTERNADOS.

FONTE: KAWAGUTI e SATO (2008)

Soluções aquosas de alginato de sódio a 1% (p/p) apresentam pH aproximado de 7,2. São pouco solúveis em álcool e outros solventes orgânicos e soluções aquosas com pH menor que 3. Em água, solubiliza-se vagarosamente, apresentando-se como solução coloidal viscosa. Esta viscosidade é alterada em função da concentração, pH, temperatura ou presença de íons metálicos (REIS *et al.*, 2006).

Em presença de cátions divalentes, comumente  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Ba}^{+2}$ , formam hidrogéis pouco solúveis, devido à ligação cruzada destes íons com os grupos carboxílicos dos resíduos de ácido gulurônico. Esta ligação forma uma rede

tridimensional, num modelo chamado de “caixa de ovo”, no qual os íons divalentes encontram-se nas cavidades eletronegativas do alginato (FUNDUEANU *et al.*, 1998; SIMPSON *et al.*, 2004; KAWAGUTI; SATO, 2008; DOHNAL; STEPANEK, 2010).

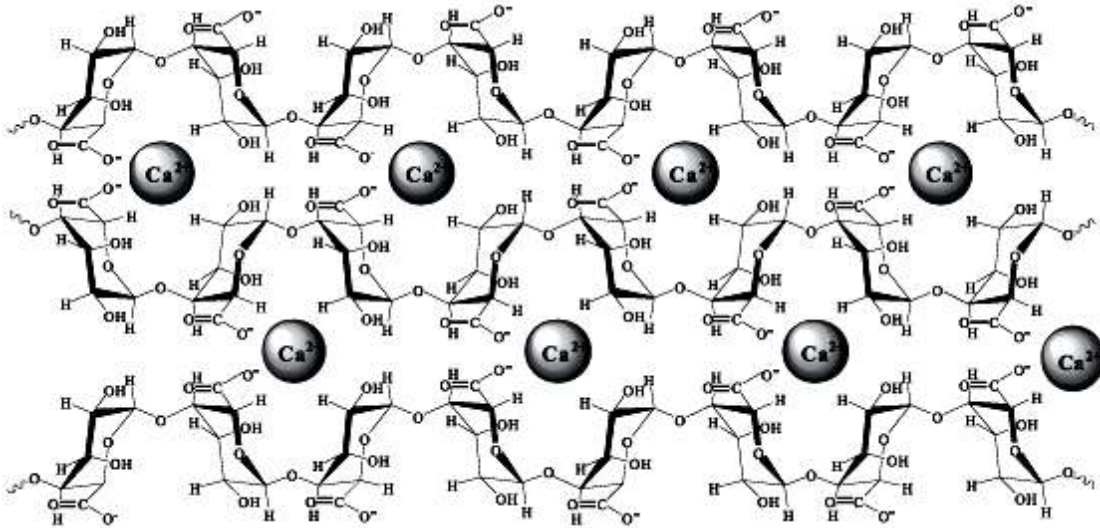


FIGURA 10 - LIGAÇÃO ENTRE AS CADEIAS HOMOPOLIMÉRICAS ATRAVÉS DOS ÍONS CÁLCIO SITUADOS ENTRE OS GRUPOS COM CARGA NEGATIVA  
 FONTE: KAWAGUTI e SATO (2008)

As propriedades físicas do gel formado variam de acordo com a composição do alginato (proporções e sequência de M e G) e a concentração de íons existentes no meio. Alginatos com maiores concentrações de resíduos de ácido gulurônico tendem a formar géis mais firmes e que mantêm sua integridade por um período de tempo superior aos alginatos com maiores concentrações de resíduos de ácido manurônico (SIMPSON *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006).

As micropartículas de alginato-cálcio são muito utilizadas para encapsulação de diversas substâncias, como óleos, fármacos, células e proteínas. Macromoléculas instáveis em água, como as proteínas, são encapsuladas em micropartículas de alginato, pois estas criam um ambiente hidrofílico que dificulta sua desnaturação (SCHOUBBEN *et al.*, 2010). Estas micropartículas são utilizadas também para encapsular materiais bioativos, devido à grande porosidade da membrana, que permite a passagem de pequenas moléculas (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

Usualmente as micropartículas de alginato-cálcio são preparadas pelos métodos de gelificação iônica externa, gelificação iônica interna ou de emulsificação. No primeiro, uma solução de alginato contendo a substância ativa é gotejada sobre



uma solução gelificante, normalmente cloreto de cálcio. O método não exige condições específicas para produção e possui ótima eficiência de encapsulação, porém, o tamanho das micropartículas é determinado pelo sistema de extrusão utilizado como gotejamento com agulha e atomização, o que limita o tamanho das mesmas (FUNDUEANU *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 1999; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

Vários trabalhos apresentam sistemas extrusores para obtenção de micropartículas com tamanho inferior a 1 mm, de formato esférico e em escala industrial. Dentre eles, dispersão em fluxo de ar, gotejamento por força eletrostática, vibração, atomização por rotação de disco ou agulhas (PONCELET, 2006; PRÜSSE *et al.*, 2008).

No método de emulsificação é necessário o uso de solventes orgânicos e aquecimento para formação de emulsão, fatores estes que limitam sua utilização (FUNDUEANU *et al.*, 1998; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

O método de gelificação interna consiste no uso de sais pouco solúveis de cálcio em água. Após acidificação do sistema, ocorre a liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , que reagem com o alginato para a formação das micropartículas. Por este método, o tamanho das micropartículas obtidas depende do tamanho das gotículas do sistema inicial e não do equipamento extrusor (FUNDUEANU *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 1999; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

As micropartículas de alginato-cálcio apresentam excelente propriedade bioadesiva, principalmente quando associadas à quitosana, mostrando um grande potencial para liberação de fármacos na mucosa gástrica (TU *et al.*, 2005; WITTAYA-AREEKUL; KRUEENATE; PRAHSARN, 2006).

Em pH abaixo de 2,5 apresentam menor grau de intumescimento, característica esta associada à resistência ao pH estomacal e liberação entérica das substâncias encapsuladas (ACARTÜRK; TAKKA, 1999; MENNINI *et al.*, 2012).

No entanto, a liberação do material encapsulado em alginato-cálcio é normalmente rápida, pois as micropartículas apresentam poros com diâmetros de cerca de 10  $\mu\text{m}$  (RIBEIRO *et al.*, 1999). Recursos utilizados para aumentar o tempo de liberação incluem a aplicação de um revestimento sobre as micropartículas, ou a utilização de uma mistura de polímeros. De maneira geral este revestimento consiste de um material carregado positivamente, como a quitosana ou a poli-lisina, que formam uma camada protetora que irá diminuir a porosidade das micropartículas e

aumentar sua estabilidade (TU *et al.*, 2005; LIRA *et al.*, 2009; DOHNAL; STEPANEK, 2010; MENNINI *et al.*, 2012).

### 2.3.3.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero catiônico hidrofílico, obtido a partir da desacetilação da quitina, principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Pode também ocorrer naturalmente na parede celular de alguns tipos de fungos, como os pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; NIU *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

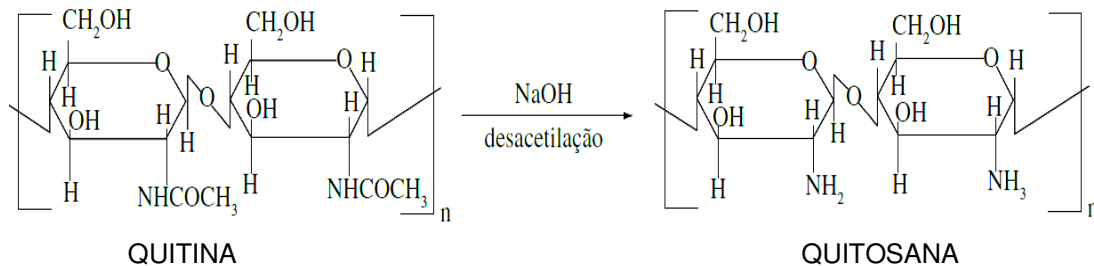


FIGURA 11 - REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA  
 FONTE: SPIN-NETO *et al.* (2008)

A desacetilação da quitina resulta em cadeias poliméricas constituídas por unidades que sofreram a reação (D-glicosamina) e liberaram os grupos amino e de unidades que não foram alteradas (N-acetil-D-glicosamina). Estas unidades variam ao longo da cadeia, tanto em quantidade quanto em distribuição (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

As propriedades físico-químicas da quitosana, como solubilidade, pKa e viscosidade dependem do grau de desacetilação (GD) do polímero, parâmetro que indica a percentagem de unidades monoméricas que contêm grupos amino (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010).

A quitosana apresenta-se pouco solúvel em água, porém, na presença de soluções aquosas de ácidos orgânicos, como o acético e inorgânicos como o clorídrico, ocorre a protonação dos grupos amino, que leva ao aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias e a solvatação em água, formando soluções viscosas

(SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SANTOS *et al.*, 2009). Nestas condições, a quitosana expõe sua natureza policatiônica (RINAUDO, 2006).

Devido à sequência não homogênea de unidades monoméricas, diferentes amostras de quitosana apresentam diferentes características quanto ao grau de desacetilação, viscosidade e massa molar, que podem influenciar nas propriedades finais do polímero (CANELLA; GARCIA, 2001).

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por técnicas variadas, como a titulação condutométrica, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, análise elementar, cromatografia líquida de alta eficiência e termogravimetria (RINAUDO, 2006; SANTOS *et al.*, 2003; ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010).

A determinação da viscosidade de soluções diluídas de polímeros é normalmente utilizada para a avaliação de suas propriedades, como a massa molecular, dimensão extensão de solubilidade no solvente entre outras.

A medida da viscosidade intrínseca é um dos processos mais usados para determinação da massa molar de polímeros devido a facilidade de acesso e utilização. São feitas com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, utilizando-se um viscosímetro (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008; PAULINO, 2008).

Para uma solução diluída, podemos assumir que a densidade da solução seja da mesma ordem de grandeza da densidade do solvente e a viscosidade relativa é simplesmente a razão entre os tempos de escoamento da solução e do solvente puro.

A viscosidade pode ser definida como viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ), viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ), viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ), viscosidade inerente ( $\eta_{in}$ ) e viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), sendo expressas pelas equações dispostas no Quadro 4, onde C é a concentração da solução polimérica, t é o tempo de escoamento da solução de polímero e  $t_0$  o tempo de escoamento do solvente.

Viscosidade	Equação
Relativa	$\eta_{rel} = t / t_0$
Específica	$\eta_{esp} = (t - t_0) / t_0$
Reduzida	$\eta_{red} = \eta_{sp} / C$
Inerente	$\eta_{in} = \ln \eta_{rel} / C$
Intrínseca	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{red}) = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/C)$

QUADRO 4 – EXPRESSÕES DE VISCOSIDADE

A viscosidade intrínseca é expressa a partir da extrapolação da concentração da solução quando esta tende para zero ( $C \rightarrow 0$ ).

Para medida de viscosidade, as interações entre as macromoléculas do sistema devem ser nulas. Além disso, utiliza-se um sistema diluído, ajustando-se a força iônica do meio e aplicando-se a Equação de Huggins (Equação 1).

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + K_H [\eta]^2 \cdot C \quad (1)$$

Onde,  $K_H$  é a constante de Huggins, característica do polímero, da temperatura, sistema de solvente usado, grau de acetilação, do raio hidrodinâmico do polímero e de sua massa e  $C$  a concentração da solução ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Com a utilização dos métodos de viscosidade é possível determinar a viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica, utilizando a equação de Mark-Houwink (Equação 2).

$$[\eta] = K_H \cdot M_v^\alpha \quad (2)$$

Em que,  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca da solução;  $K_H$  é a constante de Huggins,  $\alpha$  é a constante característica da geometria da molécula do polímero e  $M_v$  ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) é a massa molar média viscosimétrica.

Para a maior parte dos sistemas  $\alpha$  assume valores entre 0,5 e 0,8. O valor de 0,5 equivale a uma conformação de esfera rígida e valores maiores que 1

equivale a um bastão rígido. A constante de Huggins ( $K_H$ ) tem valores típicos entre 0,05 e 0,5 mL g<sup>-1</sup> e nos fornece informações sobre estas interações soluto-solvente e, quanto menor for o seu valor, mais solvatada está a macromolécula (RINAUDO, 2006; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

Devido às propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e mucoadesividade, a quitosana é utilizada em diferentes áreas, como na produção de cosméticos, medicamentos, produtos alimentícios e no desenvolvimento de biomateriais (JANEGITZ *et al.*, 2007). A quitosana apresenta também propriedade antimicrobiana (COOK *et al.*, 2011).

A associação alginato-quitosana, na forma de micropartículas, mostrou-se interessante para utilização no transporte de proteínas, fármacos e outras substâncias através da mucosa gastrointestinal ou nasal, atuando como um sistema de liberação específico nestes locais (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA, 2008; SPIN-NETO *et al.*, 2008).

A ligação entre os polímeros ocorre devido à interação eletrostática entre os grupos carboxílicos disponíveis do alginato e os grupos amino da quitosana. Neste processo, o pH do meio de reação e o tipo de polímero utilizado influenciam na formação das micropartículas, refletindo diretamente na liberação da substância encapsulada (GASEROD; SMIDSRD; SKJAK-BRAEK, 1998; SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2002; LUCINDA-SILVA; EVANGELISTA, 2005; CALIJA *et al.*, 2011).

Autores sugerem que em pH 5, os grupos carboxílicos do alginato e os amino da quitosana estariam mais disponíveis para interação em decorrência da maior quantidade de grupos ionizados, resultando na formação de um complexo com melhor rendimento de ligações e influenciando diretamente no tempo de liberação da substância encapsulada (SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2002; LUCINDA-SILVA; EVANGELISTA, 2005; CALIJA *et al.*, 2011).

Gaserod, Smidsrod e Skjak-Braek (1999) realizaram um estudo sobre a interação entre o alginato e a quitosana durante o processo de obtenção das micropartículas. Os pesquisadores discutiram sobre a influência dos íons Ca<sup>+2</sup> durante o processo, afirmando que estes seriam necessários para a formação de uma rede de gel de alginato mais poroso, que permite a difusão da quitosana no interior da micropartícula antes da blindagem da superfície, aumentando o número

de ligações entre os polímeros. O mesmo resultado foi apresentado por Lucinda-Silva e Evangelista (2005).

Honary, Maleki e Karami (2009) demonstraram que micropartículas de alginato-quitosana preparadas com quitosana de maior massa molecular eram menores, mais estáveis e possuíam maior propriedade mucoadesiva que as obtidas com quitosanas de menor massa molecular, apontando o efeito positivo da massa molecular sobre a liberação controlada de substâncias. Ribeiro e colaboradores (1999) e Calija e colaboradores (2011) acrescentaram ainda que quitosanas com alto peso molecular não penetram, ou penetram muito pouco, no interior da micropartícula, formando uma membrana fina e resistente sobre a superfície da mesma, dificultando a saída do material encapsulado. Este processo ocorre num período de até 30 minutos.

Em contrapartida, quitosanas de baixo peso molecular (abaixo de 20.000Da) ligam-se em maior quantidade ao alginato, uma vez que conseguem penetrar no interior das micropartículas. No entanto este processo necessita de um tempo maior de contato entre as micropartículas e a solução de quitosana (GASEROD; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1998; HONARY; MALEKI; KARAMI, 2009).

Portanto, faz-se necessária a caracterização da quitosana quanto ao grau de desacetilação e peso molecular, pois estes dois parâmetros influenciam diretamente na quantidade e extensão de ligações entre os dois polímeros (HONARY; MALEKI; KARAMI, 2009).

As micropartículas de alginato-cálcio-quitosana podem ser obtidas por dois métodos, chamados de uma etapa e duas etapas. No primeiro método, uma membrana coacervada complexa é formada quando a solução de alginato contendo a substância a ser encapsulada é gotejada diretamente sobre uma solução de cloreto de cálcio contendo quitosana. No segundo método, as micropartículas já formadas de alginato-cálcio são mergulhadas em uma solução de quitosana, após lavagem para retirada do excesso de íons cálcio (GASEROD; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1998; MI; SUNG; SHYU, 2002; WITTAYA-AREEKUL; KRUEENATE; PRAHSARN, 2006).

Pasparakis e Bouropoulos (2006) compararam micropartículas de alginato-cálcio e alginato-cálcio-quitosana obtidas pelos métodos de uma e duas etapas. De acordo com os pesquisadores, as micropartículas de alginato-cálcio-quitosana obtidas pelo processo de uma etapa, apresentaram menor grau de encolhimento e

intumescimento, fatores importantes para a estabilidade das micropartículas, ocasionado pela estrutura entrelaçada entre os polímeros no momento do preparo.

### 2.3.3.3 Amido

O amido é um biopolímero, biocompatível, utilizado isolado ou em associação a outros polímeros, nos sistemas de liberação controlada (WANG *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2011). É constituído de cadeias lineares de amilose e ramificadas de amilopectina, polímeros de glicose, organizados em estrutura semi-cristalina (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Apresenta-se como um excelente biomaterial, pois a amilopectina possui estrutura química similar ao glicogênio humano, facilitando sua utilização *in vivo*. O amido é também facilmente degradado a oligossacarídeos, maltose e glicose pela amilase sérica (BJÖRSES *et al.*, 2011).

Industrialmente é utilizado em diversas áreas, tanto em sua forma elementar, quanto modificada. Amidos catiônicos e ésteres fosfatos são utilizados na indústria de papel enquanto os ácidos modificados, oxidados e esterificados possuem aplicação na indústria têxtil e na fabricação de papel, cartão e *drywall*. Na indústria agroquímica, o amido tem sido utilizado na liberação controlada de pesticidas e herbicidas, pois é biodegradável em diversos meios agrícolas (GLENN *et al.*, 2010).

Microesferas degradáveis de amido são utilizadas na oclusão vascular temporária durante a administração concomitante a fármacos citotóxico em neoplasias e como agente hemostático tópico. Devido a sua propriedade bioadesiva, as microesferas de amido são empregadas na administração nasal de medicamentos, incluindo insulinas (MALAFAYA; STAPPERS; REIS *et al.*, 2006; BJÖRSES *et al.*, 2011).

### 2.3.4 Caracterização das micropartículas

As principais características das micropartículas a serem avaliadas incluem a estrutura interna e externa, tamanho e distribuição de tamanho das micropartículas, composição da parede encapsulante e do material encapsulado,

rendimento e atividade do encapsulado, comportamento de liberação e estabilidade (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

Os ensaios devem assegurar a qualidade, homogeneidade e comportamento biofarmacêutico desejável (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; SUAVE *et al.*, 2006).

As características morfológicas, como o tamanho e a estrutura interna são importantes principalmente quando empregadas em formulações para uso via parenteral, onde a uniformidade no tamanho das micropartículas deve ser a máxima possível. Estas características podem ser avaliadas pela observação das micropartículas sob microscopia óptica e eletrônica de varredura (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A observação das micropartículas em microscopia óptica auxilia na análise da eficiência do processo ou real formação das micropartículas, da integridade da parede e do tamanho e uniformidade das mesmas. A microscopia eletrônica auxilia a visualização da superfície das micropartículas, existência de porosidade e estrutura interna, além de morfologia e tamanho (SANTOS, 2003).

O rendimento de produção refere-se à porcentagem de micropartículas obtidas em relação à quantidade total de material (material ativo + encapsulante) empregado. A capacidade ou rendimento de encapsulamento determina a quantidade de substância encapsulada, sendo que sua relação com a quantidade teórica ou inicial expressa a eficiência de encapsulação (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; OLIVEIRA, 2007).

A quantificação pode ser realizada diretamente extraindo-se a substância encapsulada, ou indiretamente, quantificando o resíduo não encapsulado (OLIVEIRA, 2007).

Os métodos de quantificação da substância encapsulada variam de acordo com sua natureza química, sendo os ensaios cromatográficos e espectrofotométricos os mais utilizados (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

A verificação de possível interação fármaco-polímero é também de grande importância, pois a maioria das metodologias utilizadas no processo de microencapsulamento envolve o contato íntimo do polímero com o fármaco, o que pode influenciar na eficácia terapêutica da forma farmacêutica final (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2005). Para esta finalidade, é possível a utilização de métodos termo-analíticos, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG) associadas à espectroscopia na região do



infravermelho ou à difração de raios X. Por estes métodos, as propriedades físico-químicas de substâncias são avaliadas em função do tempo ou temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de temperatura (GIRON, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Na indústria farmacêutica, a termoanálise possui várias aplicações, como verificação de pureza estabilidade e degradação de fármacos e investigação de interação excipiente-fármaco estudos importantes para avaliação de pré-formulações (GIRON, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; IONASHIRO, 2004).

A termoanálise é também utilizada para a análise de polímeros, na investigação de interações entre os polímeros e os fármacos na forma de micropartículas, podendo verificar reações de polimerização, despolimerização e degradação (MANLEY, 1989; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; IONASHIRO, 2004).

O último ponto a ser analisado é o de liberação do fármaco. A liberação pode ocorrer através da ruptura mecânica, mediante ação da temperatura e do pH, por meio da biodegradação, pela solubilidade no meio e também por difusão. É dependente do tipo de polímero utilizado abrangendo sua solubilidade, massa molecular e estado cristalino, da substância ativa encapsulada considerando seu massa molecular e solubilidade e da micropartícula formada, se esfera ou cápsula e a quantidade de conteúdo encapsulado em relação ao polímero (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; SUAVE *et al.*, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

##### 3.1.1 Reagentes

Acetato de sódio	- PA, Merck
Ácido acético glacial	- Synth, Brasil
Ácido clorídrico	- PA, Dinâmica, Brasil
Ácido sulfúrico concentrado	- PA, Vetec, Brasil
Alginato de sódio	- Protanal LF 20 / 40, FMC Bio Polymer, EUA, com viscosidade de 100 a 200 mPas e alto conteúdo de resíduos G (65 – 75%)
Amido de milho	- DEG, Brasil
Anidrido acético	- PA, Merck
Carbonato de cálcio	- Viafarma, Brasil
Cloreto de cálcio	- diidratado, All Chemistry, Brasil
Cloreto de sódio	- PA, Labimpex
Clorofórmio	- PA, Vetec, Brasil
Estigmasterol	- Stigmasterol / stigmasterin, lote 51106070, Fluka, EUA, grau de pureza superior a 90%
Etanol	- PA, Dinâmica, Brasil
Éter etílico	- PA, Dinâmica, Brasil
Hexano	- PA, Dinâmica, Brasil
Hidróxido de amônio	- PA, Vetec, Brasil
Hidróxido de potássio	- PA, Henrifarma, Brasil
Hidróxido de sódio	- PA, Labimpex, Brasil
Metanol	- PA, Vetec, Brasil
Óleo de canola	- Cargill, Brasil, lote L01C
Óleo de silicone	- DC 200 / 350, DEG, Brasil
Poloxâmico 407	- Embrafarma, Brasil
Quitossana	- Galena, Brasil, lote K020927281,

Span <sup>®</sup> 60	- monoestearato de sorbitana, Galena, Brasil
Sulfato de sódio	- anidro, Vetec, Brasil
Tween <sup>®</sup> 80	- monooleato de sorbitano-20-polioxietileno, DEG, Brasil

### 3.1.2 Equipamentos

Ultrassom	- Ultra Cleaner 1400, Unique, Brasil
Condutivímetro portátil	- PHTek CD 203
Viscosímetro capilar	- Cannon-Fenske
Agitador mecânico	- RW20 digital, Ika
Agitador magnético	- RCT basic, Ika
Microscópio óptico	- Studarlab
Câmera digital	- Stylus Tough 8000, Olympus
Microscópio eletrônico de varredura	- Phenom 10001 Tabletop
Espectrofotômetro	- UV 1800, Shimadzu

### 3.2 SOLUBILIZAÇÃO DO ESTIGMASTEROL

A solubilidade foi testada até saturação do solvente, verificada por turvação do mesmo.

Foi pesado 1,0 g de óleo de canola, adicionado 1,0 mg de ST e homogeneizado em aparelho de ultrassom à temperatura ambiente até completa solubilização. O processo foi repetido, adicionando a cada etapa, alíquotas iguais de estigmasterol, até surgimento de turvação no sistema.

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA

A purificação da CHI foi realizada de acordo com Signini e Campana-Filho (1998). Pesou-se 1,0 g de CHI que foi dissolvida em 40mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,5 M com agitação constante por 20 horas. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo em funil com placa de vidro sinterizado e em seguida, filtrada sob pressão positiva em filtro de membrana de celulose 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore). À solução filtrada adicionou-se aos poucos,  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, até completa precipitação do polímero. O precipitado foi centrifugado, lavado com água deionizada até pH neutro e posteriormente com MeOH, a temperatura ambiente. O polímero foi secado em estufa, a 60 °C por 24 horas. Após este período, a CHI purificada foi mantida em dessecador com sílica por 2 horas, triturada e tamisada.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

#### 3.4.1 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação foi determinado por titulação condutométrica, conforme Santos e colaboradores (2003). Foram pesados 0,2 g de CHI e solubilizados em 40 mL de HCl 0,05 M por 18 horas com agitação constante, a temperatura ambiente. A solução foi titulada com NaOH 0,17 M a temperatura ambiente. As medidas de condutância ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) foram avaliadas com condutímetro.

### 3.4.2 Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca foi determinada segundo Signini e Campana-Filho (1998) relacionando-se a viscosidade reduzida e a concentração de CHI.

Foi pesada uma amostra de 0,2 g de CHI a qual foi solubilizada em 25mL de solução tampão com pH 4,5 constituído de 0,3 M de CH<sub>3</sub>COOH / 0,2 M de CH<sub>3</sub>COONa, sob agitação constante por 15 horas. A solução foi aquecida em banho-maria a 80°C durante dois minutos e após resfriamento até temperatura ambiente foram acrescentados 25 mL de solução tampão, a qual foi novamente aquecida a 80°C por dois minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em membrana de celulose de porosidade 0,22 µm.

A solução foi sequencialmente diluída por adição do tampão CH<sub>3</sub>COOH / CH<sub>3</sub>COONa e as medidas de viscosidade foram realizadas a cada diluição, iniciando-se com viscosidade relativa ( $t / t_0$ ) menor que 1,8 até atingir uma viscosidade relativa próxima de 1,2. Os tempos de escoamento foram determinados em viscosímetro capilar Cannon-Fenske ( $\varnothing = 0,54$  mm), termostaticado em 25° ± 0,1°C em sistema AVS 350 (Schott-Geräte).

Os valores dos tempos de escoamento correspondem à média de três determinações independentes a cada diluição.

## 3.5 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO-AMIDO-QUITOSANA

### 3.5.1 Obtenção de micropartículas por gelificação iônica externa

Inicialmente foram realizados testes com diferentes concentrações de polímeros, tensoativos, óleo de canola e soluções gelificantes. A caracterização das micropartículas quanto ao tamanho, forma e presença ou não de agregação, possibilitou a escolha do sistema mais adequado para a continuidade do trabalho. O esquema das formulações testadas encontra-se na Tabela 1.

TABELA 1 – FORMULAÇÕES PARA GELIFICAÇÃO EXTERNA

<b>Fórmula</b>	<b>Alginato (p/p)</b>	<b>Amido (p/p)</b>	<b>Tensoativo (p/p)</b>	<b>Óleo + ST (p/p)</b>	<b>Solução gelificante (p/v)</b>
01	0,5%	---	---	10%	CaCl <sub>2</sub> 1,0%
02	0,5%	---	Poloxâmero 0,3%	10%	CaCl <sub>2</sub> 1,0%
03	0,5%	---	Tween <sup>®</sup> 80 1,0%	10%	CaCl <sub>2</sub> 1,0%
04	1,0%	---	Poloxâmero 0,3%	10%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
05	1,0%	---	Tween <sup>®</sup> 80 1,0%	10%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
06	1,0%	---	Poloxâmero 0,3%	20%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
07	1,0%	---	Tween <sup>®</sup> 80 1,0%	20%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
08	1,0%	---	Poloxâmero 0,3%	30%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
09	1,0%	---	Tween <sup>®</sup> 80 1,0%	30%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
10	1,0%	0,3%	Poloxâmero 0,3%	10%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%
11	1,0%	0,3%	Poloxâmero 0,3%	20%	CaCl <sub>2</sub> 2,0%

A formulação escolhida foi testada também com solução gelificante de CaCl<sub>2</sub> 2,0% contendo 0,5% de CHI previamente solubilizada em CH<sub>3</sub>COOH a 1,0% (v/v). De acordo com as características avaliadas, optou-se pela Formulação 11 neste trabalho.

As micropartículas de alginato-amido-quitosana foram obtidas pelo método de uma etapa. Um sistema foi preparado dispersando-se 20 g de óleo de canola contendo 0,2 g de ST, em 80 g de solução aquosa de alginato de sódio 1,0% (p/p) contendo 0,3% (p/p) de amido de milho e 0,3% (p/p) de poloxâmero 407. Ambas as fases encontravam-se a 60°C durante a dispersão e foram resfriadas espontaneamente, com agitação de 800 rpm por 15 minutos em agitador mecânico. O sistema formado foi gotejado com seringa de vidro (Artglass) e agulha 13 mm x 0,45 mm (Becton-Dickinson) em 100 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 2,0% (p/v) contendo 0,5% de CHI (p/v) previamente solubilizada em 25 mL de solução de CH<sub>3</sub>COOH 1% (v/v). A solução gelificante (CaCl<sub>2</sub> / CHI) foi mantida em rotação de 250 rpm e temperatura ambiente em agitador magnético. O esquema de trabalho encontra-se representado na Figura 12.

As micropartículas produzidas foram deixadas em contato com a solução gelificante por 60 minutos. Após este período, foram lavadas duas vezes com 200mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M contendo 1,0% de Tween<sup>®</sup> 80 (p/v) e filtradas a vácuo.

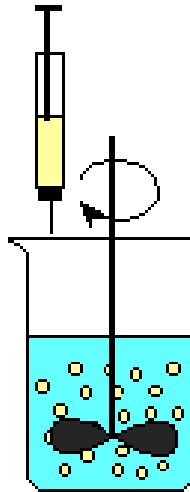


FIGURA 12 – ESQUEMA DO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA

Após remoção do excesso de água, as micropartículas úmidas foram pesadas para posterior determinação de umidade e granulometria (itens 3.6.3 e 3.6.4).

Posteriormente foram secas, parte em coluna de ar a 50°C até peso constante e parte liofilizadas.

As micropartículas secas em coluna de ar foram pesadas, submetidas ao processo de granulometria e preparadas para a determinação do conteúdo de óleo encapsulado, conforme item 3.5.5.

### 3.5.2 Obtenção de micropartículas por gelificação iônica interna

Para o processo de gelificação iônica interna, foram realizados testes para determinação da formulação cujo resultado apresentou micropartículas com melhores características morfológicas. Para tanto, foram verificadas diferentes concentrações de alginato de sódio,  $\text{CaCO}_3$  e de tensoativos para produção da emulsão primária conforme Tabela 2.

TABELA 2 – FORMULAÇÕES PARA GELIFICAÇÃO INTERNA

<b>Fórmula</b>	<b>Alginato (p/p)</b>	<b>CaCO<sub>3</sub> (p/p)</b>	<b>Amido (p/p)</b>	<b>Tensoativo (p/p)</b>	<b>Óleo + ST (p/p)</b>
01	3,0%	5,0%	---	0,4% Span <sup>®</sup> 60 + 0,6% Tween <sup>®</sup> 80	30%
02	0,5%	1,0%	---	0,4% Span <sup>®</sup> 60 + 0,6% Tween <sup>®</sup> 80	1,0%
03	1,0%	1,0%	---	0,4% Span <sup>®</sup> 60 + 0,6% Tween <sup>®</sup> 80	1,0%
04	2,0%	1,0%	---	0,4% Span <sup>®</sup> 60 + 0,6% Tween <sup>®</sup> 80	1,0%
05	3,0%	1,0%	---	0,8% Span <sup>®</sup> 60 + 1,2% Tween <sup>®</sup> 80	10%
06	3,0%	3,0%	---	1,2% Span <sup>®</sup> 60 + 1,8% Tween <sup>®</sup> 80	15%
07	3,0%	3,75%	---	0,4% Span <sup>®</sup> 60 + 0,6% Tween <sup>®</sup> 80	30%
08	3,0%	3,0%	---	1,0% Span <sup>®</sup> 60 + 4,0% Tween <sup>®</sup> 80	30%
09	3,0%	0,375%	---	1,0% Span <sup>®</sup> 60 + 4,0% Tween <sup>®</sup> 80	30%
10	3,0%	0,375%	---	1,0% Span <sup>®</sup> 60 + 4,0% Tween <sup>®</sup> 80	20%
11	3,0%	0,375%	0,375%	1,0% Span <sup>®</sup> 60 + 4,0% Tween <sup>®</sup> 80	20%

O processo de gelificação interna foi adaptado de Poncelet e colaboradores (1992) e Ribeiro e colaboradores (1999), sendo o esquema de trabalho representado na Figura 13.

De acordo com as características avaliadas, optou-se pela Formulação 11 neste trabalho.

Inicialmente, foram preparadas 100 g de uma emulsão primária O / A, dispersando-se 80 g de uma fase aquosa composta por 3 g de alginato de sódio; 0,375 g de CaCO<sub>3</sub> micronizado; 0,3 g de amido de milho e 4 g de Tween<sup>®</sup> 80 em 20g de óleo de canola contendo 0,2 g de ST solubilizado e 1 g de Span<sup>®</sup> 60. Ambas as fases foram aquecidas a 60°C e agitadas a 800 rpm em agitador mecânico por 15 minutos. Esta emulsão foi invertida a um sistema O / A / O, quando adicionada em igual quantidade de óleo de silicone, sob agitação de 800 rpm por 5 minutos. A emulsão foi acidificada com 450 µL de CH<sub>3</sub>COOH dissolvido em 5 mL de óleo de silicone, reduzindo a velocidade de agitação para 200 rpm, por 5 minutos. Após este período, foi adicionada 100 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M contendo 1,0% (p/v) de



Tween<sup>®</sup> 80 e 0,5% (p/v) de CHI previamente solubilizada em 25 mL de CH<sub>3</sub>COOH 1,0% (v/v).

As micropartículas foram lavadas com solução tampão acetato pH 4,5 com filtração a vácuo. O processo de lavagem foi repetido três vezes.

Devido à dificuldade de remoção do óleo de silicone da superfície das micropartículas mesmo após a lavagem, optou-se por submetê-las a um rápido banho de éter etílico para remoção do silicone após a liofilização. Desta forma, foi possível a observação das micropartículas em microscópio eletrônico de varredura.

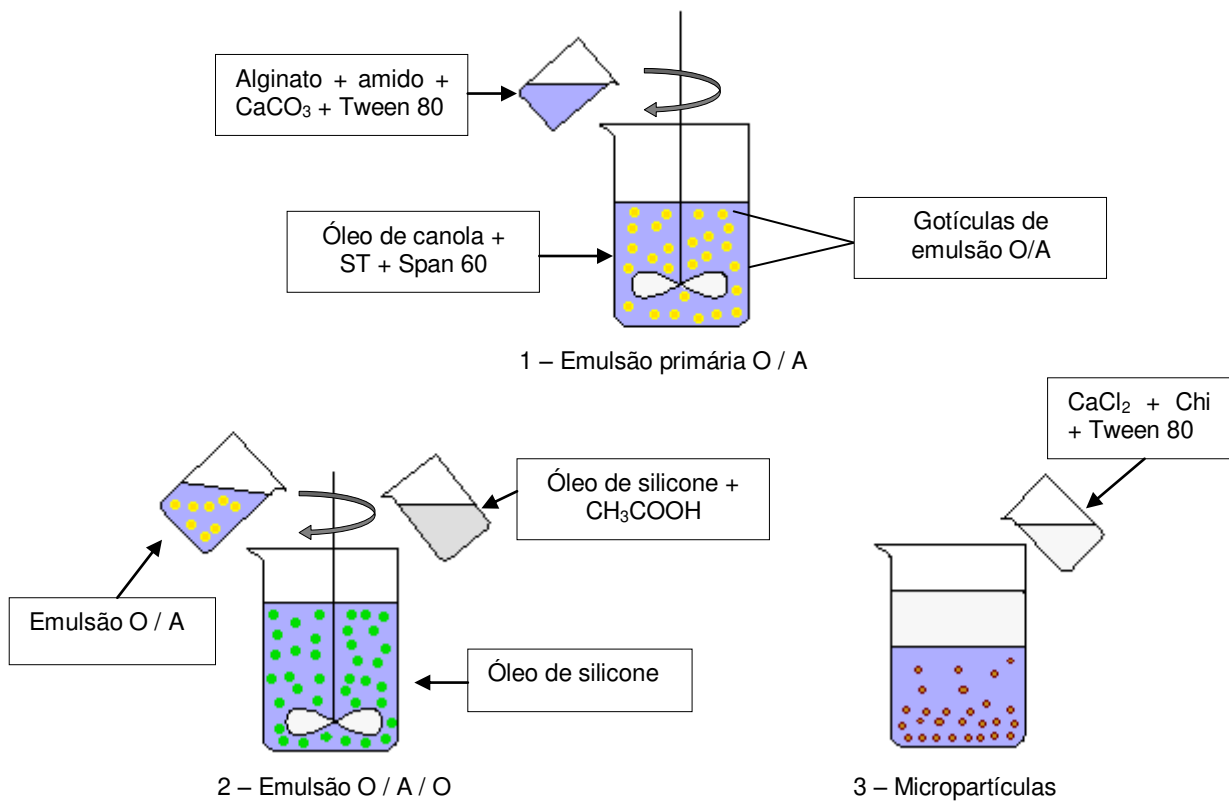


FIGURA 13 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA

## 3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

### 3.6.1 Morfologia

A morfologia das micropartículas foi observada ao microscópio óptico, com imagens capturadas com câmera digital e posteriormente, ao MEV (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

### 3.6.2 Rendimento de produção

O rendimento de produção foi determinado somando-se o total de matéria-prima sólida utilizada no processo, comparado com o peso seco das micropartículas obtidas. O resultado foi expresso em porcentagem.

### 3.6.3 Determinação do teor de umidade

A umidade residual foi determinada por gravimetria como perda por dessecação, tendo por base a Farmacopéia Brasileira V, com adaptações (BRASIL, 2010).

As micropartículas úmidas foram pesadas em placa de Petri, previamente tarada. Após pesagem, as micropartículas foram secas em coluna de ar a 50°C. As micropartículas foram colocadas novamente em placa de Petri, previamente tarada e posteriormente pesadas. O processo foi repetido até peso constante da amostra.

O teor de umidade foi expresso em porcentagem, utilizando-se a equação:

$$U\% = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

### 3.6.4 Granulometria

Foi realizada a granulometria das micropartículas úmidas e secas, para a verificação da porcentagem de encolhimento das mesmas. Os ensaios foram realizados em triplicata, tendo como base o método descrito na Farmacopéia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Para a referida análise foi montado um conjunto de tamises sequencialmente colocados do maior ao menor tamanho de malha com 1,70 mm / 10 mesh; 1,40 mm / 12 mesh; 1,00 mm / 16 mesh; 710  $\mu\text{m}$  / 24 mesh.

As micropartículas úmidas foram pesadas e colocadas cuidadosamente sobre o primeiro tamis. Foram realizados movimentos vibratórios verticais e horizontais com o conjunto de tamises, por 10 minutos. As micropartículas retidas em cada tamis foram pesadas. Após processo de secagem, repetiu-se o processo.

### 3.6.5 Determinação do conteúdo de óleo encapsulado

A determinação foi feita a partir da extração do óleo encapsulado utilizando-se o método de Bligh e Dyer modificado (BRUM; ARRUDA; REGITANO-d'ARCE, 2009).

As micropartículas secas foram colocadas em 80 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,4 e deixadas em repouso por 12 horas. Após este período, 100mL de  $\text{CHCl}_3$  e 200 mL de MeOH foram adicionadas, formando em conjunto com o tampão fosfato, um sistema de solventes tampão fosfato:clorofórmio:metanol, na proporção de 0,8:1:2 (v/v). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 12 horas. O sistema foi passado por tamis 60 mesh para retenção dos resíduos de micropartículas e o filtrado transferido para funil de separação. Foram acrescentados ao filtrado, 100 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 100 mL de água, de tal forma que o sistema final de solventes atingisse a proporção de 1,8:2:2 (v/v). O sistema foi agitado e deixado em repouso até completa separação de fases. A fase  $\text{CHCl}_3$  / óleo foi separada e filtrada em funil contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . O filtrado foi coletado em béquer previamente tarado e seco a temperatura ambiente até evaporação do solvente e peso constante do óleo.

A relação da quantidade de óleo encapsulado e a quantidade inicial de óleo determina a eficiência de encapsulação (EE) do método, sendo expressa em porcentagem (%) conforme equação:

$$EE (\%) = \frac{\text{quantidade de óleo encapsulado}}{\text{quantidade inicial de óleo}} \times 100$$

### 3.6.6 Quantificação de estigmasterol encapsulado nas micropartículas

A quantificação do ST contido no óleo de canola pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), recorrendo-se à saponificação da amostra, conforme Indyk (1990) e Abidi (2001), por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), através da reação de Libermann-Burchard com a parte insaponificável extraída do óleo recuperado das micropartículas (KIM; GOLDBERG, 1969; JAIN; BARI, 2010), ou por espectrofotometria na região do UV-VIS através da reação de Libermann-Burchard diretamente com óleo sem a etapa de saponificação (SABIR; HAYAT; GARDEZI, 2003; SABIR *et al.*, 2005).

#### 3.6.6.1 Saponificação do óleo de canola com estigmasterol encapsulado

Para doseamento do ST, pode-se recorrer à saponificação do óleo, uma vez que os fitoesteróis totalizam a maior parte dos componentes da matéria insaponificável extraída pela saponificação do mesmo (ABIDI, 2001; CARERI, 2001).

Para definir o método de saponificação mais adequado para o presente trabalho, foram avaliados cinco métodos, com variações no processo de saponificação. Os métodos encontram-se no Quadro 5.

Método	Reagentes	Condições de trabalho	Referência
01	2g Óleo de canola 2 mL KOH 10M 18 mL EtOH PA	75°C, 30 minutos	Verleyen <i>et al.</i> , 2002
02	2g Óleo de canola 40 mL KOH 10M 60 mL EtOH PA	22h de agitação a frio e protegido da luz	Bandeira <i>et al.</i> , 2008
03	2g Óleo de canola 6g KOH pastilhas 40 mL EtOH PA	22h de agitação a frio e protegido da luz	Bandeira <i>et al.</i> , 2008
04	2g Óleo de canola 20 mL KOH 2,5M em EtOH 95%	75°C, 1h	Dias, 2009
05	2g Óleo de canola 20 mL KOH 2,5M em EtOH 95%	22h de agitação a frio	Dias, 2009

QUADRO 5 – MÉTODOS DE SAPONIFICAÇÃO DO ÓLEO DE CANOLA

Após a saponificação, adicionou-se 20 mL de água e extraiu-se a matéria insaponificável em 4 etapas de 25 mL de hexano cada, com posterior neutralização do pH da amostra. O extrato hexânico, contendo a matéria insaponificável foi filtrado em funil contendo sulfato de sódio anidro e seco à temperatura ambiente.

Para verificação da presença de esteróis na matéria insaponificável do óleo de canola, foram utilizadas as reações de Salkowski e Lieberman-Burchard e cromatografia em camada delgada (CCD). Na reação de Salkowski, gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado foram acrescentadas sobre a amostra solubilizada em CHCl<sub>3</sub>. O desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada sobre a camada de clorofórmio é indicativo da presença de esteróis na amostra (JAIN; BARI, 2010).

Na reação de Lieberman-Burchard, a amostra foi solubilizada em CHCl<sub>3</sub> e sobre ela, adicionadas gotas do reativo de Lieberman-Burchard, composto por 80mL de Ac<sub>2</sub>O e 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A coloração azul ou verde é indicativa da presença de núcleo esteroidal enquanto coloração vermelha, rósea, púrpura ou violeta indicam presença de núcleo terpênico (VIRTUOSO, 2005; ALVES, 2007; DAKSHA *et al.*, 2010).

A cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatofolha de alumínio recoberta com sílica gel 60 (Merck), sobre a qual foram aplicadas soluções padrão de ST e da amostra. Após corrida em sistema eluente éter etílico:hexano e revelação com vanilina fosfórica, observou-se os pontos coincidentes entre as duas soluções (STAHL, 1969).

### 3.6.6.2 Curva analítica para o estigmasterol

Foram construídas duas curvas analíticas, sendo uma para quantificação direta do ST no óleo sem saponificação e outra para quantificação de ST na matéria insaponificável extraída na saponificação do óleo. Para a primeira curva, foram utilizados 1,0 g de óleo de canola sem ST extraído das micropartículas diluído 1:50 (p/v) em  $\text{CHCl}_3$ . Para a segunda, foi utilizada a matéria insaponificável de 2,0 g de óleo de canola sem ST extraído das micropartículas com diluição 1:100 (p/v) em  $\text{CHCl}_3$ .

O intervalo empregado para determinação das linearidades foi de 80 a 120% do valor teórico das amostras, ou seja 7,5 mg a 12,5 mg de ST por grama de óleo, sendo a solução padrão de ST preparada na concentração de 0,5 mg/mL solubilizado em  $\text{CHCl}_3$ .

A solução padrão de ST 0,5 mg/mL foi pipetada em 5 tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de óleo de canola, denominados P1, P2, P3, P4 e P5, de maneira a obter concentrações de 7,5; 8,75; 10; 11,25 e 12,5 mg/g. Foram também separados 2 tubos de ensaio contendo 2 mL de óleo de canola em  $\text{CHCl}_3$  para o branco e o negativo. O mesmo procedimento foi realizado para a solução de material insaponificável. Devido à quantidade reduzida de esteróis na matéria insaponificável, o intervalo de quantificação foi reduzido para 5,0; 6,25; 7,5; 8,75 e 10 mg/g de ST por grama de óleo de canola. O restante da metodologia foi mantido.

Em seguida, adicionou-se 2 mL do reativo de Liebermann-Burchard em todos os tubos exceto no branco e o volume dos tubos completado para 9 mL com  $\text{CHCl}_3$ . As amostras permaneceram a temperatura ambiente, protegidos da luz, por 15 minutos. Após este período, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro, a 640 nm. O procedimento foi realizado em triplicata.

### 3.6.6.3 Quantificação de estigmasterol por espectrofotometria UV-VIS

Para o doseamento de ST, utilizou-se 2 mL de solução de óleo extraído das micropartículas diluído 1:50 (p/v), adicionou-se 2 mL do reativo de Libermann-Burchard e 5 mL de  $\text{CHCl}_3$  e as amostras foram guardadas protegidas da luz, à temperatura ambiente, por 15 minutos. A presença de esteróis produz coloração verde característica, cuja absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 640nm (KIM; GOLDBERG, 1969; SABIR, HAYAT, GARDEZI, 2003; JAIN; BARI; SURANA, 2009; DAKSHA *et al.*, 2010).

O mesmo procedimento foi realizado para a solução de material insaponificável do óleo extraído das micropartículas diluído 1:100 (p/v).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SOLUBILIZAÇÃO DO ESTIGMASTEROL

O ST foi solubilizado na concentração de 10 mg/g em óleo de canola, formando uma solução límpida e sem precipitados.

### 4.2 PURIFICAÇÃO DA QUITOSANA

A purificação da quitosana é um processo fundamental para obtenção de amostras uniformes, livres de contaminantes insolúveis e complementamente solúveis, resultando em um polímero com características adequadas para os objetivos pretendidos (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998).

A remoção das impurezas permite a obtenção de um polímero que interfere minimamente nos sistemas biológicos, sendo apropriado para utilização como biomaterial (ABBAS, 2010).

Os métodos de purificação podem ser feitos com quitosana na forma de cloridrato ou neutralizada. Em sua forma neutralizada, a purificação é um processo que demanda menos tempo, material e equipamentos e que resulta em melhor rendimento de produção (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998).

O procedimento resultou em rendimento de 78% de material recuperado, o qual se apresentou como escamas finas, cristalinas, marrom-claro, totalmente solúvel em soluções ácidas como de ácido acético e ácido clorídrico.



### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

#### 4.3.1 Grau de desacetilação

O grau médio de desacetilação da quitosana pode ser definido como a quantidade de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica (SANTOS *et al.*, 2003).

O grau de desacetilação necessário para obter um produto solúvel deve ser superior a 80%, condição em que a maior quantidade de grupos amino estão disponíveis para interação com o alginato (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A determinação do grau de desacetilação por titulometria condutométrica é obtida pelo balanço estequiométrico entre os grupos amino protonados da quitosana e uma solução de NaOH. Inicialmente, a amostra é solubilizada na presença de excesso de ácido clorídrico, que irá protonar os grupos amino do polímero. Numa primeira etapa de adição de NaOH, ocorre a neutralização do excesso de ácido do meio com a base, seguida da neutralização dos grupos amino protonados da quitosana e finalizando com excesso de base no meio após o ponto de equivalência entre ácido e base. As etapas foram avaliadas pela medida da condutividade do meio (SANTOS *et al.*, 2003; RINAUDO, 2006).

Os volumes obtidos em cada etapa formam três retas, originando por extrapolação, dois pontos de inflexão, que correspondem ao volume de base necessário para neutralizar os grupos amino protonados (Gráfico 1). O grau médio de desacetilação (GD) é dado pela equação:

$$\%GD = \frac{[\text{base}](V_2 - V_1).161 \times 100}{M}$$

Onde,

GD = grau médio de desacetilação

$V_1$  = volume de base usado para neutralização do excesso de HCl expresso em mL;

$V_2$  = volume de NaOH usado para neutralização dos grupos amino do polímero expresso em mL;

[base] = concentração de NaOH;

M = massa de quitosana em mg

O valor 161 corresponde à massa equivalente a um monômero de quitosana (SANTOS; CIRILO; NUNES, 2011).

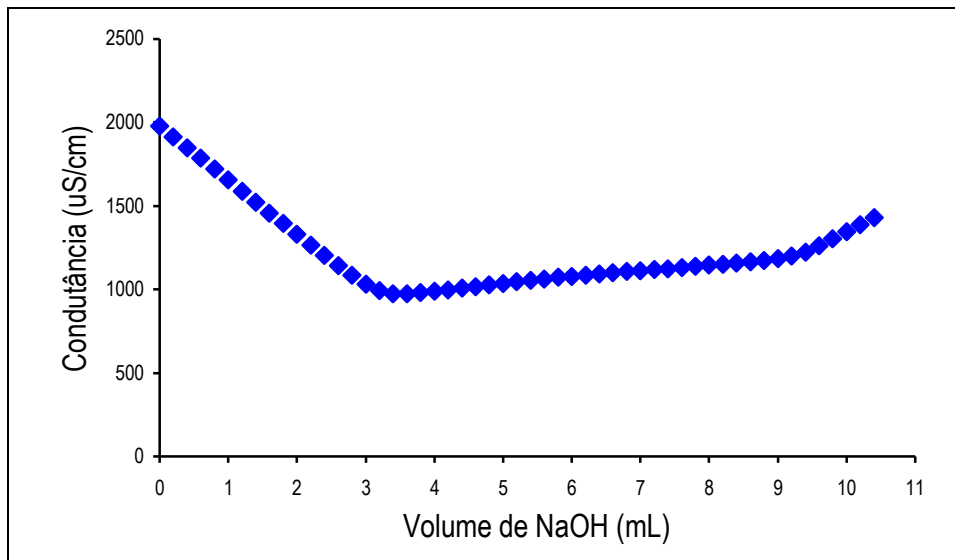


GRÁFICO 1 – CURVA DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA DA QUITOSANA

Nestas condições o grau médio de desacetilação da amostra foi de 84,54%.

#### 4.3.2 Viscosidade intrínseca

Para a determinação da massa molar viscosimétrica é imprescindível a determinação da viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , que pode ser determinada a partir do gráfico da viscosidade reduzida ( $\eta_{sp} / C$ ) *versus* concentração (C) de cada uma das soluções diluídas de quitosana.

Para tanto, a solubilização de um polímero em um solvente é um aspecto muito importante do processo de viscosimetria. Ela depende da sua concentração, massa molecular e conformação da cadeia e, quanto mais apropriadas às condições para a solubilização, melhor a interação soluto-solvente e, conseqüentemente otimizando os resultados obtidos.

Canella e Garcia (2001) trabalharam com dois sistemas de solventes, os quais apresentaram resultados diferentes durante a determinação da viscosidade e, por conseqüência, diferenças no valor da massa molar viscosimétrica. O sistema de solvente 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  / 0.2 M NaCl apresentou indícios de má solubilização, com formação de agregados, resultando em valores aumentados de massa molar viscosimétrica.

Para evitar tais artefatos, optou-se por trabalhar com o sistema de solvente 0,3 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  / 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 4,5 proposto por Rinaudo (2006), uma vez que em seu trabalho não foram verificadas evidências de agregação.

A reta no Gráfico 2 expressa a relação de viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) *versus* a (C) da solução de quitosana. O valor de  $[\eta]$  corresponde ao coeficiente linear da reta obtida no gráfico.

O coeficiente de correlação  $R^2$  entre os pontos experimentais foi de 0,9951 sendo a equação da reta expressa por  $y = 31,606x + 274,51$ . Considerando-se a extrapolação da concentração da solução igual a zero ( $C \rightarrow 0$ ) na reta do gráfico, definimos a viscosidade intrínseca da quitosana  $[\eta]$  em 274,51 mL/g.

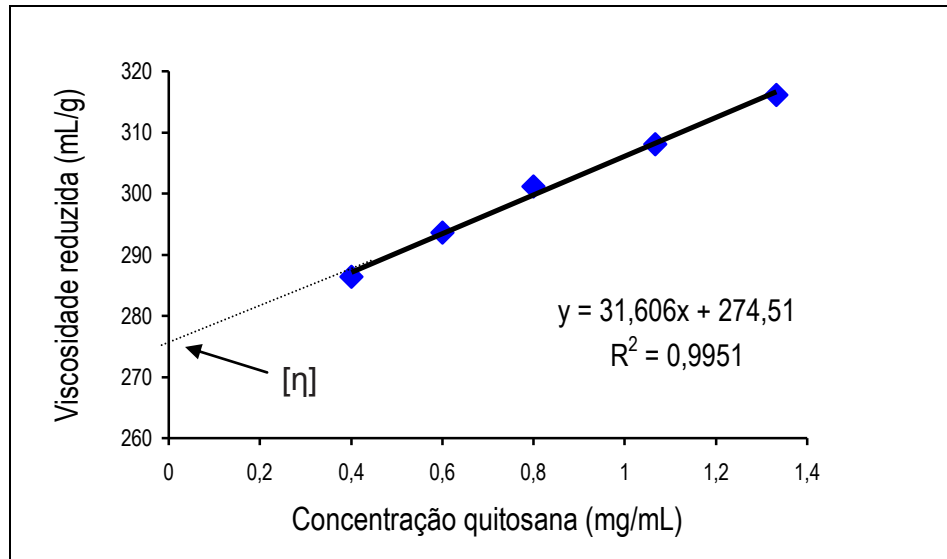


GRÁFICO 2 – VISCOSIDADE REDUZIDA *VERSUS* CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA DILUÍDA EM SOLUÇÃO 0,3 M CH<sub>3</sub>COOH / 0,2 M CH<sub>3</sub>COONa, 25°C ± 0,1°C

Desta maneira, utilizando-se a equação de Mark-Houwink e conhecidos os valores de viscosidade intrínseca e das constantes viscosimétricas  $K_H$  e  $\alpha$ , podemos determinar a massa molar viscosimétrica da quitosana.

$$[\eta] = K_H \cdot M_v^\alpha$$

Onde,  $K_H$  é a constante de Huggins característica do polímero que depende da temperatura, sistema de solvente usado e do grau de acetilação,  $\alpha$  é a constante característica da geometria da molécula do polímero e  $M_v$  ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) é a massa molar viscosimétrica. Os valores das constantes viscosimétricas são fornecidos pela literatura (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

Utilizando os valores das constantes  $K_H$  (0,075),  $\alpha$  (0,76) e da viscosidade intrínseca (274,51) estabelecemos que a massa molar viscosimétrica ( $M_v$ ) da amostra de quitosana é de 48.829 g/mol (48,829 kDa), valor este adequado para a utilização deste polímero no processo de obtenção de micropartículas revestidas pelo método de uma etapa.

## 4.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO-CÁLCIO-AMIDO-QUITOSANA

### 4.4.1 Gelificação iônica externa

A seleção da técnica de gelificação iônica externa para a microencapsulação do ST, teve como base o processo mais brando e biocompatível, sem uso de solventes orgânicos, que os biopolímeros oferecem. A técnica também não utiliza temperaturas elevadas.

Dentre os dois métodos mais comuns de gelificação iônica externa para a obtenção de micropartículas de alginato-amido-quitosana, o processo em uma etapa foi escolhido porque forma micropartículas menos permeáveis, pelo modo como a quitosana e o alginato se ligam. Neste processo, ocorre a formação de uma membrana coacervada complexa entre as soluções de alginato, um poliânion com alta densidade de carga e a quitosana, um polication também com alta densidade de carga, quando a solução de alginato contendo amido, estigmasterol solubilizado em óleo de canola e emulsificante / solubilizante poloxâmico 407 é gotejada diretamente em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  contendo CHI. O núcleo é gelificado ao mesmo tempo em que a membrana complexa poliânion-polication é formada. A técnica empregada seguiu os parâmetros experimentais pré-definidos de gotejamento, com auxílio de seringa de vidro em ângulo de  $90^\circ$  relativo à superfície da solução gelificante e respeitando-se a distância de 6 - 7cm entre a ponta da agulha e a solução de  $\text{CaCl}_2$  / CHI (FUNDUEANU *et al.*, 1999; CULPI *et al.*, 2010). Estes fatores influenciam a forma e tamanho das micropartículas e a eficiência de encapsulamento, sendo necessária a manutenção destes padrões durante todo o processo de obtenção das micropartículas (FUNDUEANU *et al.*, 1999; SMRDEL; BOGATAJ; MRHAR, 2008; CHAN, 2011).

Os géis podem ser feitos tanto com uma concentração de alginato constante ou com gradiente de concentração através da secção transversal da gota gelificada, chamado de gota homogênea e não homogênea, respectivamente (GASEROD; SMISDROD; SKJAK-BRAEK, 1998). Os hidrogéis de maneira geral não são homogêneos devido à existência de agrupamentos ionicamente associados que

originam regiões não homogêneas (RIBEIRO *et al.*, 2005). O grau de homogeneidade pode facilmente ser controlado ajustando a concentração e o índice de cátions gelificantes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e não gelificantes ( $\text{Na}^+$ ) na solução do gel (GASEROD; SMISDROD; SKJAK-BRAEK, 1998; FUJIWARA *et al.*, 2010). A presença de íons  $\text{Na}^+$ , que não formam ligação cruzada, originam gotas gelificadas mais homogêneas (SIMPSON *et al.*, 2004).

4.4.1.1 Justificativa da escolha do tipo de alginato de sódio, quitosana, amido, óleo de canola e poloxâmero 407

4.4.1.1.1 Alginato de sódio

A escolha do tipo de alginato de sódio para obtenção das micropartículas teve como base as características desejadas para o produto final cuja principal finalidade foi a proteção do ST de processos oxidativos, seguido de capacidade de encapsulamento e características do produto final.

*Composição e concentração do alginato:* A viscosidade do gel tipicamente varia com a proporção do conteúdo de resíduos de ácido gulurônico. Durante a gelificação do alginato, os cátions divalentes ligam-se preferencialmente aos blocos homopoliméricos de resíduos de ácido gulurônico, denominados blocos-G, de maneira altamente cooperativa, sendo o tamanho da unidade cooperativa maior do que 20 monômeros. Um conteúdo alto de ácido gulurônico e blocos homopoliméricos permitem uma interação maior entre o alginato e o cálcio (REIS *et al.*, 2006).

Assim, a resultante rede gel formada é uma função da frequência e comprimento dos resíduos guluronatos contínuos, tanto quanto da concentração e tipo do cátion utilizado. Nos alginatos que possuem um conteúdo alto de ácido gulurônico a interação iônica entre os blocos-G e os íons cálcio conduz a formação de um gel termoestável mais rígido, resistente e poroso, que mantém sua integridade por longos períodos de tempo e, cujas propriedades largamente dependem das características do polímero e do método de preparação (FUNDUEANU *et al.*, 1999). Durante a ligação cruzada catiônica eles não sofrem excessivo inchamento e subsequente encolhimento, mantendo sua forma

(SIMPSON *et al.*, 2004). Estas características são apropriadas para o desenvolvimento de micropartículas de acordo com os objetivos deste trabalho.

Relativo à concentração utilizada, observou-se que em concentrações menores que 1,0% as micropartículas são pouco resistentes e disformes, provavelmente em razão da falta de grupos carboxílicos suficientes para a gelificação. Quando a concentração de alginato de sódio foi maior, aumentando a viscosidade da fase aquosa, as gotas resultantes foram maiores e com ampla distribuição. Assim, para uma dada aplicação, a concentração do alginato deve ser controlada em termos de tamanho de micropartícula, forma e distribuição (REIS *et al.*, 2006; CULPI *et al.*, 2010).

Das formulações testadas a concentração de alginato adequada foi de 1,0% para as condições operacionais utilizadas neste trabalho. Esta concentração forneceu viscosidade adequada para o gotejamento através do bisel da agulha utilizada, forma esférica, observada ao microscópio óptico e relativa resistência, isto é, a micropartícula apresentou-se apta para posterior operação de lavagem, determinação de granulometria, processo de secagem e capacidade de encapsulamento.

*Porosidade do alginato:* Uma alta porosidade é alcançada pela seleção do alginato com um índice alto de resíduos de ácido gulurônico em relação aos de ácido manurônico, pela concentração da solução polimérica, por inclusão de íons cálcio gelificantes na solução de quitosana e/ou obtendo gotas homogêneas (GASEROD; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1998; FLORCZYC *et al.*, 2011).

Estudos de difusão de proteínas de vários tamanhos em gel de alginato de cálcio mostraram que alginatos com alto G formam gel com coeficiente de difusão maior que alginatos com alto M, indicando uma rede gel mais aberta e porosa (GASEROD; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1998). Como a capacidade de carga é controlada pela porosidade das micropartículas de alginato, quanto mais poroso o gel maior a capacidade de carga, justificando-se a escolha deste tipo de alginato. O fator negativo, porém, consiste que as micropartículas de alginato porosas também permitem fácil difusão do material encapsulado, principalmente de moléculas de baixo peso molecular, comparando-se com micropartículas não porosas (TU *et al.*, 2005), o que torna necessário efetuar um revestimento posterior da micropartícula.

#### 4.4.1.1.2 Poloxâmero 407

A estabilização do sistema disperso alginato-óleo pode ser realizada mecanicamente, utilizando alta rotação durante a dispersão da solução polimérica no óleo, pelo aumento da concentração de alginato, ou pela utilização de surfactantes. Em trabalhos prévios (CHAN, 2011) este parâmetro foi avaliado, sendo considerados estáveis os sistemas que não apresentaram separação de fases por um período de até 60 minutos, tempo necessário para o término do processo de microencapsulação.

A avaliação da estabilidade do sistema em função da velocidade de agitação, sem utilização de surfactantes foi considerada satisfatória com rotação a 10.000 rpm, porém, nesta condição, ocorre a demasiada aeração da dispersão, levando a necessidade de deaeração da amostra para continuação do processo. Durante este período de repouso, ocorreu a separação de fases do sistema.

O aumento da concentração de alginato para estabilização do sistema não apresentou bons resultados, uma vez que levou ao aumento da viscosidade do sistema disperso alginato / óleo. A elevada viscosidade resultou em aumento do tamanho das micropartículas, maior variação de tamanho e surgimento de micropartículas com caudas, resultado da dificuldade de gotejamento da dispersão pelo sistema extrusor (SMRDEL; BOGATAJ; MRHAR, 2008).

A utilização de surfactantes mostrou-se interessante para a estabilização do sistema. O tipo e a concentração usados foram escolhidos tendo como base as funções esperadas. Uma delas é baixar a tensão na interfase do sistema e assim, facilitar a dispersão do óleo na solução polimérica hidrofílica.

Como produto dispersante / solubilizante / estabilizante não iônico foram testados o Tween<sup>®</sup> 80 e o poloxâmero 407. A escolha do poloxâmero 407 fundamentou-se no seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 18 e 23, o que lhe confere propriedade emulsificante de óleo na água, dispersando adequadamente as fases oleosa e aquosa do sistema, evitando nucleações e má distribuição do óleo (ZANIN *et al.*, 2002; CULPI *et al.*, 2010). A constituição do poloxâmero favoreceu a hidroflicidade e permitiu obter um sistema óleo / solução polimérica hidrofílica situada externamente ao sistema disperso.



Este produto mostrou-se efetivo na manutenção da estabilidade e redução da viscosidade do sistema disperso. Estas características facilitaram o processo de gotejamento, forma e tamanho da micropartícula obtida e eficiência de encapsulamento. A observação ao microscópio óptico das micropartículas recém preparadas permitiu avaliar de maneira preliminar as características de forma, onde se observou micropartículas arredondadas sem agregação, distorções, caudas ou prolongamentos. O tamanho obtido apresentou as variações típicas do processo de gotejamento manual e a eficiência de encapsulamento, que pôde ser observada pelo acréscimo de corante lipofílico ao óleo, permitiu visualizar as diferenças de carga entre as micropartículas (CULPI *et al.*, 2010).

A concentração utilizada de 0,3% foi suficiente para a ação pretendida de acordo com a literatura (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) e pela observação dos resultados obtidos neste trabalho utilizando esta concentração. O Tween<sup>®</sup> 80 com EHL de 15 também poderia ser usado sem nenhuma ressalva embora a viscosidade do sistema com seu uso, observada na facilidade e/ou dificuldade de gotejamento, foi maior.

#### 4.4.1.1.3 Amido

O amido de milho foi acrescentado ao alginato para conferir maior estabilidade à micropartícula no processo de secagem, pois as misturas adequadas de polímeros consistem em métodos efetivos e convenientes de melhorar o desempenho dos materiais poliméricos. Estudos anteriores demonstraram que ocorrem interações intermoleculares e boa compatibilidade molecular entre amido e alginato (WANG *et al.*, 2010). A proporção utilizada alginato / amido foi de 1:0,3 (p/p), pois proporções maiores poderiam acarretar em prejuízo na ligação posterior do alginato com a quitosana por competição nas interações interpoliméricas conduzindo a uma complexação falha ou incompleta de alginato-quitosana.

#### 4.4.1.1.4 Óleo de canola

O estigmasterol apresenta-se muito pouco solúvel em água, fracamente solúvel em óleos comestíveis e solúvel em solventes orgânicos (BUDAVARI, 2001).

A introdução do estigmasterol nas micropartículas de alginato-cálcio-amido-quitosana poderia ser feita dispersando o pó cristalino na solução aquosa de alginato, solubilizando o estigmasterol em solvente orgânico ou em outro veículo.

A utilização do estigmasterol solubilizado em solventes orgânicos não é interessante devido a finalidade pretendida, pois necessitaria a garantia da completa eliminação do solvente para aplicação em formulações de uso interno.

A dispersão do estigmasterol na forma de pó cristalino na solução polimérica de alginato expõe a substância ao meio aquoso, oxigênio e luz durante o processo de produção das micropartículas, aumentando a possibilidade de oxidação.

A solubilização do estigmasterol em óleo mostra-se promissora para sua proteção contra oxidação, pois conforme Lampi e colaboradores (2002), nesta forma a substância tem sua oxidação reduzida quando comparada em sua forma cristalizada.

O óleo de canola (Canadian Oil Low Acid) é resultado de um melhoramento genético da colza, uma das oleaginosas mais produzidas mundialmente. Tal modificação genética permitiu a redução do teor de ácido erúxico, glucosinolatos, associados à toxicidade da colza, e de gorduras saturadas. Contém alto teor de lipídios monoinsaturados e quantidade mediana de poliinsaturados, apresentando um ótimo equilíbrio entre os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 (ÁGUILA *et al.*, 2002).

Os lipídios monoinsaturados e poliinsaturados mostram-se efetivos na redução dos níveis séricos de colesterol, atuam na prevenção de depressão e distúrbios de comportamento, proteção das doenças cardiovasculares, redução do risco de artrite reumatóide e redução da pressão arterial sistêmica (ÁGUILA; APFEL; MANDARIM-DE-LACERDA, 1997; ÁGUILA *et al.*, 2002).

O óleo de canola apresenta de 0,7 a 1,0% de fitoesteróis em sua composição, sendo estes encontrados na matéria insaponificável do óleo. Apesar de grande parte de matéria insaponificável ser composta por esteróis, o óleo de canola não possui, ou possui traços de estigmasterol em sua composição.

Portanto, devido às propriedades nutricionais decorrentes da presença de ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e quantidades significativas de esteróis, o óleo de canola mostra-se apropriado para utilização como veículo solubilizante do estigmasterol no processo de microencapsulação. O óleo de canola apresenta ainda a vantagem de possuir valores insignificantes de estigmasterol, minimizando sua interferência durante a caracterização das micropartículas.

#### 4.4.1.2 Gelificação e Revestimento simultâneo da micropartícula

O alginato gelifica na presença de cátions divalentes. A gelificação está na dependência da ligação iônica ( $Mg^{+2} < Ca^{+2} < Zn^{+2} < Sr^{+2} < Ba^{+2}$ ) e no controle da adição do cátion, que é importante para a produção de géis homogêneos. Embora íons zinco possam ser usados na produção de micropartículas de alginato, o cálcio é o principal cátion usado porque ele é considerado clinicamente seguro, facilmente acessível e de baixo custo (REIS *et al.*, 2006). A concentração utilizada neste trabalho foi de 2,0%, o dobro da concentração usada de alginato de sódio fornecendo micropartículas resistentes (CULPI *et al.*, 2010).

O material de revestimento escolhido para controlar a liberação do encapsulado foi a quitosana por ser um polieletrólito linear catiônico e assim apresentar compatibilidade e capacidade de ligação com o poliânion alginato na formação do polieletrólito complexo, reforçando as micropartículas de alginato (RIBEIRO *et al.*, 2005). O sucesso do revestimento é atribuído em grande parte às interações coulombianas entre os polímeros. A composição da quitosana consiste de quantidades variáveis de resíduos ligados de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) N-acetil-2 amino-2-deoxi-D-glucose (resíduos A) e 2-amino-2-deoxi-D-glucose (resíduos D). A quantidade de unidades D e conseqüentemente de grupos amina livres ao longo da cadeia de quitosana é alta o suficiente para permitir que o polímero se dissolva em meio aquoso ácido devido à protonação destes grupos. Assim existem importantes variáveis experimentais que devem ser levadas em conta quando se trabalha com soluções de quitosana como a natureza do contraíon, grau de acetilação, massa molar, pH e força iônica (ARANAZ, 2009). Neste trabalho a quitosana utilizada apresenta massa molar viscosimétrica de 48.829 Da e grau de desacetilação de 84,54%.

A massa molecular da quitosana afeta tanto o índice como a extensão de ligação nas micropartículas de alginato. As quitosanas de massa molecular menor (20.000 Da) são uniformemente distribuídas por toda cápsula, ocorrendo uma significativa diminuição da interação entre os polímeros com o aumento de grupos acetila. As quitosanas de massa molecular maior estão principalmente acumuladas na superfície, pois são grandes demais para entrar pelos poros do gel. Neste caso, a quantidade de grupos acetila interfere minimamente nas interações alginato-quitosana.

A quitosana se liga mais rápido e em maior extensão em concentrações mais elevadas de cloreto de cálcio presente na solução de quitosana, pois a reação de gelificação do alginato compete com a reação de precipitação do polication, conduzindo a formação de um gel mais poroso e aberto, que permite maior difusão e assim mais ligações das moléculas de quitosana na rede gel (GASEROD; SMIDSRD; SKJAK-BRAEK, 1998). Assim, um conteúdo alto de ligações alginato-quitosana ocorre quanto mais poroso for o gel de alginato e menor a massa molecular média da quitosana utilizada (GASEROD; SANNES; SKJAK-BRAEK, 1999).

Neste trabalho as micropartículas foram produzidas pelo processo de uma etapa, no qual ocorre ligação da quitosana com o alginato preferencialmente na superfície. A característica desta membrana são os poros pequenos que não permitem difusão posterior do polication internamente à micropartícula, restringindo tanto as ligações como a difusão na matriz, sendo assim menos permeáveis do que as micropartículas obtidas pelo processo de dois estágios (GASEROD; SMIDSRD; SKJAK-BRAEK, 1998; GASEROD; SANNES; SKJAK-BRAEK, 1999). Assim, foi escolhido um tipo de quitosana de massa molecular maior do que 20.000 Da para não haver difusão no interior da rede gel e favorecer a interação superficial com o alginato. Como as micropartículas obtidas foram não homogêneas, ocorreu um reforço na formação do complexo polieletrólito superficial, permitindo maior número de ligações superficiais com a quitosana, aumentando assim, a resistência da membrana (RIBEIRO *et al.*, 1999; CALIJA *et al.*, 2011).

As micropartículas de alginato de cálcio sem revestimento são desestabilizadas por quelantes como fosfato, lactato e citrato ou na presença de cátions não gelificantes como íons sódio ou magnésio. Estes íons permutam com os íons cálcio não cooperativamente ligados, conduzindo a um inchamento do gel. Em

tais meios, como o corpo humano, por exemplo, há necessidade de um agente estabilizante como uma membrana policatiônica ligada ao gel de alginato. Uma vez que as micropartículas são formadas, a exposição a soluções com concentrações maiores de íons competitivos como hidrogênio ou sódio tem menor influência na estabilidade do complexo poliânion-policátion (GASEROD; SANNES; SKJAK-BRAEK, 1999).

De acordo com estudos prévios, o tempo de reação entre alginato e quitosana pode variar desde 10 minutos até 24 horas (FUNDUEANU *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2005; COOK *et al.*, 2011). Estas diferenças de tempo são explicadas pelo tipo de quitosana utilizada durante o processo. Polímeros com massa molecular menor penetram lentamente na matriz, necessitando um período de incubação de no mínimo 18 horas para formação de uma membrana significativamente mais espessa. Neste trabalho optou-se por trabalhar com um período de reação de uma hora, pois o polímero escolhido possui massa molecular média maior que 40.000 Da, favorecendo as ligações iônicas na superfície das micropartículas.

#### 4.4.1.3 Influência do pH na ligação alginato-quitosana

A quitosana pura precipita em valores de pH maiores do que 6 – 6,5 enquanto o alginato precipita em valores de pH menores do que 3,6. A formação dos complexos entre alginato e quitosana em valores de pH abaixo de 3,6 ou acima de 6,5 levanta uma questão interessante. Os valores de pK implicam que não devem existir grupos  $\text{-COO}^-$  no alginato abaixo de pH 3,6 e grupos  $\text{-NH}_3^+$  na quitosana acima de pH 6,5. Se isto for o caso, contudo, a formação do complexo não deveria ocorrer, mas ela ocorre. O complexo realmente se forma tão rápido que, imediatamente após a mistura da solução de quitosana e alginato ocorre precipitação ou formação de gel (SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003). Assim, o pH tem uma forte influência no grau de ionização dos grupos funcionais dos polieletrólitos para a formação da membrana complexa pois o número de ligações iônicas alginato-quitosana está diretamente relacionado ao rendimento e permeabilidade destas membranas (GASEROD; SMIDSRD; SKJAK-BRAEK, 1998).

Um pH entre 5 e 5,3 promove uma complexação mais completa dos polímeros pois as moléculas tanto do alginato quanto da quitosana apresentam uma conformação estendida (SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2003; FLORCZYK *et al.*, 2011). Neste pH as cadeias de alginato mantêm a maior parte de seus grupos carboxílicos ionizados disponíveis. Assim, o pH entre 5 - 5,3 foi mantido para a complexação dos polímeros neste trabalho.

Convém citar que em trabalho de Fundueanu e colaboradores (1999) em que micropartículas de alginato foram colocadas em uma solução ácida com pH 3 ocorreu substituição parcial dos íons cálcio com os prótons. Neste pH, o conteúdo de cálcio diminuiu o grau de substituição em 20%. A presença residual de íons  $\text{Ca}^{+2}$  na micropartícula foi atribuída aos íons  $\text{Ca}^{+2}$  localizados junto à estrutura em “caixa de ovo”, pois de fato 20% representam a frequência de blocos ácidos gulurônicos. Em outras palavras, após tratamento em pH baixo, os íons cálcio permanecem somente dentro das cavidades eletronegativas dos blocos-G que fornecem um complexo mais estável. Tratando as micropartículas com uma solução em pH mais baixo (pH 2 e 1), o cálcio foi totalmente deslocado da rede polimérica, não contribuindo mais para a estabilização das micropartículas que mantiveram, contudo, sua estrutura macroscópica com propriedades mecânicas semelhantes às daquelas das micropartículas ionicamente ligadas.

Este comportamento foi explicado considerando a formação de ligações de hidrogênio que fornecem uma estrutura estável. Aumentando novamente o pH para 3,25 e 3,75 e tratando as micropartículas com quantidades progressivas de solução 0,1N de NaOH, conduziu a um sucessivo aumento da porosidade da micropartícula. Finalmente, se um excesso de NaOH é acrescentado às micropartículas ocorre sua completa dissociação e solubilização. Em desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada a instabilidade das micropartículas de alginato em pH maior do que 5 torna-se um fator limitante. Já o complexo alginato-quitosana sofre erosão vagarosamente em tampão fosfato com pH acima de 6,8 e esta propriedade conduz à supressão da liberação inicial do produto encapsulado que ocorre em micropartículas não revestidas. Este fato deve-se a que a membrana de quitosana permanece como uma estrutura, ao menos parcialmente durante a liberação (RIBEIRO *et al.*, 2005).

#### 4.4.1.4 Processo de secagem das micropartículas

Dois processos de secagem foram testados, a liofilização e coluna de ar. Pelo primeiro processo as micropartículas apresentaram deformação das paredes (Figura 14 e 15) quando não se utilizou amido na formulação, ocasionando modificações morfológicas enquanto pelo segundo processo, as micropartículas mantiveram seu formato esférico (Figura 16).



FIGURA 14 - MICROPARTÍCULAS SEM AMIDO LIOFILIZADAS, AO MO (AUMENTO 40X)  
FONTE: O autor (2011)

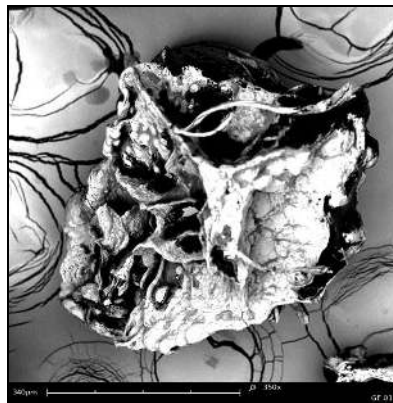


FIGURA 15 - MICROPARTÍCULAS SEM AMIDO LIOFILIZADAS, AO MEV (AUMENTO 350X)  
FONTE: CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA UFPR (2011)

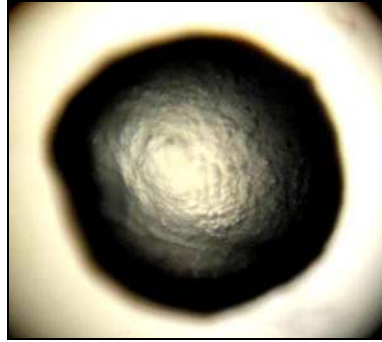


FIGURA 16 - MICROPARTÍCULA SEM AMIDO SECA EM COLUNA DE AR, AO MO (AUMENTO 40X)  
FONTE: O autor (2011)

Chan e colaboradores (2011) afirmam que pela liofilização, as micropartículas tendem a apresentar tamanhos diferentes, fragilidade em sua estrutura mecânica e alta porosidade, fatores que influenciam a estabilidade da substância encapsulada.

A utilização do amido como material de preenchimento pode então melhorar estas características, mantendo a esfericidade e diminuindo o grau de encolhimento das micropartículas (CHAN *et al.*, 2011).

Ao testar uma formulação com amido e liofilização verificou-se que as micropartículas apresentavam formato esférico, com menos rugosidades evidenciando a forte influência da liofilização na estrutura das micropartículas (Figura 17).



FIGURA 17 - MICROPARTÍCULA COM AMIDO LIOFILIZADA, AO MO (AUMENTO 40X)  
FONTE: O autor (2011)

Após incorporação de amido e secagem das micropartículas em coluna de ar, estas apresentaram leve redução de tamanho, porém, mantiveram o formato esférico e superfície menos rugosa (Figura 18).



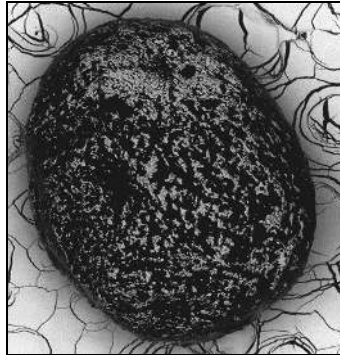


FIGURA 18 - MICROPARTÍCULAS COM AMIDO SECAS EM COLUNA DE AR, AO MEV (AUMENTO 150X)  
 FONTE: CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA UFPR (2011)

#### 4.4.1.5 Rendimento de produção

O rendimento médio de produção das micropartículas foi de 94,87%. Este valor reflete a quantidade de micropartículas produzidas em relação ao material utilizado, como apresenta a Tabela 3.

TABELA 3 – RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POR GELIFICAÇÃO EXTERNA

	<b>Massa de matéria-prima utilizada</b>	<b>Massa de micropartículas secas obtida</b>	<b>Rendimento de produção (%)</b>
AMOSTRA 1	16,95g	15,34g	90,50%
AMOSTRA 2	16,95g	16,49g	97,29%
AMOSTRA 3	16,95g	16,41g	96,81%
		<b>Rendimento médio</b>	<b>94,87%</b>

#### 4.4.1.6 Morfologia, teor de umidade e granulometria

As micropartículas produzidas apresentaram formato esférico, levemente ovalada, com teor médio de umidade de 60,59% (Figura 19).



FIGURA 19 – MICROPARTÍCULAS ÚMIDAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA  
FONTE: O autor (2011)

Na análise granulométrica das micropartículas úmidas, 98,40% ficaram retidas no tamis 10 mesh; 0,94% no tamis 12 mesh; 0,57% no tamis 16 mesh e 0,09% no tamis 24 mesh. Após secagem, estas micropartículas reduziram seu tamanho sendo 14,41% retidas no tamis 10 mesh; 71% no tamis 12 mesh; 12,65% no tamis 16 mesh e 2,21% no tamis 24 mesh.

#### 4.4.2 Gelificação iônica interna

O método de gelificação iônica interna é baseado na liberação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  de um sal de cálcio pouco solúvel em água, porém, solúvel em meio ácido, durante emulsificação em solução de alginato de sódio (PONCELET *et al.*, 1999; CHAN; LEE; HENG, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Os principais parâmetros avaliados nesta técnica incluíram as concentrações de alginato e tensoativos para a formação e estabilização da emulsão primária óleo / água e a determinação da quantidade de cálcio necessário para o processo de gelificação.

A formação e estabilização da emulsão primária O / A é etapa fundamental para a obtenção de micropartículas de tamanho reduzido e com boa eficiência de

encapsulamento. Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de alginato com iguais condições de preparo, ou seja, concentrações de carbonato de cálcio, óleo de canola e tensoativos iguais nas formulações.

Verificou-se que as formulações com maiores concentrações de alginato (2,0% e 3,0%) apresentaram homogeneidade nas gotículas da emulsão O / A e mantiveram o carbonato de cálcio em suspensão, de maneira uniforme, devido a viscosidade do meio. As soluções com concentrações de 0,5 e 1,0% de alginato permitiam a livre deposição de carbonato de cálcio no fundo do béquer.

Esta etapa é fundamental, pois quando posteriormente se acidifica o meio, tornando o carbonato de cálcio solúvel, a liberação de cálcio ocorrerá de maneira uniforme para interação com o alginato, o que implica que as micropartículas obtidas por este método de microencapsulação também apresentarão homogeneidade.

De acordo com Chan, Lee e Heng (2002), a quantidade de cálcio liberado pela acidificação do meio, não deve ser excessiva, pois durante este processo, o dióxido de carbono liberado pode aumentar a porosidade da matriz, deixando a micropartícula mais frágil. Diferentes concentrações de carbonato de cálcio foram avaliadas, partindo-se da quantidade sugerida por Ribeiro e colaboradores (1999), de 5,0%, até redução a 0,375%. Os resultados obtidos mostraram que uma alta concentração de carbonato de cálcio não apresenta vantagens para o sistema, pois percebeu-se que ao final do método, uma parte do total de carbonato adicionado não solubiliza, mantendo-se precipitado junto às micropartículas formadas (Figura 20).

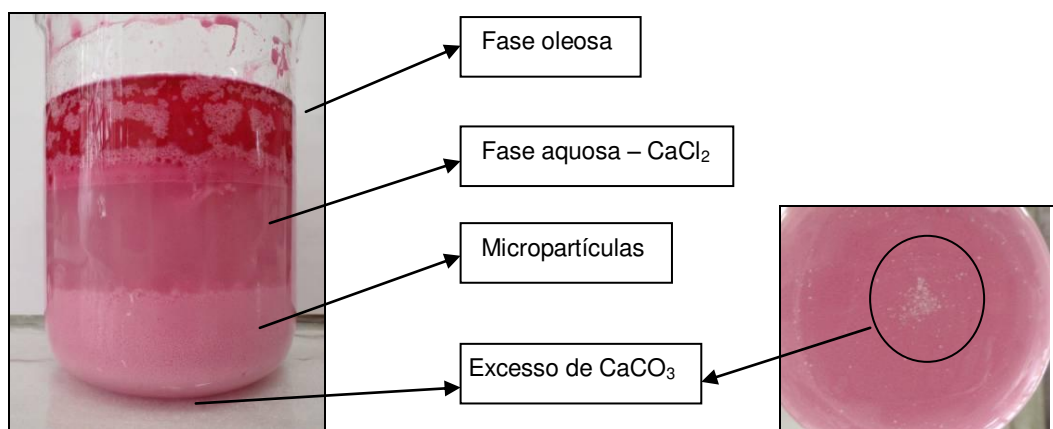


FIGURA 20 - MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS COM SOLUÇÃO DE ALGINATO 3,0% +  $\text{CaCO}_3$  3,75%

FONTE: O autor (2011)

Uma alternativa para solubilizar todo carbonato foi adicionar quantidade maior de ácido na emulsão. Porém, observou-se que as micropartículas de alginato são formadas em pH entre 7 e 8 e que em pH 6, ocorre a redução de cerca de 50% de formação das micropartículas.

A incorporação de amido na formulação melhorou a homogeneidade da emulsão formada, resultando na redução do tamanho das gotículas de óleo envoltas pelo sistema polimérico alginato / amido.

As micromicropartículas obtidas por gelificação interna apresentaram-se esféricas e menores que as formadas por gelificação externa. Após secagem, mantiveram o formato esférico, mesmo sem adição de amido (Figura 21).

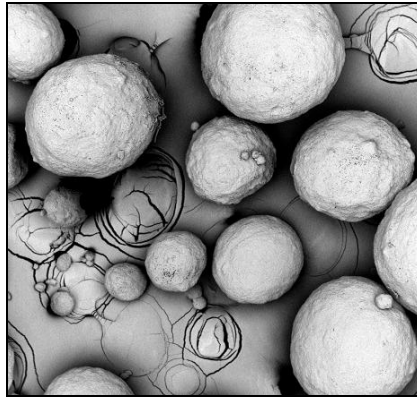


FIGURA 21 - MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO INTERNA, AO MEV (180X)  
FONTE: CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA UFPR (2011)

Poncelet (1992) e Ribeiro e colaboradores (1999) reportam que após adição de  $\text{CaCl}_2$  com Tween<sup>®</sup> 80 ocorre separação das fases, ficando as micropartículas na fase aquosa.

No entanto, apesar desta separação realmente ocorrer, uma parte do óleo de silicone fica aderido à superfície das micropartículas exigindo um procedimento de lavagem eficiente, que não retire junto o material encapsulado.

Durante os testes com as formulações, diferentes procedimentos de lavagem foram realizados, sendo o com tampão acetato pH 4,5 o mais eficiente. Porém, ao realizar a extração do óleo encapsulado, percebeu-se que o óleo de silicone não havia sido totalmente removido, uma vez que era solubilizado junto com o encapsulado.

Devido as dificuldades apresentadas por este método, optou-se por descontinuar a caracterização das micropartículas obtidas por gelificação interna e dar continuidade aos trabalhos com as obtidas por gelificação externa.

#### 4.4.3 Determinação do conteúdo de óleo encapsulado

A extração de lipídios de material de origem vegetal ou animal pode ser realizado por diferentes métodos, como os propostos por Soxhlet, Folch e colaboradores e Bligh e Dyer. Pelo método de Soxhlet, o material é mantido em refluxo com solvente por muitas horas, o que favorece a oxidação e hidrólise da amostra, devendo assim, ser evitado. Folch e colaboradores propuseram uma mistura de MeOH-CHCl<sub>3</sub> para que tanto os lipídios polares, quanto os neutros pudessem ser extraídos, sem que ocorresse a perda do óleo devido aos processos de degradação. Baseados nos trabalhos de Folch *et al.*, Bligh e Dyer apresentaram um método simplificado, também utilizando a mistura de solventes (BRUM; ARRUDA; REGITANO-d'ARCE, 2009).

Dentre os métodos testados por Brum, Arruda e Regitano-d'Arce (2009), o método de Bligh e Dyer mostrou-se o mais adequado tanto para matéria-prima vegetal quanto animal.

No caso de micropartículas, diversos trabalhos citam a utilização de solventes orgânicos, como hexano, CHCl<sub>3</sub> e tetracloreto de carbono para a extração do óleo (CHAN; LIM; HENG, 2000; PENICHE *et al.*, 2004; TAN; CHAN; HENG, 2009). Outro método empregado consiste no rompimento das micropartículas pela utilização de solução de tampão fosfato de sódio pH 7,4, ou tampão citrato de sódio 0,055M para remoção dos íons Ca<sup>+2</sup> das micropartículas, ocasionando a desestabilização da rede tridimensional e liberação do óleo para o meio, tornando-o disponível para solubilização em solvente orgânico e quantificação após evaporação do solvente (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foram testadas as extrações direta com solvente (CHCl<sub>3</sub> e hexano) e com o método de Bligh e Dyer, com a mistura de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH:água na proporção de 1:2:0,8 (v/v).

Na extração direta com solventes foi possível observar a ausência das gotículas de óleo no interior das micropartículas ao microscópio óptico, porém, ao

final do processo, observava-se que os resíduos das micropartículas encontravam-se oleosos, sugerindo a presença de óleo na matriz. Pelo método de rompimento das micropartículas em tampão fosfato pH 7,4 o mesmo resultado foi obtido.

Portanto, optou-se por trabalhar com o método de Bligh e Dyer. As micropartículas foram deixadas em contato com a mistura de solventes por 12 horas, com agitação periódica. Após este período, foi possível verificar que o método não conseguia extrair todo óleo das micropartículas, sendo necessário, portanto, uma adaptação do mesmo.

Para melhorar o método de extração, optou-se pela utilização de tampão fosfato pH 7,4 num primeiro momento em substituição à água. Após a desestabilização da membrana, foram adicionados à mistura,  $\text{CHCl}_3$  e MeOH, mantendo a proporção sugerida por Bligh e Dyer (1:2:0,8). Ao final do processo de extração, não foi verificada presença de óleo nos resíduos de micropartículas.

Pelo método de gelificação iônica externa, a eficiência de encapsulação (EE) foi de 90,42%, conforme demonstrado na Tabela 4.

TABELA 4 – EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

	<b>Quantidade de óleo com 1% de ST na formulação</b>	<b>Quantidade de óleo encapsulado</b>	<b>EE</b>
Amostra 1	20g	17,71g	88,55%
Amostra 2	20g	18,05g	90,25%
Amostra 3	20g	18,49g	92,45%
<b>Eficiência média de encapsulação</b>			90,42%

#### 4.4.4 Quantificação de estigmasterol contido no óleo encapsulado

A quantificação de ST contido no óleo encapsulado teve por objetivo verificar se os processos empregados para obtenção das micropartículas reduziu a quantidade inicial de ST solubilizado no óleo de canola (1,0% de ST em relação ao óleo de canola).

#### 4.4.4.1 Saponificação do óleo encapsulado

A quantificação de fitoesteróis em óleos vegetais pode ser realizada a partir do preparo da amostra saponificada, pois os esteróis compõem grande parte da matéria insaponificável dos óleos (CARERI, 2001).

Em literatura, são encontradas diferentes abordagens quanto aos métodos de extração e saponificação de lipídios de determinadas amostras. Algumas metodologias descrevem a extração de lipídios da amostra como uma primeira etapa, com posterior saponificação, enquanto outras propõem a saponificação direta, sem a prévia separação dos lipídios da amostra.

A metodologia escolhida deve ser conveniente ao tipo de matriz na qual o esterol se encontra. Para óleos refinados, amostras lipídicas ou alimentos, a saponificação direta, seguida de extração da matéria insaponificável com solventes não polares, tem mostrado melhores resultados (VERLEYEN *et al.*, 2002; BORKOVCOVÁ *et al.*, 2009). A extração prévia dos lipídios da amostra com solventes ou Soxhlet, seguida de saponificação, pode aumentar a possibilidade de oxidação dos esteróis (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

A saponificação pode ser realizada a frio ou com aquecimento, no entanto, Mariutti, Nogueira e Bragagnolo (2008) observaram que a saponificação com elevação da temperatura diminuía a concentração dos esteróis da amostra enquanto Bandeira (2008) verificou que a saponificação direta a frio apresentou um cromatograma com menor número de interferentes e maior área do pico de esterol, sendo o processo realizado em menos etapas e com menor quantidade de solvente.

Neste trabalho, cinco processos de saponificação direta foram testados, sendo a avaliação dos métodos realizada pela pesquisa da presença de esteróis nas amostras pelas reações de Salkowski e Liebermann-Burchard, pesquisa de estigmasterol por comparação com solução padrão por cromatografia em camada delgada e quantificação dos esteróis por espectrofotometria na região do UV-VIS.

A avaliação qualitativa dos métodos de saponificação demonstrou presença de esteróis em todas as amostras, pelo desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada na reação de Salkowski (Figura 22) e coloração verde na reação de Liebermann-Burchard (Figura 23).

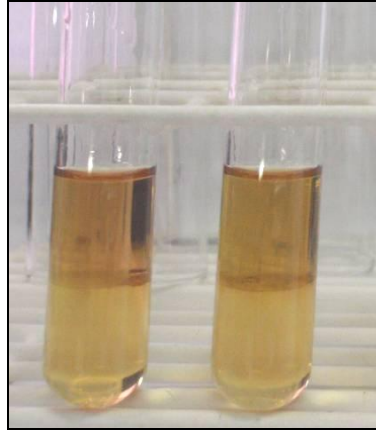


FIGURA 22 – REAÇÃO SALKOWSKI POSITIVA  
FONTE: O autor (2011)

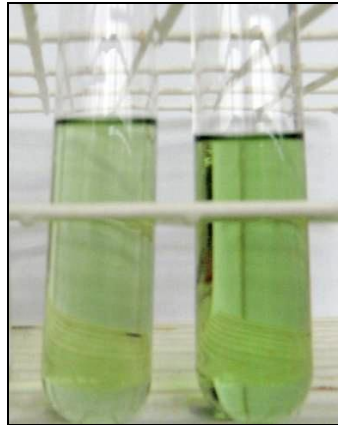


FIGURA 23 – REAÇÃO DE LIEBERMANN-BURCHARD POSITIVA  
FONTE: O autor (2011)

A dupla ligação em um dos anéis do núcleo esteroidal é responsável pela formação de produtos coloridos quando em presença de ácidos inorgânicos concentrados. Assim, as reações são positivas para todos os esteróis com esta característica.

O princípio destas reações está baseado na desidratação da molécula de esterol pelo ácido sulfúrico, com posterior formação de produtos mono ou dissulfonados. A reação de Salkowski produz coloração castanho-avermelhada na porção clorofórmica pela presença do composto dissulfônico.

Na reação de Lieberman-Burchard, o derivado desidratado pelo ácido sulfúrico reage com o anidrido acético, que também é um agente desidratante, produzindo um ácido monossulfônico, de cor verde. A intensidade da coloração desenvolvida é proporcional à concentração de esteróis na amostra (VIRTUOSO, 2005; XIONG; WILSON; RANG, 2007; ATINAFU; BEDEMO, 2011).



A presença de ST por comparação com solução padrão em placa de cromatografia em camada delgada foi considerada positiva, como pode ser observada na Figura 24.

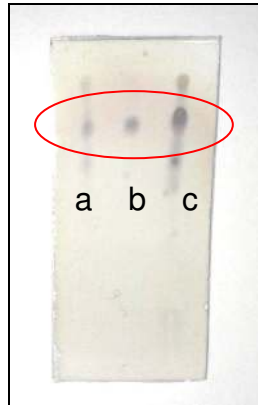


FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ST POR CCD APÓS SAPONIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE ÓLEO - (a) método de saponificação 2; (b) padrão de ST; (c) método de saponificação 4  
FONTE: O autor (2011)

A quantificação de esteróis pelo método de Liebermann-Burchard foi realizada comparativamente entre as amostras, sem determinação exata da concentração dos mesmos. A amostra 2, saponificada a frio, com KOH 10M e etanol PA, apresentou maior absorvância, indicando maior quantidade de esteróis em relação às demais amostras, sendo considerado o método mais adequado para este trabalho.

#### 4.4.4.2 Quantificação de estigmasterol por espectrofotometria UV-VIS

##### 4.4.4.2.1 Quantificação de estigmasterol diretamente no óleo recuperado das micropartículas

A espectrofotometria UV-VIS apresenta como principais vantagens a facilidade de operação, boa sensibilidade e exatidão, seletividade moderada e vasta aplicabilidade (GIL, 2007).

A quantificação da solução padrão de ST nos intervalos determinados para a construção da curva analítica possibilitou a avaliação da linearidade dos métodos.

A curva analítica apresentou coeficiente de regressão de Pearson ( $R^2$ ) de 0,9989 para o doseamento direto no óleo, conforme Gráfico 3 e desvio padrão entre as amostras, menor que 5,0% (Tabela 5).

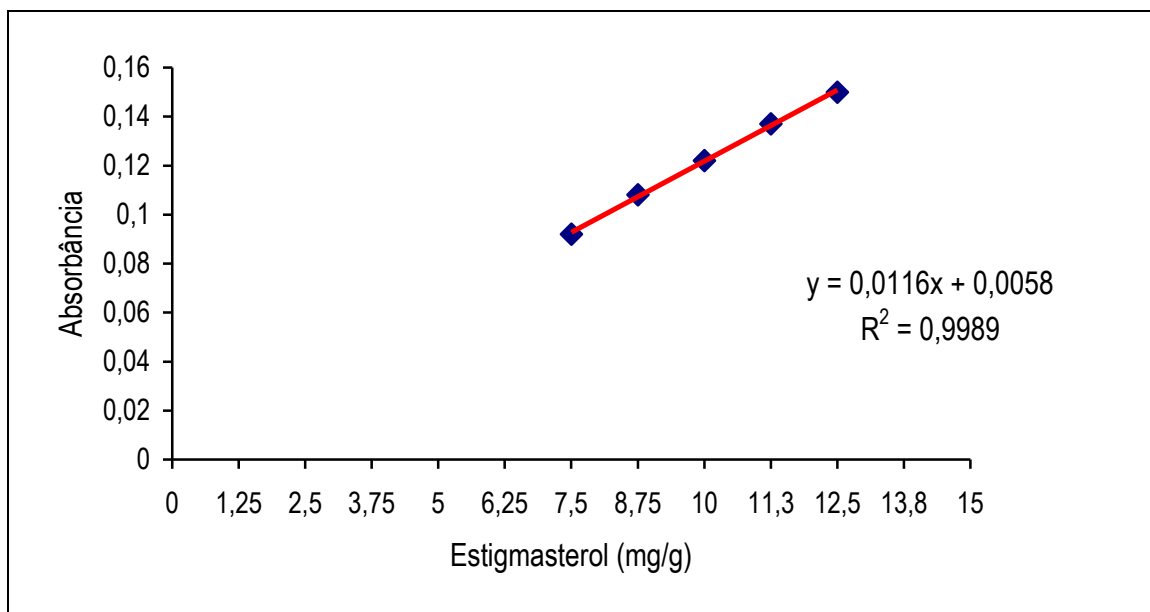


GRÁFICO 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA QUANTIFICAÇÃO DIRETA DE ST EM ÓLEO DE CANOLA

TABELA 5 – DADOS OBTIDOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ST DIRETAMENTE NO ÓLEO DE CANOLA

Concentração (mg/g)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	DPR (%)
7,50	0,09	0,089	0,097	0,092	4,74
8,75	0,107	0,104	0,113	0,108	4,24
10,00	0,122	0,116	0,127	0,122	4,53
11,25	0,138	0,131	0,142	0,137	4,06
12,50	0,149	0,145	0,156	0,150	3,71

Os resultados obtidos para cada concentração de padrão não apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) após serem submetidos à análise de variância, pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo a diferença estatística determinada pelo teste de Tukey.

A quantificação do estigmasterol presente nas amostras foi realizada com três lotes de micropartículas, com leitura em triplicada de cada amostra, sendo o cálculo da quantidade realizada pela extrapolação dos valores de absorbância na equação da reta.

Deste modo, a concentração média de ST por grama de óleo ficou em 9,97mg/g, conforme demonstrado na Tabela 6.

TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO DE ST (mg/g) OBTIDA PELA QUANTIFICAÇÃO DIRETA NO ÓLEO RECUPERADO DAS MICROPARTÍCULAS

Amostra	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	DPR (%)	ST (mg/g)
Lote 1	0,121	0,118	0,123	0,120667	2,08	9,94
Lote 2	0,120	0,118	0,127	0,121667	3,88	10,02
Lote 3	0,119	0,120	0,125	0,121333	2,65	9,94
<b>Concentração média de ST</b>						9,97mg/g

Portanto, pela técnica de gelificação iônica externa foi possível o encapsulamento de 90% do óleo de canola contendo 1% de ST solubilizado, sendo a perda do esteroide correspondente unicamente a quantidade solubilizada no óleo de canola não encapsulado.

#### 4.4.4.2.2 Quantificação de estigmasterol na matéria insaponificável do óleo recuperado das micropartículas

A curva analítica para o estigmasterol obtida pela quantificação na matéria insaponificável do óleo de canola apresentou  $R^2 = 0,996$ , conforme Gráfico 4 e desvio padrão entre as amostras, menor que 5,0% (Tabela 7).

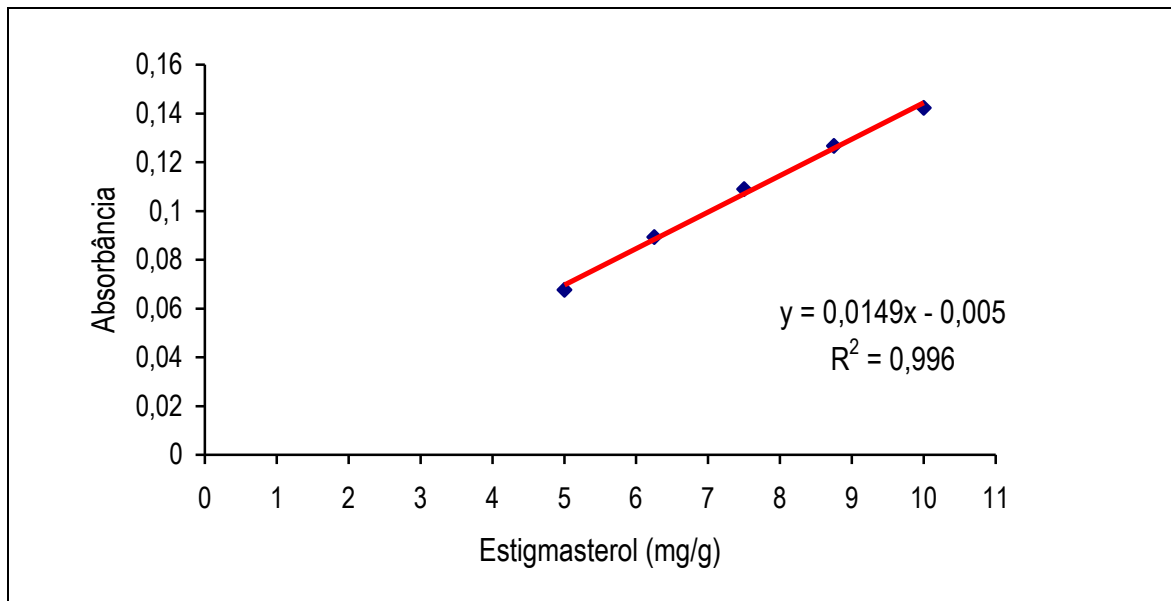


GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA OBTIDA PELA QUANTIFICAÇÃO DE ST NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO DE CANOLA

TABELA 7 – DADOS OBTIDOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ST NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO DE CANOLA

Concentração (mg/g)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Média	DPR (%)
5,00	0,067	0,071	0,065	0,0676	4,51
6,25	0,093	0,090	0,085	0,0893	4,52
7,50	0,113	0,110	0,104	0,109	4,20
8,75	0,132	0,125	0,123	0,1266	3,73
10,00	0,145	0,139	0,143	0,1423	2,14

Por este método, foi possível a avaliação da perda de ST / esteróis pelo processo de saponificação, utilizando para tal, uma amostra saponificada de óleo de canola contendo 1,0% de ST solubilizado.

Verificou-se que durante o processo de saponificação ocorreu uma perda de aproximadamente 28% do ST inicialmente solubilizado na amostra, pois houve a

recuperação de apenas 7,2 mg/g contra os 10 mg/g de ST inicialmente solubilizado em óleo de canola.

A quantificação de ST nas amostras de óleo extraída das micropartículas e posteriormente saponificado confirmou o resultado, pois houve um decréscimo de 21% na quantidade de ST na amostra saponificada em comparação com a amostra não saponificada (Tabela 8).

TABELA 8 – QUANTIFICAÇÃO DE ST (mg/g) ENCAPSULADO PELOS MÉTODOS DIRETO NO ÓLEO E NA MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL DO ÓLEO RECUPERADO DAS MICROPARTÍCULAS

	<b>Valor teórico</b>	<b>Valor encontrado</b>
<b>Amostra saponificada</b>	10 mg/g	7,90 mg/g
<b>Amostra não saponificada</b>	10 mg/g	9,97 mg/g

A Tabela 9 apresenta os valores de ST encontrados para os dois métodos de quantificação de estigmasterol.

TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE ST MICROENCAPSULADO

	<b>Quantificação de ST diretamente no óleo</b>	<b>Quantificação de ST na matéria insaponificável</b>
Concentração teórica de ST em óleo de canola	10 mg/g	10 mg/g
Concentração de ST por grama de óleo de canola recuperado	9,97 mg/g	7,90 mg/g
Concentração de ST por grama de partículas	8,40 mg/g	6,66 mg/g

## 5 CONCLUSÃO

O estigmasterol foi encapsulado pelos métodos de gelificação iônica externa e interna, utilizando-se como material encapsulante, alginato de sódio, amido de milho e quitosana.

A gelificação iônica externa mostrou-se um método viável, de fácil execução, com rendimento médio de produção de micropartículas contendo ST encapsulado de 94,87% e eficiência média de encapsulação de 90,42%. As micropartículas obtidas por esta técnica apresentaram-se esféricas, uniformes e de superfície pouco rugosa, com tamanho médio de 1,4µm.

A técnica de gelificação iônica interna demanda melhor estudo para separação do óleo de silicone que fica aderido na superfície das micropartículas, o que dificulta a caracterização e utilização das mesmas. Neste sentido, será dada continuidade aos trabalhos, uma vez que o processo possui as vantagens de ser um método brando, com bom rendimento de produção e que não depende de um sistema extrusor.

O processo de titulação condutométrica para caracterização da quitosana quanto ao grau de desacetilação mostrou-se adequado para o propósito, sendo também uma técnica de fácil execução e que dispensa o uso de equipamentos mais sofisticados, como espectrômetro de ressonância magnética e de infra-vermelho.

O método de viscosimetria para determinação da massa molecular viscosimétrica média da quitosana foi adequado pela simplicidade de execução e apresentação de resultados satisfatórios para este trabalho.

A metodologia empregada para a quantificação de ST nas amostras, a espectrofotometria na região do UV-VIS, mostrou-se um processo reprodutível, robusto, de relativo baixo custo e fácil operação.

A técnica de saponificação deve ser melhorada para evitar a perda de esteróis durante o processo, tornando a amostra viável para a quantificação por outros métodos.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

A utilização de três biopolímeros com características de biodegradabilidade e mucoadesão e um tensoativo que pode ser usado por via oral, mostra-se promissor para utilização nos sistemas de liberação alvo-específico, como a mucosa intestinal, apontando para a continuidade das pesquisas neste sentido.

O trabalho será continuado com a avaliação da estabilidade, perfil de liberação e mucoadesividade das micropartículas, para sua utilização nos sistemas de liberação fármacos.

Devido às vantagens apresentadas pela técnica de gelificação iônica interna, haverá continuidade dos trabalhos para aprimoramento da mesma.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, O. M. **Chitosan for biomedical applications**. 329f. Tese (Doutorado em Farmácia), University of Iowa, 2010.
- ABIDI, D.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 8, p. 173 – 201, 2001.
- ACARTÜRK, F; TAKKA, S. Calcium alginate microparticles for oral administration: II effect of formulations factors on drug release and drug entrapment efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 3, p. 291 – 301, 1999.
- ADCOX, C.; BOYD, L.; OEHL, L.; ALLEN, J.; FENNER, G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.2090-2095, 2001.
- ÁGUILA, M. B.; APFEL, M. I. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e com óleo de canola. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, n.3, p.155-161, 1997.
- ÁGUILA, M. B.; LOUREIRO, C. C.; PINHEIRO, A. da R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Metabolismo lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.78, n. 1, p. 25-31, 2002.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.1155–1160, 2010.
- ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- ANDREO FILHO, N.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, Brasília, v. 9, n. 1/5, p. 18-21, 1999.



ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current chemical Biology**, v.3, p.203-230, 2009.

ATINAFU, D. G.; BEDERMO, B. Estimation of total free fatty acid and cholesterol content in some commercial edible oils in Ethiopia, Bahir DAR. **Journal of Cereals and Oil seeds**, v. 2, n. 6, p. 71-76, 2011

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2127-2130, 2000.

AWAD, A. B.; WILLIAMS, H.; FINK, C. S. Effect of phytosterols on cholesterol metabolism and MAP kinase in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 111-119, 2003.

BACKHOUSE, N.; ROSALES, L.; APABLAZA, C.; GOITY, L.; ERAZO, S.; NEGRETE, R.; THEODOLUZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; DELPORTE, C. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 263-269, 2008.

BANDEIRA, C. M.; FERREIRA, J. M.; BRAGAGNOLO, N.; MARIUTTI, L. R. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, v.31, n.6, p. 1422-1426, 2008.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.2014-2019, 2008.

BERGER, A.; JONES, P. J. H.; ABUMWEIS, S. S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. **Lipids in Health and Disease**, v. 3, p. 5-23, 2004.

BERGSTRÖM, S.; WINTERSTEINER, O. Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution – VI. The influence of esterification and of constitutional factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 145, n. 1, p. 327-333, 1942.

BERKOW, R. **Manual Merck de informações médica**: saúde para a família. Barueri: Manole, 2002.

BJÖRSES, K.; FAXÄLV, L.; MONTAN, C.; WILDT-PERSSON, K.; FYHR, P.; HOLST, J.; LINDAHL, T. L. In vitro and in vivo evaluation of chemically modified degradable starch microspheres for topical haemostasis. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2558–2565, 2011.

BORKOVCOVÁ, I.; JANOUSKOVÁ, E.; DRACKOVÁ, M.; JANSTOVÁ, B.; VORLOVÁ, L. Determination of sterols in dairy products and vegetable fats by HPLC and GC methods. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, special issue I, p. 217-219, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, p. 217-225, 2008.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

BUDAVARI, S. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 13. ed. New Jersey: Merck, 2001.

CABRAL, P. K. A. **Sistemas de liberação Controlada de drogas: uma revisão**. 46f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2004.

CALIJA, B.; CEKIC, N.; SAVIC, S.; KRAJISNIK, D.; DANIELS, R.; MILIC, J. An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen. **Archives of Pharmacal Research**, v.34, n.6, p. 919-929, 2011.

CARERI, M. ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography–UV determination and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of Chromatography A**, v.935, p.249–257, 2001.

CANELLA, K. M. N. de C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n. 1, p.13-17, 2001.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1267-1275, 2011.

CHAN, L. W.; LIM, L. T.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of oils using sodium alginate. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 6, p. 757-766, 2000.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 259-262, 2002.

CHAN, E. S.; WONG, S. L.; LEE, P. P.; LEE, J. S.; TI, T. B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S. H.; YIM, Z. H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225-232, 2011.

CHANG, C. P.; DOBASHI, T. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 32, p. 257-262, 2003.

CHRISTIANSEN, L. I.; RANTANEN, J. T.; VON BONSDORFF, A. K.; KARJALAINEN, M. A.; YLIRUUSI, J. K. A novel method of producing a microcrystalline  $\beta$ -sitosterol suspension in oil. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 261-269, 2002.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 2834-2840, 2011.

CORRÊA, R. M. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe: estudos de sistema-modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e testes in vivo**. 151f. Tese (Doutorado em Alimentação e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

CULPI, T.A.; PASQUALIM, P.; FIN, M.T.; SASSO, D.G.B.; KAMINSKI, G.A.T.; FUJIWARA, G.M.; NUNES, P.M.P.; RODRIGUES, B.H.; DIAS, J.F.G.; ZANIN, S.M.W. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de  $Ca^{2+}$  - alginato. **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, p. 38-44, 2010.

DAKSHA, A.; JAYWANT, P.; BHAGYASHREE, C.; SUBODH, P. Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. **Electronic Journal Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v.9, n.10, p.1593-1597, 2010.

DIAS, R. C. E. **Diterpenos em café: desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto e estudo da estabilidade com o processo de torra**. 157f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

DOHNAL, J.; STEPANEK, F. Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. **Powder Technology**, v. 200, p. 254-259, 2010.

DUKE, J. **Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases**. Disponível em:  
<http://sun.arsgrin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=STIGMASTEROL>  
Acesso em: 26 jul. 2011.

ENGEL, R.; SCHUBERT, H. Schubert Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 233– 237, 2005.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S. Phytosterols: applications and recovery methods. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2335-2350, 2007.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. pacote computacional).

FLORCZYK, S. J.; KIM, D.; WOOD, D. L.; ZHANG, M. Influence of processing parameters on pore structure of 3D porous chitosan–alginate polyelectrolyte complex scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 98A, n.4, p. 614-620, 2011.

FOLEY, D.; O'CALLAGHAN, Y.; O'BRIEN, N. M.; MCCARTHY, F. O.; MAGUIRE, A. R. Synthesis and characterization of stigmasterol oxidation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1165-1173, 2010.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutic**, Amsterdam, v. 218, p. 1-18, 2004.

FUJIWARA, G. M.; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 51-58, 2010.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20. p. 1427-1435, 1999.

GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C.; CHEVY, F.; BRETON, M.; NOURISSAT, G.; WOLF, C.; JACQUES, C.; BERENBAUM, F. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 106-116, 2010.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier - systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24-34, 2007.

GARCÍA-LLATAS, G.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T. Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, p. 607-624, 2011.

GASEROD, O.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Microcapsules of alginate-chitosan. I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, v. 19, p.1815-1825, 1998.

GASEROD, O.; SANNES, A.; SKJAK-BRAEK. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. **Biomaterials**, v. 20, p. 773-783, 1999.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; WOODS, D. F.; CHIOU, B.; ORTS, W. J.; IMAN, S. H. Encapsulation of Plant Oils in Porous Starch Microspheres. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 4180–4184, 2010.

GÓMEZ, M. A.; SAENZ, M. T.; GARCÍA, M. D.; FERNANDEZ, M. A. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 54, p. 937-941, 1999.

GRANDGIRARD, A. Biological effects of phytosterol oxidation products, future research areas and concluding remarks. In: GUARDIOLA, F.; DUTTA, P. C.; CODONY, F.; SAVAGE, G. P. **Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects**. Champaign: AOCS Press, 2002.

HONARY, S.; MALEKI, M.; KARAMI, M. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/ chitosan microparticles containing prednisolone. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.8, n.1, p.53-61, 2009.

IFERE, G. O.; BARR, E.; EQUAN, A.; GORDON, K.; SINGH, U. P.; CHAUDHARY, J.; IGIETSEME, J. U.; ANANABA, G. A. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, v. 32, p. 319-328, 2009.

INDYK, H. E. Simultaneous liquid chromatographic determination of cholesterol, phytosterols and tocopherols in foods. **Analyst**, v. 115, p. 1525-1530, 1990.

IONASHIRO, M. **GIOLITO**: Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. Giz: 2004.

JAIN, P. S.; BARI, S. B. Isolation of lupeol, stigmasterol and campesterol from petroleum ether extract of woody stem of *Wrightia tinctoria*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.3, p.163-167, 2010.

JAIN, P. S.; BARI, S. B.; SURANA, S. J. Isolation of stigmasterol and  $\gamma$ -sitosterol from petroleum ether extract of woody stem of *Abelmoschus manihot*. **Asian Journal of Biological Sciences**, 2009.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.

JOHNSSON, L. **Phytosterol oxidation products: formation, analyses and occurrence**. Tese (Doutorado) – Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004.

JOHNSSON, L.; ANDERSSON, R. E.; DUTTA, P. C. Side-Chain Autoxidation of Stigmasterol and Analysis of a Mixture of Phytosterol Oxidation Products by Chromatographic and Spectroscopic Methods. **JAACS**, v. 80, n. 8, p.777-783, 2003.

KAMETANI, T.; FURUYAMA, H. Synthesis of vitamin D<sub>3</sub> and related compounds. **Medicinal Research Review**, v. 7, n. 2, p. 147-171, 2006.

KAWAGUTI, H. Y.; SAITO, H. H. Produção de isomaltulose, um substitutoda sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KIM, E.; GOLDBERG, M. Serum Cholesterol Assay Using a Stable Liebermann-Burchard Reagent. **Clinical Chemistry**, v.15, n.12, p.1171-1179, 1969.

KOSCHUTNIG, K. **Safety assessment of phytosterol oxidation products**. 198f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais), Universität Wien, Viena, 2009.

KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S. C. Phytosterols – health benefits and potential concerns: a review. **Nutrition Research**, v.25, p. 413-428, 2005.

LAMPI, A. M.; JUNTUNEN, L.; TOIVO, J. PIIRONEN, V. Determination of thermooxidation products of plant sterols. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 93-92, 2002.

LEA, L. J.; HEPBURN, P. A.; WOLFREYS, A. M.; BALDRICK, P. Safety evaluation of **phytosterol** esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with **phytosterol** oxides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 5, p. 771-783, 2004.

LEE, H. Y.; CHAN, L. W.; DOLZHENKO, A. V.; HENG, P. W. S. Influence of ciscosity and uronic acid composition of alginates on the properties of alginate films and

microspheres produced by emulsification. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.8, p. 192-927, 2006.

LIM, J. C.; PARK, J. H.; BUDESINSKY, M.; KASAL, A.; HAN, Y. H.; KOO, B. S.; LEE, S. I.; LEE, D. U. Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 5, p. 561-564, 2005.

LIRA, A. A. M.; ROSSETTI, F. C.; NANCLARES, D. M. A.; FEDERMAN NETO, A.; BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M. Preparation and characterization of chitosan-treated alginate microparticles incorporating all-trans retinoic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 3, p. 243–250, 2009.

LÓPEZ, C. R.; FERNANDEZ, A. M. J. Microencapsulacion. In: VILA JATO, J. L. **Tecnología farmacéutica I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas**. Madrid: Sintesis, 2001. p. 577-608.

LUCINDA-SILVA, R. M.; EVANGELISTA, R. C. Studies on the formation of complex coacervates between chitosan and alginate during microparticles preparation. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 366-370, 2005.

MAGILL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 3, mar./abr. 1991.

MALAFAYA, P. B.; STAPPERS, F.; REIS, R. L. Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers. **Journal of Materials Science**, v. 17, p. 371-377, 2006.

MANLEY, T. R. Thermal analysis of polymers. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p. 1353-1360, 1989.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 193-196, 2010.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Optimization and Validation of Analytical Conditions for Cholesterol and Cholesterol Oxides Extraction in Chicken Meat Using Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2913–2918, 2008



MÁRQUEZ-RUIZ, G.; VELASCO, J.; DOBARGANES, C. Evaluation of oxidation in dried microencapsulated fish oils by a combination of adsorption and size exclusion chromatography. **European Food Research Technology**, v.211, p.13–18, 2000.

MASCARENHAS, M. C. C. N. **Utilização de surfactantes na produção de microencapsulados de óleo rico em ômega 3 por coacervação complexa com aplicação em emulsões**. 167f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MEGURO, S; HIGASHI, K.; HASE, T. HONDA, Y.; OTSUKA, A.; TOKIMITSU, I.; ITAKURA H. Solubilization of phytosterols in diacylglycerol versus triacylglycerol improves the serum cholesterol-lowering effect. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 513-517, 2001.

MENNINI, N.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MURA, P. Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-PVP complex. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 67–75, 2012.

MEYER, W.; JUNGNIKEL, H.; JANDKE, M.; DETTNER, K.; SPITELLER, G. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. **Phytochemistry**, v.47, n. 5, p.789-797, 1998.

MI, F.; SUNG, S.; SHYU, S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydrate Polymers**, v.48, p.61-72, 2002.

MOGHADASIAN, M. H. Pharmacological properties of plant sterols: in vivo and in vitro observations. **Life Science**, v. 67, n. 6, p. 605-615, jun. 2000.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 6. p. 457-500, nov. 2002.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 73-80, jan./mar. 2005.

NAVARRO, A.; DE LAS HERAS, B.; VILLAR, A. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Toquio, v. 24, n. 5, p. 470-473, 2001.

NIU, X.; FENG, Q.; WANG, M.; GUO, X.; ZHENG, Q. Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of synthetic oligopeptide derived from BMP-2. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 4, p. 297-305, 2009.

OLIVEIRA, A. B. **Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OSTLUND JR, R. E.; SPILBURG, C. A.; STENSON, W. F. Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 826-830, 1999.

PANDA, S.; JAFRI, M.; KAR, A.; MEHETA, B. K. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 123-126, 2009.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOU, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v.323, p. 34-42, 2006.

PAULINO, A. T. **Produção de adsorventes não-convencionais e aplicação na remediação de águas e efluentes industriais**. 152f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

PENICHE, C.; HOWLAND, I.; CARRILLO, O.; ZALDÍVAR, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 865-871, 2004.

PETERSON, D. W.; NICHOLS, C. W.; SHNEOUR, E. A. Some relationships among dietary sterols, plasma and liver cholesterol levels, and atherosclerosis in chicks. **The Journal of Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 57-65, mai. 1952.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 123-142, 2002.

PIIRONEN, V.; LIDSAY, D. G.; MIETTINEN, T. A.; TOIVO, J. I.; LAMPI, A. M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 939-966, 2000.

PLAT, J.; BRZEZINKA, H.; LÜTJOHANN, D.; MENSINK, R. P.; VON BERGMANN, K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 2030-2038, 2001.

POLLACK, O. J. Reduction of blood cholesterol in man. **Circulation: Journal of American Heart Association**, v.7, p. 701-706, 1953.

PONCELET, D.; LENCKI, R.; BEAULIEU, C.; HALLE, J. P.; NEUFELD, R. J.; FOURNIER, A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. 1. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 39-45, 1992.

PONCELET, D.; BABAK, V.; DULIEU, C.; PICOT, A. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 155, n. 2/3, p. 171-176, set. 1999.

PONCELET, D. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. **Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science**, parte 1, p. 23-34, 2006. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/kv2k46q687k21467/>

PRÜSSE, U.; BILANCETTI, L.; BUCKO, M.; BUGARSKI, B.; BUKOWSKI, J.; GEMEINER, P.; LEWINSKA, D.; MANOJLOVIC, V.; MASSART, B.; NATRUZZI, C.; NEDOVIC, V.; PONCELET, D.; SIEBENHAAR, S.; TOBLER, L.; TOSI, A.; VIKARTOVSKÁ, A.; VORLOP, K. Comparison of different technologies for alginate beads production. **Chemical Papers**, v.62, n.4, p.364-374, 2008.

QUÍLEZ, J.; GARCÍA-LORDA, P.; SALAS-SALVADÓ, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. **Clinical Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 343-351, 2003.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process

for the design of alginates particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 245-257, 2006.

RIBEIRO, A. J.; NEUFELD, R. J.; ARNAUD, P.; CHAUMEIL, J. C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 115-123, 1999.

RIBEIRO, A. J.; SILVA, C.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 31-40, 2005.

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

RODRIGUES, A. P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LOGATO, P.V.R.; MORAES, A. M. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. **Process Biochemistry**, v.41, p. 638–643, 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. Ed. Londres: Pharmaceutical Press: 2009.

SABIR, S. M.; HAYAT, I.; GARDEZI, S. D. A. Estimation of sterols in edible fats and oils. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.2, n.3, p.178-181, 2003.

SABIR, S. M.; MAQSOOD, H.; HAYAT, I.; KHAN, M. Q.; KHALIQ, A. Elemental and nutritional analysis of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*) berries of pakistani origin. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n.4, p. 518-522, 2005.

SANTOS, A.B. **Encapsulação de oleoresina de páprica por atomização em goma arábica e em aglomerados porosos de amido/gelatina: estabilidade e aplicação**.196f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SANTOS, A.R.S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, v. 61, p. 329–332, 1995.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 16, set./out. 2000.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. de O.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão "Saburica" (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, v.7, n.9, p.1-4, 2011.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, Z. M.; CARONI, A. L. P. F.; PEREIRA, M. R.; SILVA, D. R., FONSECA, J. L. C. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2591-2595, 2009.

SANTOS FILHO, R. D.; MARTINEZ, T. L. R.. Fatores de risco para doença cardiovascular: velhos e novos fatores de risco, velhos problemas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 212-214, jun. 2002.

SÄYNÄJOKI, S.; SUNDBERG, S.; SOUPAS, L.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 80, p. 415-421, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHOLTYSEK, C.; KRUKIEWICZ, A. A.; ALONSO, J. L.; SHARMA, K. P.; SHARMA, P; C.; GOLDMANN, W. H. Characterizing components of the Saw palmetto berry extract (SPBE) on prostate cancer cell growth and traction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, p. 795-798, 2009.

SCHOUBBEN, A.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; RICCI, M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, 2010.

SEGATO, M, P. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalinos-terrosos, amônio, mono-, di-, trietanolamônio.** 112f.

Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. - Características e propriedades de quitosanas purificadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 1, jan./mar. 2003.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SIMSEK-EGE, F. A.; BOND, G. M.; STINGER, J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v.88, p.346-351, 2003.

SIMPSON, N. E.; STABLER, C. L.; SIMPSON, C. P.; SAMBANIS, A.; CONSTANTINIDIS, I. The role of the CaCl<sub>2</sub>-guluronic acid interaction on alginate encapsulated  $\beta$ TC3 cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 2603-2610, 2004.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; MRHAR, A. The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 77-89, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Departamento de aterosclerose. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, abr. 2007.

SOUPAS, L.; HUIKKO, L.; LAMPI, A.M; PIIRONEN, V. Esterification affects phytosterol oxidation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 107-118, 2005.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.201-216, 2006.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação

médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

STAHL, E. **Thin layer chromatography: a laboratory handbook**. 2. ed., Berlin: Springer Verlag, 1969.

STOJKOVSKA, J.; BUGARSKI, B.; OBRADOVIC, B. Evaluation of alginate hydrogels under in vivo-like bioreactor conditions for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, p.2869–2879, 2010.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, n.2, p. 12-20, dez. 2006.

SUNDARARAMAN, P.; DJERASSI, C. A convenient synthesis of progesterone from stigmasterol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 22, p. 3633-3634, out. 1977.

TAN, L. H.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 3, p. 263-271, 2009.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Phytosterols in the prevention of human pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 321-325, 2003.

THU, B.; BRUHEIM, P.; ESPEVIK, T.; SMIDSRØD, O.; SOON-SHIONG, P.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate polycation microcapsules II. Some functional properties. **Biomaterials**, v. 17, p. 1069-1079, 1996.

TOMOYORI, H.; KAWATA, Y.; HIGUCHI, T.; ICHI, I.; SATO, H.; SATO, M.; IKEDA, I.; IMAIZUMI, K. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2738, 2004.

TU, J.; BOLLA, S.; BARR, J.; MIEDEMA, J.; LI, X.; JASTI, B. Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: preparation, drug loading and release characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p.171–181, 2005.

VERGÈS, B. Les phytostérols: quels bénéfiques? Quels risques? **Médecine des Maladies Métaboliques**, v. 3, n. 6, p. 589-592, dez. 2009.

VERLEYEN, T.; FORCADES, M.; VERHE, R.; DEWTTINCK, K.; HUYGHEBART, A.; GREYT, W. Analyses of free and esterified sterols in vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.79, n.2, 2002.

VIRTUOSO, S. **Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. – Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae)**. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v. 42, p. 87-96, 2007.

WANG, Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 842-847, 2010.

WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 113-118, 2006.

WOYENGO, T. A.; RAMPRASATH, V. R.; JONES, P. J. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, n.7, p. 813-820, 2009.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v.3, n.1, p. 13-18, 2002.

ZAWISTOWSKI, J. **Method of preparing microparticles of phytosterols or phytostanols**. EPI 148793B1, 13 ago. 2003.