



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Audenes de Oliveira Melo

**Avaliação da atividade gastroprotetora da fucana
livre e nanoencapsulada em lipossomas**

**Vitória de Santo Antão
2013**

Audenes de Oliveira Melo

**Avaliação da atividade gastroprotetora da fucana
livre e nanoencapsulada em lipossomas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra Noemia Pereira da Silva Santos

Coorientador: Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

M528a Melo, Audenes de Oliveira
Avaliação da atividade gastroprotetora da fucana livre e nanoencapsulada em lipossomas/ Audenes de Oliveira Melo. Vitória de Santo Antão: O autor, 2013.

Xix, 51 folhas: Il.; tab.

Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.

Co-orientador: Mariane Cajubá de Britto Lira.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.

1. Fucana. 2. *Sargassum cymosum*. 3. Úlcera gástrica. 4. Úlcera duodenal.
I. Santos, Noemia Pereira da Silva. II. Lira, Mariane Cajubá de Britto. Título.

579.888 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-26/2013



Dissertação de Mestrado apresentada por **Audenes de Oliveira Melo** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA FUCANA LIVRE E NANOENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS", orientada pela Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos, aprovada no dia 31 de julho de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Núcleo de Biologia - CAV/UFPE

Dra. Marcela Outtes Wanderley
Laboratório de Imunopatologiaeizo ASAMI - UFPE

Dra. Milena Sales Ferraz
Laboratório de Imunopatologiaeizo ASAMI - UFPE

Autor

Audenes de Oliveira Melo

Dedico,
A Deus pelo dom da vida, a quem
eu honro e glorifico pelas grandes
maravilhas em que faz na minha
vida.

Aos meus pais e minha família
conhecedores das minhas
limitações e virtudes.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que é presença forte e constante em minha vida, fonte de misericórdia, conforto e sabedoria, ao qual agradeço por tudo que proporciona em minha vida “Te glorifico, Te louvo e adoro”

Aos meus pais, Josefa de Oliveira Melo e José Barbosa de Melo Filho, por todos esses anos de incentivo pela educação e formação cidadã.

Aos meus irmãos, Aurineide Oliveira de Melo, Amisterdam de Oliveira Melo, Alcicleide de Oliveira Melo, pela amizade, cumplicidade, paciência e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Amisterdan Júnior, Brenda Emanoele, Roberto Pereira e Alice França, por ser fonte de alegria em minha vida, que me fazem buscar sempre o melhor na minha vida.

Aos irmãos em cristo e cunhados Wedson Clayton e Damares Cristina, por compartilharem da nossa convivência e fazer parte de nossa família.

À Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira pela orientação e importantes contribuições, sendo fundamental no desenvolvimento deste trabalho, sempre mostrando desde o início do trabalho, qual seria o verdadeiro papel de um professor na instrumentalização e consolidação do aprendizado; pela amiga, pela pessoa extremamente responsável e ética, meus eternos agradecimentos.

À Profa. Dra Noemia Pereira da Silva Santos por ter aceitado a orientação da pesquisa e paciência ao desenvolver do estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás pela disponibilidade e auxílio na elaboração e análise de dados.

À Profa. Dra. Marcela Wanderley, pela disponibilidade, simplicidade e humildade em que sempre atendeu as solicitações, bem como, pelas consideráveis contribuições científicas que foram de grande relevância para o desenvolvimento da pesquisa, como parte integrante das bancas de avaliação e qualificação do projeto.

Ao Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas, pelas contribuições, tanto como professor da pós-graduação, quanto como parte integrante das bancas de avaliação e qualificação do projeto, sempre se mostrando disponível e com importantes contribuições técnico-científicas.

Ao Grupo de pesquisa, Sistema de Liberação Controlada de Fármacos, coordenado pela Profa. Dra. Nereide Stella Santos Magalhães, e Laboratório de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami LIKA/UFPE, pelo acolhimento e facilitação do desenvolvimento de algumas etapas da pesquisa.

Ao Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami LIKA/UFPE, Prof. Dr. José Luiz Filho de Lima, permitindo a realização de etapas fundamentais na execução deste trabalho.

À Janice Vasconcelos Oliveira, pela amizade, colaboração e cumplicidade durante todo o período da pós-graduação.

À Soraia Lins, pela verdadeira amizade que foi construída e consolidada durante a pós-graduação, pelas contribuições, incentivo. Que Deus com sua infinita bondade lhe conceda muita paz e saúde.

Às acadêmicas do curso de nutrição, Maria Carolina Lyra e Maria Clara Santana, pela sua valiosa contribuição para realização deste trabalho.

Ao corpo de técnicos em laboratório de todos os departamentos do CAV.

À todos os animais que participaram desta pesquisa doando suas vidas em prol deste estudo científico.

Aos amigos, Thiers Campos, Camila, Tiago David dos Santos Oliveira, Juliana Castro, Hugo Gama, Kleber Fraga, Cybele Tavares, que me ajudaram com palavras de incentivo e com momentos de descontrações.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	Xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Fisiologia Gástrica	4
1.3.1.1 Mecanismos protetores da mucosa gástrica	6
1.3.2 Fucana	10
1.3.3 Nanotecnologia e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	13
1.3.3.1 Lipossomas	14
CAPÍTULO 2	19
Avaliação da atividade gastroprotetora da fucana livre e nanoencapsulada em lipossomas	
2.1 Resumo	20
2.2 Abstract	21
2.3 Introdução	22
2.4 Material e Métodos	23
2.4.1 Materiais	23
2.4.2 Preparação de lipossomas contendo fucana	24
2.4.3 Caracterização de lipossomas contendo fucana	24
2.4.3.1 Análise do tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga de superfície e pH	24
2.4.3.2 Avaliação da estabilidade de lipossomas contendo fucana	25
2.4.4 Estudo de lesões gastroduodenais induzidas em ratos <i>Wistar</i>	25
2.4.4.1 Animais	25
2.4.4.2 Indução da úlcera	25
2.4.4.3 Análises histopatológicas e histomorfométricas de estômago e	26

duodeno de ratos	
2.4.4.3.1 Análise da presença de muco	26
2.4.4.3.2 Análise do epitélio glandular e vilosidades intestinais	27
2.4.5 Análises estatísticas	27
2.5 Resultados e Discussão	27
2.5.1. Caracterização físico-química dos lipossomas contendo fucana	27
2.5.2. Estudo de lesões gastroduodenais induzidas em ratos <i>Wistar</i>	30
2.5.2.1 Análises histopatológicas e histomorfométricas do estômago de ratos	30
2.5.2.2 Análises histopatológicas e histomorfométricas do duodeno de ratos	35
2.6 Conclusões	40
2.7 Agradecimentos	40
2.8 Referências	41
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	xvii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Divisão anatômica do estômago (RIOS, 2009).	04
Figura 1.2 –	Elementos estruturais da mucosa gástrica, representando o tipo celular e a substância produzida. Fonte: www.medicinageriatrica.com.br	05
Figura 1.3 –	Mucosa gástrica e mecanismos de defesa (RIOS, 2009).	07
Figura 1.4 –	Algas marinhas. a) <i>Phaeophyceae</i> (algas castanhas); b) <i>Rhodophyceae</i> (algas vermelhas); c) <i>Chlorophyceae</i> (algas verdes).	11
Figura 1.5 –	Estrutura química da fucana (KIM, 2010).	11
Figura 1.6 –	Formas de homopolímeros (homofucanas) e heteropolímeros (Heterofucanas) (Adaptado de Hidari, 2008).	12
Figura 1.7 –	Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada (LIRA, 2007).	13
Figura 1.8 –	Sistemas de Liberação controlada (LAPENDA, 2010).	14
Figura 1.9 –	Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e ao número de lamelas (LASIC, 1998).	16
Figura 1.10 –	Classificação dos lipossomas quanto à constituição. Lipossomas convencionais, Lipossomas sítio-específicos, Lipossomas furtivos, Lipossomas polimórficos (catiônico) (modificado de TORCHILIN, 2005).	17
Figura 2.1 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glândular do estômago de ratos <i>Wistar</i> , apresentando (setas) células com muco (mucinas). A – Controle positivo, B – Controle negativo, C – Fucana livre, D – Lipo-Fucana. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b).	30
Figura 2.2 –	Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b) em epitélio glandular do estômago de ratos. a e b são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).	32
Figura 2.3 –	Análise histomorfométrica da espessura do epitélio glandular do estômago de ratos <i>wistar</i> . (a) – Controle positivo, (b) – Controle negativo, (c) – Fucana, (d) – Lipo-Fucana. G – Epitélio glândular, MM – Muscular da mucosa, sa , Ec –	34

- Esfoliação celular, **Fg**- Fosseta gástrica. Hematoxilina-Eosina.
- Figura 2.4 – Análise histomorfométrica da espessura do epitélio glândular do estômago de ratos *wistar*. **(a)** – Controle negativo, **(b)** – Controle positivo, **(c)** – Fucana, **(d)** – Lipo-Fucana. **a, b, c e d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). 35
- Figura 2.5 – Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glândular do duodeno de ratos *Wistar*, apresentando (setas) células com muco (mucinas). **A** – Controle positivo, **B** – Controle negativo, **C** – Fucana livre, **D** – Lipo-Fucana. Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b). 36
- Figura 2.6 – Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do duodeno de ratos *wistar*, em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b). **a, b, c e d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). 37
- Figura 2.7– Análise histopatológica e histomorfométrica da espessura do epitélio glandular do duodeno de ratos *wistar*. **(a)** - Controle poitivo, **(b)** – Controle negativo, **(c)** – Fucana, **(d)** – Lipo-Fucana. **G** – Epitélio glandular, **MM** – Muscular da mucosa, **SM**- submucosa, **V** – Vilosidade intestinal. 38
- Figura 2.8– Análise histomorfométrica da espessura do epitélio glandular (a) e vilosidades duodenais (b) de ratos *wistar*. **a, b, c e d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta de lipossomas com e sem fucana.	28
Tabela 2 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH, de lipossomas com fucana, antes e após os testes de estresse mecânico e centrifugação.	29
Tabela 3 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de Lipossomas com fucana, no intervalo de 0 a 30 dias.	30

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
Hz	Hertz
ml	Mililitro
mg	Miligramma
%	Por cento
m	Metro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
Mol/%	Mol por cento
Kg	Kilogramma
µg	Microgramma
µl	Microlitro
°C	Grau Celsius
±	Mais/menos
rpm	Rotação por minuto
nm	Nanômetro
v/v	Volume por volume
h	Hora
mm ³	Milimetro Cúbico
pH	Potencial Hidrogeniônico
W	Watz
s	Segundo

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
CH	Colesterol
ECl	Enterocromafinas
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
HCl	Ácido clorídrico
SNC	Sistema Nervoso Central
NP-SH	Compostos Sulfidrílicos não-protéicos
PSs	Polissacrídeos sulfatados
MLV	Vesículas multilamelares grande
LUV	Vesículas unilamelares grande
SUV	Vesículas unilamelares pequena
MG1	Monossialogangliosídeo 1
TGI	Trato gastrointestinal
PC	Fosfatidilcolina
SA	Estearilamina
PSC	Espectroscopia de correlação de fótons
IP/PDI	Índice de Polidispersão
NBF	Formol neutro tamponado

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi encapsular a fucana (*Sargassum cymosum*), em lipossomas e avaliar a atividade gastroprotetora, tanto na sua forma livre, como encapsulada. Os lipossomas foram obtidos e caracterizados por testes físico-químicos e de estabilidade. A atividade gastroprotetora *in vivo* foi realizada utilizando ratos *Wistar*, pré-tratados durante 14 dias com a fucana livre (Fuc), nanoencapsulada (Lipo-Fuc), e com os controles positivo (sem úlcera) e negativo (com úlcera e sem tratamento), por via oral. Após jejum (48 horas), a úlcera foi induzida com ácido acetilsalisílico (200 mg/Kg), o estômago e o duodeno foram removidos para análises histológicas avaliando-se a área com muco, espessura do epitélio glandular e vilosidades intestinais. Os resultados foram analisados pelos testes *t*-Student e Kruskal-Wallis. Lipossomas contendo fucana foram obtidos apresentando tamanho médio de partícula de $125,9 \pm 1,2$ nm, com índice de polidispersão $0,39 \pm 0,02$ e pH $6,89 \pm 0,05$ e carga positiva, permanecendo estáveis por 30 dias. Em relação à área de muco no estômago, os resultados mostraram que, no grupo pré-tratado com a Fuc, os animais permaneceram com média da área de muco semelhante ao grupo que não foi realizada indução da úlcera ($7,5 \pm 4,5 \mu\text{m}^2$ e $9 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Por outro lado, a fucana encapsulada exibiu uma área ($2,6 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$) similar ao grupo com úlcera não tratada ($3,5 \pm \mu\text{m}^2$), sugerindo que o composto possivelmente não foi liberado a partir das vesículas no estômago, não promovendo, portanto nenhuma ação. No estudo dos danos epiteliais o grupo da Fuc apresentou valores superiores aos demais grupos tratados revelando novamente sua ação gastroprotetora. As análises no duodeno revelaram uma área média de $7,52 \pm 2,42 \mu\text{m}^2$ para um epitélio normal (sem úlcera), $6,00 \pm 3,17 \mu\text{m}^2$ para o epitélio com úlcera sem tratamento, $6,43 \pm 1,82 \mu\text{m}^2$ e $6,62 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ para epitélio com úlcera após tratamento com a fucana livre e encapsulada, respectivamente. Neste local, pode ser observado valor maior para tratamento com a Lipo-Fuc quando comparado ao obtido na Fuc, sugerindo que houve liberação da fucana a partir dos lipossomas, ao contrário do encontrado no estômago. Em relação à análise das vilosidades intestinais a fucana encapsulada exerceu uma atividade citoprotetora com uma extensão média de $395,53 \pm 118,64 \mu\text{m}$, inferior ao grupo com o composto livre, mas superior ao grupo referente ao controle negativo, o qual apresentou uma área de $314,10 \pm 59,71 \mu\text{m}$. Os resultados revelaram ação gastroprotetora da fucana (*Sargassum cymosum*), até então nunca estudada fornecendo subsídios para novas pesquisas utilizando esta molécula.

PALAVRAS-CHAVE: Fucana, *Sargassum cymosum*, Biomoléculas, Nanotecnologia, Lipossomas, Mucinas, Úlcera gástrica, Úlcera duodenal.

ABSTRACT

The aim of this study was to encapsulate fucan (*Sargassum cymosum*) in liposomes and to evaluate the gastroprotective activity, both in its free and encapsulated form. Liposomes were obtained and characterized by physico-chemical and stability. The gastroprotective activity in vivo was performed using *Wistar* rats pretreated for 14 days with free fucan (Fuc), fucan-loaded liposomes (Lipo-Fuc), and the positive controls (without ulcers) and negative (with ulcer and without treatment) orally. After fasting (48 hours), the ulcer was induced with acetylsalicylic acid (200 mg/Kg), stomach and duodenum removed for histological analyzes evaluating the area with mucus, thickness of the glandular epithelium and intestinal villi. The results were analyzed by Student's t-test and Kruskal-Wallis. . Fucan-loaded liposomes were obtained presenting average particle size of 125.9 ± 1.2 nm with a polydispersity index of 0.39 ± 0.02 , pH 6.89 ± 0.05 and positive charge, remained stable for 30 days. Regarding the area of mucus in the stomach, the results showed that in the group pretreated with Fuc, the animals remained with an average area of mucus similar to the group that there wasn't an induction of ulcer ($7.5 \pm 4.5 \mu\text{m}^2$ and $9 \pm 6.7 \mu\text{m}^2$, respectively). On the other hand, fucan-loaded liposomes exhibited area ($2.6 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$) similar to untreated ulcer group ($3.5 \pm \mu\text{m}^2$), possibly suggesting that the compound was not released from the vesicle in the stomach, not promoting action. In the study of epithelial damage, the group treated with Fuc showed higher values when compared to the other groups treated, revealing again its gastroprotective action. The analyzes in the duodenum revealed an average area of $7.52 \pm 2.42 \mu\text{m}^2$ for normal epithelium (without ulcers), $6.00 \pm 3.17 \mu\text{m}^2$ for the epithelium with ulcer but without treatment, $6.43 \pm 1.82 \mu\text{m}^2$ and $6.62 \pm 1.31 \mu\text{m}^2$ for epithelium with ulcer after treatment with free fucan and encapsulated, respectively. Here, it could be observed higher value for the group treated with Lipo-Fuc in comparison to that obtained with Fuc, suggesting that fucan was probably released from liposomes, unlike that found in the stomach. Regarding the analysis of the intestinal villi fucan encapsulated exerted a cytoprotective activity with an average of $395.53 \pm 118.64 \mu\text{m}$ below the group of free molecule, but higher than for the negative control group, which showed an area of $314.10 \pm 59.71 \mu\text{m}$. These results reveal the gastroprotective action of fucan (*Sargassum cymosum*), hitherto unstudied, and its activity in encapsulated form.

KEYWORDS: Fucoïdan, *Sargassum cymosum*, Biomolecules, Nanotechnology, Liposomes, mucins, gastric ulcer, duodenal ulcer.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Quando mecanismos de defesa da mucosa gástrica (secreção de muco, de bicarbonato e a produção de prostaglandinas) são vencidos pelos seus agentes agressores, como o ácido clorídrico (HCl), uso de antiinflamatórios, infecção pela bactéria *Helicobacter Pylori*, estresse, álcool, fumo, dentre outros, ocorrerá a erosão de uma área circunscrita da mucosa, que pode estender-se profundamente atingindo as camadas musculares ou, através do músculo até o peritônio, configurando-se uma úlcera (KUTTY *et al*, 2005; COLA, 2006).

A úlcera gástrica acomete milhares de pessoas distribuídas pelo mundo, ocorrendo com frequência máxima naquelas com faixa etária entre 40 e 60 anos, apesar de atualmente ser também observada em crianças e, até mesmo em lactentes (BRUNNER, 2005). Manifesta-se inicialmente através de náuseas, vômitos, desconforto epigástrico, azia e dor, podendo ocorrer inclusive hemorragia. As características clínico-epidemiológicas da doença conferem um problema de saúde pública tornando necessários estudos que busquem alternativas para o tratamento ou prevenção destas lesões (KUTTY *et al*, 2005).

Atualmente, há um grande interesse no estudo de compostos bioativos que estimulem aceleração no reparo das úlceras, diminuindo o tempo de tratamento e conseqüentemente, promovendo uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Os polissacarídeos sulfatados vem sendo considerados uma promissora alternativa neste reparo tecidual (COSTA, 2010). Dentre os polissacarídeos, a Fucana é a mais amplamente estudada de todos os polissacarídeos sulfatados de origem não mamífera (PEREIRA *et al.*, 2002). Esta biomolécula se destaca por apresentar diversas atividades biológicas incluindo atividade anticoagulante (USHAKOVA *et al*, 2009), antitumoral (ELLOUALI *et al*, 1994), antiinflamatória e antioxidante (CUMASHI *et al*, 2007), gastroprotetora (LI *et al*, 2008) entre outras.

Em estudo realizado sobre a atividade antiúlcera da fucana extraída da *Fucus vesiculosus* foi observado um efeito gastroprotetor, por promover epitelização, organização celular, tendência de regeneração da mucosa e redução do tamanho da úlcera aguda (CHOI *et al*, 2010). Essa atividade citoprotetora poderia ser potencializada com a utilização de sistemas de liberação controlada, a exemplo dos

lipossomas, que são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas as quais se organizam espontaneamente em meio aquoso. Essas vesículas são consideradas excelentes nanocarreadores devido a sua flexibilidade estrutural relacionada ao tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica, como na sua capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Além disso, são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (TORCHILIN, 2005).

Neste contexto, ressalta-se a riqueza deste estudo, uma vez que propõe o estudo da utilização de produtos naturais e a nanotecnologia para o desenvolvimento de novos sistemas com potencial utilização no tratamento da úlcera.

Assim, o presente estudo teve como propósito experimental o desenvolvimento de formulações lipossomais contendo fucana, extraída da espécie *Sargassum cymosum*, e avaliação da atividade gastroprotetora na sua forma livre e encapsulada em lipossomas. Ressaltamos que não há relatos na literatura utilizando esta fucana na sua forma livre para a finalidade em questão, e nem na sua forma encapsulada.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a propriedade gastroprotetora da fucana (*Sargassum cymosum*) livre e nanoencapsulada em lipossomas.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver lipossomas contendo fucana;
- Caracterizar as formulações obtidas;
- Realizar pré-tratamento dos animais (ratos *Wistar*) com a fucana livre e nanoencapsulada;
- Induzir úlcera aguda em ratos *Wistar* utilizando ácido acetilsalicílico;
- Investigar a ação antiúlcera *in vivo* da fucana livre e nanoencapsulada em lipossomas;
- Avaliar histologicamente as úlceras gastroduodenais induzidas;

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 FISIOLÓGIA GÁSTRICA

O estômago é constituído por várias camadas de músculo liso e divide-se em três porções: fundo, corpo e antro pilórico, ambos delimitados por dois esfíncteres: na parte superior ou proximal do estômago, pelo esfíncter esofágico inferior, e na sua parte inferior ou distal, pelo esfíncter pilórico ou piloro (Figura 1.1). É a maior dilatação do trato digestivo com capacidade de armazenar de 1,5 a 2,5 litros, variando de forma em cada indivíduo. Dependendo da sua posição e quantidade de alimento, está em contato com a parede abdominal anterior, face visceral do lobo esquerdo do fígado e diafragma, e a sua parede anterior, completamente coberta pelo peritônio. Sendo sua principal função a digestão enzimática de proteínas (HAMILTON, 1991; KUTCHAL, 1996).

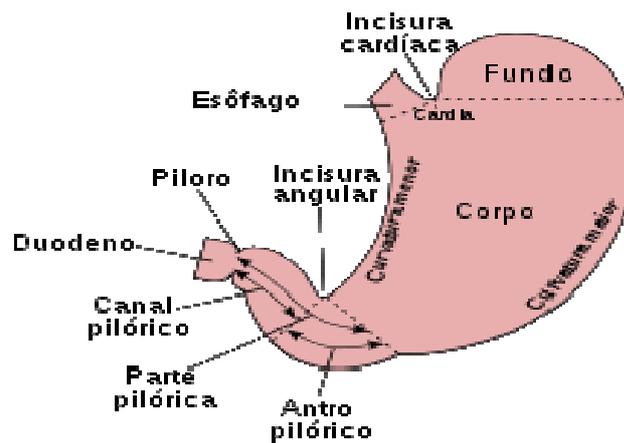


Figura 1.1 – Divisão anatômica do estômago (RIOS, 2009).

A mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares. A porção glandular cardíaca que contém células glandulares secretoras de muco e está localizada abaixo do esfíncter esofágico inferior, a porção glandular oxíntica que corresponde às células parietais secretoras de ácido clorídrico, abrangendo cerca de 80% do estômago (fundo e corpo), células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafinas (ECL) que liberam histamina. Por fim, a porção glandular pilórica que abrange 20% da área total do estômago (antro), apresenta os mesmos tipos celulares que as glândulas

oxínticas, excetuando as células parietais (Figura 1.2) (COSTA, 1994; JAIN *et al*, 2006).

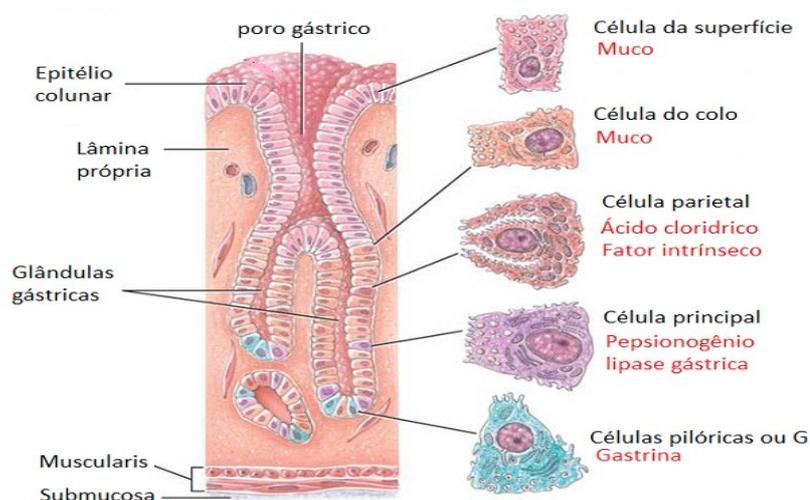


Figura 1.2 – Elementos estruturais da mucosa gástrica, representando o tipo celular e a substância produzida. Fonte: www.medicinageriatrica.com.br

No estômago há um equilíbrio entre os agentes agressores (HCL, pepsina, sais biliares, infecção por microorganismos) e agentes gastro-protetores como a camada de muco-bicarbonato que confere proteção física e química, a microcirculação (fluxo sanguíneo), a presença de compostos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) e glutathione constituem fatores importantes de proteção epitelial (OLINDA, 2008).

Os fatores que controlam a secreção ácida, a digestão e a produção de fatores citoprotetores, são de grande complexidade, com participação do sistema nervoso central (SNC), plexo mioentérico, sistema nervoso autônomo, hormônios, neurotransmissores e autacóides. A inervação intrínseca do estômago é constituída pelo plexo mioentérico que inerva as camadas musculares e regula a função motora, e o plexo submucoso que inerva a submucosa e regula a secreção e absorção gastrointestinal. Neurônios recebem aferência do SNC através das fibras do sistema nervoso simpático e parassimpático (inervação extrínseca) e de outros neurônios entéricos (neurônios sensoriais e interneurônios) (COSTA, 1994 ;FOURMY, 2006).

As fibras pós-ganglionares inervam diretamente os vasos sanguíneos e a musculatura lisa, estimulam a contração da muscular da mucosa e de alguns esfíncteres, e inibem a motilidade e a atividade secretora do trato gastrointestinal, ambas funções da inervação simpática. Já o sistema parassimpático atua nos gânglios do plexo mioentérico, estimulando a atividade motora e secretora (PLEURA, 2008).

1.3.1.1 MECANISMOS PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA

A camada de muco é uma das principais barreiras que isolam as células do lúmen e a superfície de células apicais, onde ocorrem às variações de pH, conteúdo osmótico e calórico da refeição. O epitélio gástrico é recoberto por esse muco que é aderente, contínuo, gelatinoso e viscoelástico. Um gradiente de pH é formado e permanece diferente entre as células apicais e as do lúmen gástrico, assim a difusão de moléculas do lúmen para o tecido passa a ser restrita ou limitada, o que confere proteção (GAUTIER,2004).

O muco secretado pelas células é formado por compostos glicoprotéicos, principalmente representados pelas mucinas. As moléculas de mucinas possuem alto peso molecular, com estrutura de esqueleto da proteína altamente polimérica, ligada a numerosas cadeias laterais de oligossacáridos higroscópicos e hidrofílicos que contribuem para a formação de estrutura semelhante a gel, apresentam em sua composição 20 % de proteínas e 80 (oitenta) % de carboidratos. Após a sua liberação para a superfície epitelial, as mucinas se hidratam formando uma cobertura gelatinosa que adere ao epitélio protegendo-o contra a abrasão mecânica e invasão bacteriana (GOLD *et al*, 1981; GAUTIER *et al*, 2004).

Quanto à fração glicídica de sua molécula, as mucinas podem ser divididas em dois grandes grupos, representadas pelas mucinas neutras, ricas em glicogênio, e mucinas ácidas, ricas em ácido siálico ou radicais sulfatados. Apesar das diferenças químicas em seus constituintes glicídicos, os dois tipos de mucinas, aparentemente, possuem as mesmas funções biológicas (FILIPE, 1979).

As mucinas ácidas possuem na sua fração glicídica grande quantidade de ácido siálico (mais que 10 mol%). A porção glicídica é composta principalmente por glucosamina, galactosamina e frutose. Dividem-se em dois subgrupos representados pelas sulfomucinas e sialomucinas segundo a predominância de radicais sulfatados ou de ácido siálico, respectivamente, na sua porção glicídica. Quando se analisa a fração protéica das mucinas ácidas, a prolina, treonina e glicina são os aminoácidos mais presentes (GOLD *et al*, 1981).

A estimulação da secreção ácida aumenta a habilidade da mucosa gástrica em resistir a lesões. As células parietais quando liberam o íon H^+ , transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_3^- , que resulta maior disponibilidade de bicarbonato. Uma molécula de dióxido de carbono (CO_2) é convertida em HCO_3^- , para cada íon H^+ secretado pelas células parietais, o que constitui a conhecida maré alcalina, após a secreção do ácido gástrico, protegendo

assim a mucosa gástrica, outros estudos, *in vivo* e *in vitro*, reforçam o efeito protetor da maré alcalina (Figura 1.3) (SCHUBERT, 2008).

A composição química e a disposição anatômica das células epiteliais gástricas conferem proteção intrínseca a mucosa, a sua composição e estrutura histológica e anatômica, preservam as células existentes e repõem o tecido lesionado. As junções intercelulares fechadas e outras barreiras controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa, espaços intersticiais e submucosos. Os agentes que conseguem atravessar essas barreiras, ainda serão restritos a membrana celular, que é composta de elevadas concentrações de fosfolípídios que conferem o caráter de hidrofobicidade da mucosa gástrica, a qual restringe a difusão de partículas como os íons H^+ (SCHUBERT, 2008).

A migração e divisão celular promovem reparo ao tecido lesionado, essas células do colo glandular entram em divisão e migram para a superfície do epitélio, diferenciando-se em células superficiais. O fator de crescimento epidermal (EGF) estimula a proliferação e migração celular, modula o fluxo sanguíneo, e inibe a secreção de ácidos e pepsina, contribuindo para a cicatrização de úlceras (SCHUBERT, 2008).

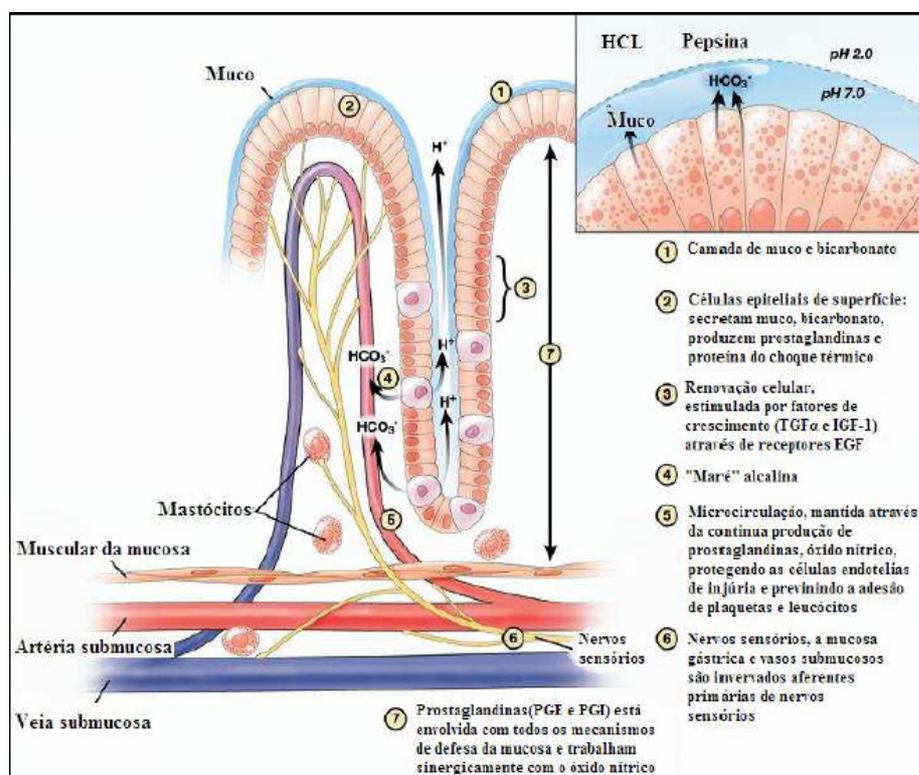


Figura 1.3 – Mucosa gástrica e mecanismos de defesa (RIOS, 2009).

Alguns aspectos bioquímicos são relevantes na citoproteção gástrica, como o sistema antioxidante, o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGs). O estômago normal produz a maior parte de PGs na isoforma COX-1 (constitutiva), enquanto a COX-2 (induzida) atua como fator importante no reparo de úlceras, através de mecanismos indiretos como aumento de produção de muco e bicarbonato, inibição da motilidade gástrica e secreção ácida, manutenção do fluxo sanguíneo, inibição de apoptose, inibição da ativação de mastócitos e diminuição da aderência leucocitária no endotélio vascular (WALLACE, 2001).

Quando um agente irritante invade o espaço subendotelial, neurônios sensoriais aferentes são capazes de desencadear uma resposta, que gera um aumento no fluxo sanguíneo da mucosa que permite o tamponamento do ácido ou outro agente irritante e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, com isso há uma limitação na sua penetração para camadas mais profundas. Além desse aspecto promove a chegada de uma quantidade ideal de oxigênio, nutrientes e bicarbonato (WALLACE, 2001).

O sistema imunológico da mucosa inclui a participação das células como mastócitos e macrófagos, que mobilizam o sistema imunológico celular desencadeando uma resposta local quando ocorre uma agressão, se todos os mecanismos superficiais de defesa da mucosa falham e uma lesão é instalada, inicia-se uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela migração de neutrófilos para a lesão, numa tentativa de reduzir a entrada de microorganismos na circulação sistêmica e facilitação do reparo tecidual (WALLACE, 2001).

A modulação farmacológica do esvaziamento gástrico, da motilidade duodenal, e da mistura ácido-base representam mecanismos de defesa, por impedirem a compressão de pequenos vasos, o que poderia favorecer a lesão endotelial, desenvolvimento de congestão e estase, como etanol (SCHUBERT, 2008).

A mucosa não é impenetrável a diversas substâncias ingeridas ou produzidas. Deste modo, a formação de úlceras e a ocorrência de injúrias são inevitáveis (BERSTAD, 1993). A úlcera gástrica é uma lesão da mucosa estomacal que afeta um número significativo de pessoas no mundo, sendo considerada há bastante tempo uma das importantes causas de morbidade e mortalidade (DONATINI, *et al.*, 2011). A úlcera desenvolve-se quando há um desequilíbrio entre os agentes proterores e agressores da superfície luminal das células epiteliais do estômago. Entre os agentes agressores se incluem a hipersecreção gástrica, pepsinas, infecção pelo *Helicobacter pylori*, uso de anti-inflamatórios ou aspirina, fatores genéticos, isquemia, hipoxia, uso de álcool e tabagismo. Entre os agentes defensores, pode-se destacar a produção de

muco e secreção de bicarbonato, produção de prostaglandinas, fatores de crescimento e fluxo sanguíneo local (AWAAD, 2012).

O mecanismo etiológico dessas lesões envolve processos isquêmicos, com liberação de radicais livres, e aparecimento de um infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos, fazendo com que a mucosa gástrica desenvolva características histopatológicas e alterações ultraestruturais e funcionais que resultam em lesões. Agressões teciduais agudas estão associadas à ruptura da membrana e injúria e esfoliação da superfície do endotélio. Quando alcançam camadas profundas da mucosa podem atingir o endotélio vascular, o que diminui o fluxo sanguíneo, reduz assim o aporte de oxigênio e nutrientes, resultando no aparecimento da lesão (CARVALHO *et al*, 2011; DIAS, 2009; SILVA, 2005).

Inicialmente os sintomas podem ser inexistentes. No entanto, com o agravamento da lesão inicial, o paciente começa a apresentar como principal queixa a dor, presente em 80 (oitenta) % dos pacientes e a dispepsia, que é um conjunto de sintomas gástricos que podem incluir náuseas, desconforto epigástrico, mal estar e a sensação de plenitude ou empachamento. Em casos mais graves o paciente pode apresentar hemorragia digestiva, emagrecimento, abdome agudo por perfuração, vômitos, entre outros (KUTTY *et al*, 2005; WANG, 2012).

Para confirmação diagnóstica, além do exame físico é necessário a realização de uma esofagoduodenoscopia com biópsia, pois a mesma permite identificar a lesão, determinar a sua anatomia e acompanhar a evolução após o tratamento, com confirmação anatomopatológica devido o diagnóstico diferencial com o câncer de estômago. A terapêutica mais comumente utilizada para o tratamento da úlcera estomacal relaciona-se à utilização de uma mistura de antibióticos, inibidores da bomba de prótons e sais de bismuto, antagonistas do receptor 2 da histamina e análogos da prostaglandina E , acompanhados da redução do estresse e repouso, cessação do tabagismo, modificação da dieta e acompanhamento médico sistemático (KUTTY *et al*, 2005; SMELTZER, 2005).

Devido à magnitude do problema causado pelas úlceras gástricas que afetam direta e negativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos, os estudos que buscam a incorporação de novos mecanismos que visa uma prevenção e/ou tratamento, se tornaram de grande interesse. Com isso, o estudo de compostos bioativos que apresentam uma propriedade antiúlcera e gastroprotetora se tornou uma alternativa em potencial para a diminuição da incidência de lesões e aceleração no reparo tecidual, diminuindo o tempo de tratamento e conseqüentemente promovendo uma melhoria na qualidade de vida. A fucana, um polissacarídeo sulfatado, extraído de algas marrons e invertebrados marinhos, com várias propriedades de interesse na

biotecnologia de produtos naturais, como antiúlcera, antitumoral, anticoagulante, fibrinolítica, cicatrizante, entre várias outras atividades biológicas, pode ser alternativa para o tratamento anti-úlceras. (WIJESEKARA, 2011; CHOI *et al*, 2010).

1.3.2 FUCANA

Mais de 70 % (setenta) da superfície do mundo está coberta por oceanos, e a grande diversidade de organismos marinhos oferece uma rica fonte de produtos naturais. O Ambiente marinho contém uma fonte de compostos funcionais, como polissacarídeos, sais minerais, vitaminas essenciais, anti-oxidantes, enzimas e péptidos bioativos (KIM, 2010).

As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil se iniciaram na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No entanto, ainda são escassas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 km de litoral brasileiro (SOARES *et al*, 2006).

Entre os organismos marinhos, as algas constituem um diversificado grupo de seres autotróficos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos que possuem diferenças estruturais e formam vários compostos bioativos, apresentando diversas atividades biológicas. Uma característica interessante em particular é a sua riqueza em polissacarídeos sulfatados (PSs), e devido a essa propriedade, tem atraído um interesse especial para a sua aplicação na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e aplicações na microbiologia e biotecnologia (REN, 1997).

A quantidade de PSs encontrada nas algas marinhas, pode ser diferente de acordo com as três principais divisões das algas: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Rhodophyceae* (algas vermelhas) e *Phaeophyceae* (algas castanhas) (Figura 1.4). As algas são encontradas em abundância no litoral brasileiro, especialmente no litoral nordestino e dentre os principais PSs encontrados, podemos destacar a fucana que está presente nas algas marrons, família *Phaeophyceae*. No entanto, não são as únicas fontes. Os equinodermos (Pepino e ouriço do mar) também apresentam em sua constituição a fucana (COSTA, 2010).

Nas algas, a fucana está localizada na matriz mucilagenosa e devido ao seu caráter altamente higroscópico, acredita-se que protejam a alga da desidratação quando essa é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilagenosa destes compostos, também parece contribuir para

tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, e assim melhor captar a luz e os nutrientes existentes (LIMA, 2009).



Figura 1.4 – Algas marinhas. a) *Phaeophyceae* (algas castanhas); b) *Rhodophyceae* (algas vermelhas); c) *Chlorophyceae* (algas verdes). Criado por Melo, A.O.(2013).

A Fucana pode ser encontrada na forma de homopolímeros (homofucanas) constituída essencialmente por unidades de α -L-fucose e grupos sulfato (Figuras 1.5), e de heteropolímeros (heterofucanas), que além destes constituintes, podem apresentar diferentes proporções de unidades de D-galactose, D-manose, D-xilose, L-ramnose, e/ou ácido D-glucurônico, além de grupos acetil (Figura 1.6) (LI *et al*, 2008; VIDAL *et al*, 2010).

Os Equinodermos são conhecidos por produzirem homofucanas sulfatadas com cadeias lineares e regulares padrões de sulfatação (MULLOY *et al*, 2000). Já as algas castanhas (*Phaeophyceae*) produzem, em sua grande maioria, fucanas ramificadas que são usualmente heterogêneas em sua composição monossacarídica e com um padrão de sulfatação irregular (BILAN *et al*, 2004).

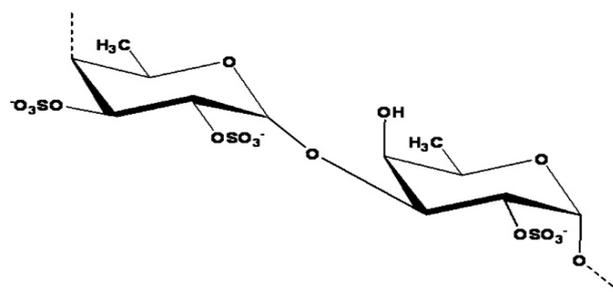


Figura 1.5 – Estrutura química da Fucana (KIM, 2010).

Em relação a sua estrutura química, são classificadas como complexas, estando relacionadas às diversas possibilidades de ligação entre os diferentes

1.3.3 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A nanotecnologia, tecnologia em que a matéria é manipulada à escala atômica e molecular, abrange atualmente diversas áreas incluindo a área da saúde, recebendo destaque como um importante campo de pesquisa com grande potencial de aplicação no diagnóstico e terapia de diversas patologias (MORALES, 2007).

Durante muito tempo a utilização de vários compostos terapêuticos era limitada devido a retenção ou degradação do agente terapêutico, pela sua baixa solubilidade em água e pelos seus efeitos colaterais. Tais limitações motivaram vários grupos de pesquisa no desenvolvimento de sistemas capazes de transportar um composto terapêutico proporcionando uma liberação controlada do fármaco encapsulado com conseqüente melhoria na eficácia terapêutica e minimização dos efeitos tóxicos (MORALES, 2007; BATISTA, 2007).

O objetivo primordial dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração plasmática do fármaco entre os dois níveis críticos (tóxico e subterapêutico), por um tempo prolongado utilizando-se uma dosagem única (Figura 1.7), buscam aumentar o potencial terapêutico de um composto, permanecendo com uma concentração plasmática constante e efetiva em função do tempo (MORALES, 2007).

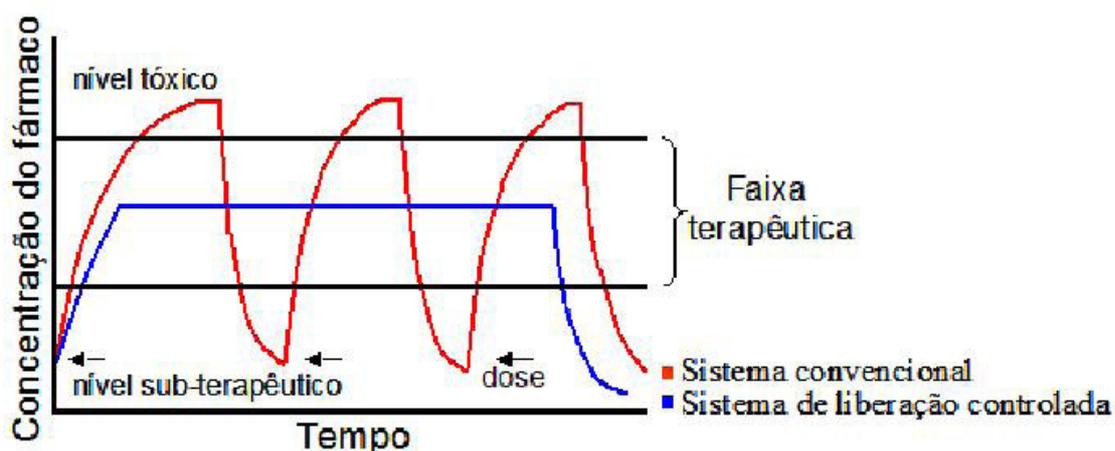


Figura 1.7 – Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada (LIRA, 2007).

Os sistemas de liberação nanoestruturados podem proporcionar maior eficácia terapêutica dos fármacos encapsulados, com sua liberação progressiva e controlada, a partir da degradação de seus constituintes, e maior tempo de permanência na circulação sanguínea evitando doses tóxicas e subterapêuticas. A figura 1.8 descreve

vários nanossistemas que são desenvolvidos atualmente. Neste material detalharemos os lipossomas, uma vez que foram escolhidos para realização do trabalho.

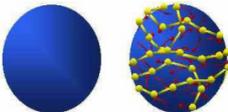
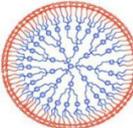
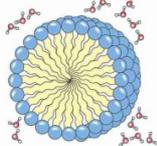
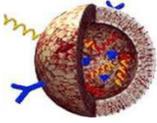
Vetores	Descrição	Ilustração	Referência
Nanocápsulas	Sistemas reservatórios constituídos por uma fina parede polimérica que envolve um núcleo central, normalmente oleoso, onde o fármaco se encontra disperso ou adsorvido.		www.nanoparticles.org/links/Nanosphere.jpg ; SOPPIMATH et al., 2001.
Nanoesferas	Sistemas matriciais ou monolíticos, nos quais o fármaco está fisicamente e uniformemente disperso na matriz do polímero.		www.nanoparticles.org/links/Nanosphere.jpg ; SINGH; LILLARD, 2009.
Dendrimeros	São complexos poliméricos compostos por uma série de ramos bem definidos em torno de um núcleo com tamanho (1 a 10 nm). O fármaco pode ser encapsulado no interior do dendrímico ou ser associado na estrutura do dendrímico a partir de uma ligação covalente ou interação física .		www.ism.u-bordeaux1.fr/spip.php?article42 ; KOO et al., 2005.
Micelas	São formadas por moléculas anfífilas que geram uma estrutura núcleo-coroa em meio aquoso, na qual a coroa, normalmente, tem característica hidrofílica e o núcleo é hidrofóbico. É usada para solubilização de fármacos hidrofóbicos por associação física em diferentes regiões no centro da micela.		www.educa.madrid.org/.../Lipidos/micelas.htm ; KOO et al., 2005.
Nanopartículas lipídicas sólidas	Partículas submicrônicas baseadas em monocamadas lipídicas sólidas à temperatura ambiente ou corpórea. Encapsula-se fármacos hidrofóbicos.		FARAJI; WIPF, 2009
Nanotubos	São “lâminas” de átomos de carbono dispostas na forma de tubos.		FARAJI; WIPF, 2009
Lipossomas	São vesículas lipídicas cuja parede é formada por uma ou várias bicamadas fosfolipídicas contendo um espaço aquoso interno. Pode-se encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos.		www.cosmeticnow.com.br/imagens/lab-bioativos_lipossomas.jpg ; Torchilin, 2005.

Figura 1.8 – Sistemas de Liberação controlada (LAPENDA *et al.*,2010).

1.3.3.1 LIPOSSOMAS

No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich”. Nesse modelo, o fármaco seria ligado ao transportador e

idealmente exibiria sua atividade farmacológica apenas no tecido-alvo. O primeiro avanço nessa área deu-se em 1965 com o trabalho de Alec Bangham e colaboradores, os quais desenvolveram um sistema de difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, embora sem qualquer ligação imediata aos estudos de sistemas transportadores de fármacos. Nesse trabalho foi desenvolvido e caracterizado um sistema de vesículas fosfolipídicas e, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas (SANTOS, 2002; MACHADO, 2007; BATISTA *et al*, 2007).

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que se organizam espontaneamente em meio aquoso (BRANDL; GREGORIADIS, 1994). Tais partículas são consideradas excelente forma de sistema de liberação controlada de fármacos e substâncias biologicamente ativas devido a sua flexibilidade estrutural relacionada ao tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica e na sua capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Além disso, os lipossomas são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos, características bastante atrativas para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos (BAEUMNER, 2006).

Os lipossomas, na maioria das vezes, são obtidos a partir fosfolipídios. De uma forma mais geral, podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar. São sistemas versáteis, que podem ser modificados quanto ao tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno, conforme as necessidades farmacológicas (SANTOS, 2002; MACHADO, 2007). O colesterol também é um componente lipídico que faz parte da maioria das formulações lipossomais. Atua melhorando a fluidez da bicamada lipídica, aumentando rigidez das membranas no estado “cristal-líquido” e reduzindo a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel” (KIM, 2006). A carga das vesículas lipossomais é uma característica importante uma vez que podem modular o destino dos lipossomas no organismo, além de impedir a agregação das vesículas lipídicas por repulsão eletrostática. A estearilamina é um exemplo de lipídio que apresenta uma carga positiva, e a fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, uma carga negativa (BANERJEE, 2001; FRÉZARD *et al*, 2005) .

Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho, número de lamelas, e constituição lipídica (o que também condiciona a sua carga). O tamanho das vesículas lipídicas varia dependendo do modo de preparação. Podem ser classificados como vesículas multilamelares grandes (MLV – *Multilamellar Large Vesicles*) que são lipossomas de tamanho em escala micrométrica que possuem vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados; vesículas unilamelares

grandes (LUV – *Large Unilamellar Vesicles*), lipossomas que apresentam um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica); e os lipossomas em escala nanométrica que também possuem apenas um compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica), que são classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUV – *Small Unilamellar Vesicles*) (Figura 1.9) (MACHADO *et al*, 2007; SANTOS *et al*, 2002).

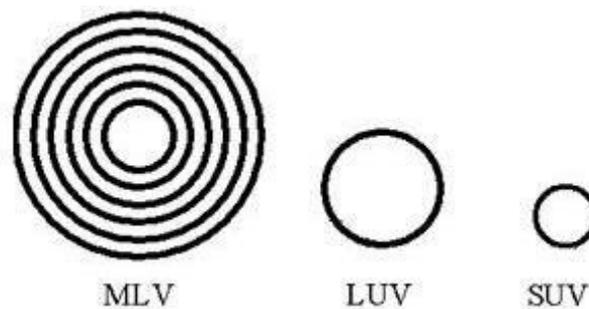


Figura 1.9 - Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e ao número de lamelas (LASIC, 1998).

Quanto à composição química os lipossomas são classificados em: lipossomas convencionais que são compostos basicamente de fosfolipídeos, colesterol e/ou um lipídio com carga (positiva ou negativa); lipossomas de longa circulação ou furtivos, que são obtidos pelo revestimento da superfície da bicamada lipídica com polímeros hidrofílicos sintéticos inertes e biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis, componentes hidrofílicos naturais, como o monossialogangliosídeo MG1 e fosfatidilinositol, (TORCHILIN, 2005; IMMORDINO *et al*, 2006); Além desses, há os lipossomas direcionados ou sítio-específicos caracterizam-se por apresentar em sua superfície moléculas como anticorpos, proteínas, carboidratos e peptídeos, sem o comprometimento da membrana lipídica e alteração na função do ligante. Lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática, dentre esses podemos citar os lipossomas catiônicos que apresentam carga positiva na superfície e têm sido utilizados para terapia gênica, liberando ácidos nucleicos dentro das células (TORCHILIN, 2005).

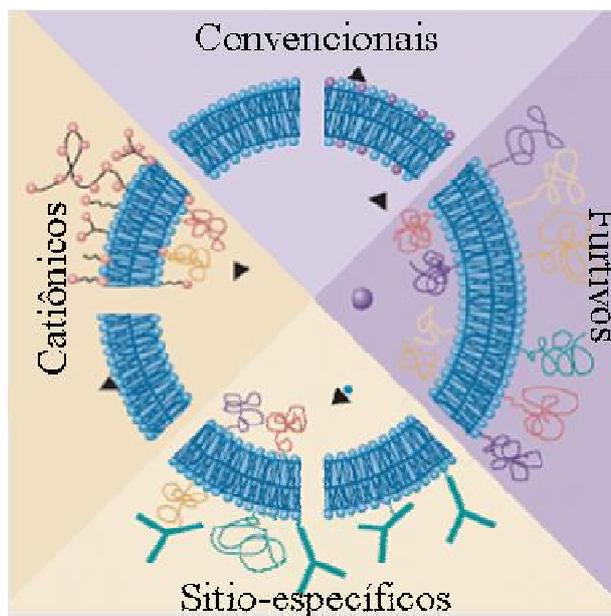


Figura 1.10 - Classificação dos lipossomas quanto à constituição. Lipossomas convencionais, Lipossomas sítio-específicos, Lipossomas furtivos, Lipossomas polimórficos (catiônico) (modificado de TORCHILIN, 2005).

O método mais utilizado para a obtenção de formulações lipossomais é a hidratação do filme lipídico, onde os lipídios e o fármaco lipofílico são dissolvidos em solvente orgânico, seguido da evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Posteriormente é realizada a hidratação do filme com água ou solução tampão, sob agitação, sendo formados os lipossomas multilamelares (GLAVAS-DODOV *et al*, 2005; CHRISTENSEN *et al*, 2007). Para a obtenção dos lipossomas SUV as preparações de MLV, são submetidas à ação do ultra-som, com a ajuda de um banho ou de uma sonda. Este é um método rápido e resulta em lipossomas com tamanho homogêneo (VEMUR, 1995; ANDRADE *et al*, 2004; HATZI *et al*, 2007).

Para o estudo da caracterização dos lipossomas são avaliados parâmetros físico-químicos como o diâmetro médio das partículas, o índice de polidispersão, a carga da superfície, o potencial zeta e o pH das formulações. Ademais a eficiência de encapsulação, estudos de estabilidade e análise dos aspectos macroscópicos são avaliados (SANTOS-MAGALHÃES *et al*, 2000; ANDRADE *et al*, 2004). Através da microscopia óptica e eletrônica a morfologia dos lipossomas pode ser determinada (ANDRADE *et al*, 2004; MORAIS *et al*, 2008).

Os estudos sobre a utilização de lipossomas por via oral se iniciaram após a hipótese de que poderiam vencer as barreiras de defesas do trato gastrointestinal, ou

aumentar a absorção de compostos fracamente absorvidos. (BANGHAM *et al*, 1965). Alguns relatos descrevem que a encapsulação de fármacos oferecem uma proteção contra o ambiente gastrointestinal e facilitam o transporte de compostos (AGATA, *et al*, 1984; GREGORIADIS, 1976). No entanto, pesquisas *in vitro* sobre o transporte de células de difusão sugeriram que o aprisionamento lipossomal não facilitava o transporte de fármacos não absorvíveis pelo TGI e impediam o transporte de compostos absorvíveis (CHIANG *et al*, 2007).

O revestimento de lipossomas com polímeros como o polietilenoglicol e quitosana, usando fosfolipídios saturados ou a reticulação da membrana lipossomal, bem como, lipossomas contendo sais biliares, são algumas abordagens que tem sido empregada para aumentar a integridade de lipossomas em ambientes hostis, como o do trato gastrointestinal e se mostraram promissores para o uso em vacinas por via oral (CONACHE *et al*, 2001). No entanto, os mecanismos de sua liberação e absorção ainda não foram elucidados devido, dentre vários fatores, a complexidade da fisiologia gastrointestinal.

Contudo, se torna necessária a realização de estudos que contemplem a utilização de fármacos encapsulados por via oral, o que pode contribuir para um maior esclarecimento e elucidação de mecanismos que potencializem a ação do fármaco, ou que resistam ao ambiente do trato gastrointestinal. Nesse estudo, foi utilizado lipossomas convencionais contendo fucana para potencializar sua ação citoprotetora local no estômago e duodeno.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade gastroprotetora da fucana livre e nanoencapsulada em lipossomas

Audenes de Oliveira Melo^{1,2,3}

Laboratório de Nanotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel)/ Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil¹, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos/ Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão-PE², Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE³, Recife-PE Brasil.

* Autor para correspondência:

Audenes de Oliveira Melo

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Laboratório de Biotecnologia e Fármacos

Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista,

55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

Tel: +55-81-3523 3351 (fone/fax)

E-mail: audenesmelo@hotmail.com

2.1 Resumo

Neste estudo foi avaliada a ação gastroprotetora da fucana, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Sargassum cymosum*, na sua forma livre e nanoencapsulada em lipossomas. Os lipossomas apresentaram um tamanho de partícula de $125,9 \pm 1,2$ nm, com índice de polidispersão $0,39 \pm 0,02$ e pH $6,89 \pm 0,05$ e carga positiva, permanecendo estáveis por 30 dias. O estudo *in vivo* foi realizado em ratos *Wistar* através da indução de úlcera com ácido acetilsalisílico (200 mg/Kg). O estômago e o duodeno foram retirados para análises histológicas, avaliando-se a área com muco, espessura do epitélio glandular e vilosidades intestinais. Em relação a área de muco presente no estômago, os resultados mostraram que, no grupo pré-tratado com a Fuc, os animais permaneceram com uma média da área de muco semelhante ao grupo que não foi realizada indução da úlcera ($7,5 \pm 4,5 \mu\text{m}^2$ e $9 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Por outro lado, a fucana nanoencapsulada exibiu uma área ($2,6 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$) similar ao grupo com úlcera não tratada ($3,5 \pm \mu\text{m}^2$), sugerindo que o composto possivelmente não foi liberado a partir das vesículas no estômago, não promovendo, portanto nenhuma ação. As análises no duodeno revelaram uma área média de $7,52 \pm 2,42 \mu\text{m}^2$ para um epitélio normal (sem úlcera), $6,00 \pm 3,17 \mu\text{m}^2$ para o epitélio com úlcera sem tratamento, $6,43 \pm 1,82 \mu\text{m}^2$ e $6,62 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ para epitélio com úlcera após tratamento com a fucana livre e encapsulada, respectivamente. Neste local, pode ser observado valor maior referente ao grupo da Lipo-Fuc quando comparado ao obtido para Fuc, sugerindo que houve liberação da fucana a partir dos lipossomas no duodeno, ao contrário do que ocorreu no estômago. Tais resultados revelam a ação gastroprotetora da fucana (*Sargassum cymosum*), até então nunca estudada e a sua encapsulação em lipossomas promoveu uma ação mais efetiva no duodeno.

PALAVRAS-CHAVE: Fucana, *Sargassum cymosum*, Biomoléculas, Nanotecnologia, Lipossomas, Mucinas, Úlcera gástrica, Úlcera duodenal.

2.2 Abstract

In this study was evaluated the gastroprotective action of fucan, a sulfated polysaccharide extracted from the brown seaweed *Sargassum cymosum*, in its free forms and encapsulated into liposomes. Liposomes presented particle size of 125.9 ± 1.2 nm with a polydispersity index of 0.39 ± 0.02 , pH 6.89 ± 0.05 and positive charge, remained stable for 30 days. The *in vivo* study was performed using *Wistar* rats by inducing ulcer with acetylsalicylic acid (200 mg/Kg). The stomach and duodenum were removed for histological analysis, evaluating the area with mucus, thickness of glandular epithelium and intestinal villi. Regarding the area of mucus presented in the stomach, the results showed that in the group pretreated with Fuc, the animals remained with an average area of mucus similar to the group which was not induced the ulcer (7.5 ± 4.5 and $9 \mu\text{m}^2 \pm 6.7 \mu\text{m}^2$, respectively). On the other hand, the animals treated with fucoidan-loaded liposomes exhibited area ($2.6 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$) similar to untreated ulcer group ($3.5 \pm \mu\text{m}^2$), suggesting that the compound was not released from the vesicle into the stomach, not promoting action. The analyzes in the duodenum revealed an average area of $7.52 \pm 2.42 \mu\text{m}^2$ for normal epithelium (without ulcers), $6.00 \pm 3.17 \mu\text{m}^2$ for the epithelium with ulcer but without treatment, $6.43 \pm 1.82 \mu\text{m}^2$ and $6.62 \pm 1.31 \mu\text{m}^2$ for epithelial with ulcer after treatment with free fucan and encapsulated, respectively. Here, it can be seen higher value for the group Lipo-Fuc compared to that obtained for Fuc, suggesting that fucan was release from liposomes in the duodenum, unlike what occurred in the stomach. These results reveal the gastroprotective action of fucan (*Sargassum cymosum*), hitherto unstudied, and its activity in encapsulated form.

KEYWORDS: Fucoïdan, *Sargassum cymosum*, Biomolecules, Nanotechnology, Liposomes, mucins, gastric ulcer, duodenal ulcer.

2.3 Introdução

A úlcera gástrica se configura por uma erosão de uma área circunscrita da mucosa, que pode estender-se profundamente, atingindo as camadas musculares ou, através do músculo até o peritônio. Este fato ocorre quando mecanismos de defesa da mucosa gástrica (secreção de muco, de bicarbonato e a produção de prostaglandinas) são vencidos pelos seus agentes agressores, como o uso da aspirina e antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), o ácido clorídrico, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, estresse, álcool, fumo, dentre outros (Kutty et al, 2005; Cola, 2006).

A doença acomete milhares de pessoas distribuídas pelo mundo, ocorrendo com frequência máxima naquelas com faixa etária entre 40 e 60 anos, apesar de atualmente ser observada em crianças e, até mesmo em lactentes (Brunner, 2005). Manifesta-se inicialmente através de náuseas, vômitos, desconforto epigástrico, azia e dor, podendo provocar até a hemorragia. As características clínico-epidemiológicas da doença conferem um problema de saúde pública tornando necessários estudos que busquem alternativas para o tratamento destas lesões (Kutty et al, 2005).

Atualmente, há um grande interesse no estudo de compostos bioativos e ou de novas formas farmacêuticas que estimulem uma aceleração no reparo de úlceras, diminuindo o tempo de tratamento e conseqüentemente, promovendo uma melhoria na qualidade de vida. Dentre estes compostos, pode-se citar a fucana, um polissacarídeo sulfatado extraído tanto de algas marrons como de invertebrados marinhos, com várias propriedades de interesse na biotecnologia de produtos naturais, como: antiúlcera (Choi et al, 2010), antitumoral (Rocha de Souza et al, 2007), anticoagulante (Costa et al, 2010), antiviral (Adhikari et al, 2006), antioxidante (Wang et al, 2008), gastroprotetora, entre outras atividades biológicas (Wijesekara, 2011).

A atividade gastroprotetora da fucana, extraída da *Fucus vesiculosus*, foi recentemente estudada por Choi e colaboradores (2010). Os autores realizaram estudo com úlceras gástricas induzidas por aspirina em ratos e verificaram que a proteção da mucosa estomacal foi evidenciada pela redução no número de lesões, pequena dilatação de células gástrica, pequena perda da arquitetura da mucosa e tendência à esfoliação epitelial reduzida, quando comparados ao grupo com úlceras sem pré-tratamento. Estes resultados revelaram que a fucana da *F. vesiculosus* promoveu uma proteção significativa por proporcionar uma maior organização glandular e tendência de regeneração da mucosa (Choi, et al, 2010). O trabalho de Choi foi pioneiro na investigação da atividade gastroprotetora da fucana e os excelentes resultados nos encorajaram a investigar se a fucana extraída da

Sargassum cymosum, alga coletada na costa sul do Estado de Pernambuco, também apresentaria esta atividade. Além disso, expandiríamos o estudo avaliando além do estômago, o intestino dos animais uma vez que pode ocorrer a presença de úlcera duodenal.

Outra proposta sugerida no trabalho foi seguir a premissa de que a atividade farmacológica de biomoléculas pode ser potencializada através da encapsulação em sistemas de liberação controlada. Das várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos, os lipossomas despertam grande interesse para pesquisa, aplicações analítica e terapêutica (Torchilin, 2005; Batista et al, 2007). Essas vesículas são consideradas excelentes nanocarreadores devido a sua flexibilidade estrutural (tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica) bem como na sua capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, além de serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (Torchilin, 2005). Deste modo, os lipossomas foram os sistemas escolhidos para realização do trabalho.

Neste contexto, ressalta-se a riqueza deste manuscrito, uma vez que propõe o estudo da utilização de produtos naturais e a nanotecnologia para o desenvolvimento de novos sistemas com potencial utilização gastroprotetora.

Assim, o presente estudo teve como propósito experimental o desenvolvimento de formulações lipossomais contendo fucana, extraída da espécie *Sargassum cymosum*, e avaliação da atividade gastroprotetora na sua forma livre e encapsulada. Ressaltamos que não há relatos na literatura utilizando esta fucana na sua forma livre para a finalidade em questão, e nem na sua forma encapsulada.

2.4 Materiais e métodos

2.4.1 Material

As amostras da Fucana foram previamente extraídas e purificadas de algas marrons da espécie *Sargassum cymosium*, coletadas no litoral sul do estado de Pernambuco. A fosfatidilcolina de soja (PC) foi obtida da Lipoid, GmbH (Ludwigshafen, Germany). Colesterol (CH), estearilamina (SA), e trealose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). As soluções aquosas foram preparadas com água purificada obtida pelo sistema de purificação Human UP 900 (Human Corporation, Korea).

2.4.2 Preparação dos lipossomas contendo fucana

Lipossomas contendo fucana foram obtidos de acordo com o método de formação do filme lipídico, seguido de sonicação (Lira et al, 2009). Os lipídios, fosfatidilcolina de soja, o colesterol e a estearilamina (7:2:1, 42 mM) foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v) sob agitação manual, e em seguida os solventes foram retirados por rota-evaporação. O filme formado foi então hidratado com tampão fosfato pH 7,4 contendo fucana previamente solubilizada (1 a 2,0 mg/mL), para formação das vesículas lipídicas. Com objetivo de obter lipossomas na escala nanométrica, foi utilizada uma sonda Vibra Cell (BRANSON, USA) em 200 W e 50 Hz por 300s, para quebrar e conseqüentemente diminuir as vesículas até o tamanho desejado. Por fim, os lipossomas foram congelados a -80°C e liofilizados (EZ-DRY, FTS System, USA), com utilização da trealose como crioprotetor, e armazenadas a 4°C até utilização.

2.4.3 Caracterização dos lipossomas contendo fucana

2.4.3.1 Análise do tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga da superfície e pH

O diâmetro médio de partículas e o índice de polidispersão (PI), foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PSC) utilizando analisador de partícula a laser DelsaTM Nano-S a 25°C com ângulo de detecção de 90° (Beckman Coulter, UK). As amostras de lipossomas (100 μl) foram diluídas adequadamente em água ultrapurificada (300 μl) e em seguida realizada a análise.

A carga superficial (potencial zeta) dos lipossomas foi determinada através da mobilidade eletroforética pelo equipamento Zetasizer Ver. 6.20 (Malvern®, USA). As medidas foram realizadas a 25°C com dispersões de 50 μl da formulação lipossomas em 950 μl de água ultrapurificada. O pH dos lipossomas foi aferido utilizando um medidor de pH digital (Bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França) a temperatura ambiente

As análises foram realizadas em triplicada e os resultados obtido apresentados pela média \pm desvio padrão (DP).

2.4.3.2 Avaliação da estabilidade dos lipossomas

As formulações lipossomais contendo a fucana e sem a molécula (branca) foram submetidas a testes de estabilidade acelerada e após tempos pré-determinados (0, 7, 15, 30 dias) (Santos et al, 2000). Nestes testes, características físico-químicas dos lipossomas como aspecto macroscópico, tamanho de partícula, índice de polidispersão e variação de pH foram avaliadas. Para o teste de estabilidade acelerada, as formulações lipossomais foram submetidos à centrifugação a 6.000 rpm por 1h a 4 °C (KN-70 Centrifuge, Kubota, Japão) e ao estresse mecânico a 180 vibrações por min a 37 °C por 48h (Polytest® 20 Bioblock Scientific).

2.4.4 Estudo de lesões gastroduodenais induzidas em ratos wistar

2.4.4.1 Animais

Para os ensaios *in vivo* de úlceras gástricas foram utilizados 16 ratos machos *Wistar* pesando 200 a 300 g. Os animais foram mantidos em ambiente ventilado sob a temperatura controlada com ração e água *ad libitum*, permanecendo acondicionados em gaiolas plásticas (49x34x16), sob condições de controle de temperatura (22 ± 2 °C) e aclimatizados para um ciclo de 12:12h claro:escuro. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE (nº 23076.027465/2012-71).

Os animais foram marcados e separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (CP, CN, Fuc e Lipo-Fuc) com quatro (4) animais. O grupo CP (controle positivo) correspondendo aos animais que não foram induzidas as úlceras; o grupo CN (controle negativo) com úlcera e que receberam tratamento com carboximetilcelulose; o grupo Fuc e Lipo-Fuc (grupos tratados) referente aos animais que receberam o tratamento com fucana livre (20mg /kg/dia) e com a fucana nanoencapsulada em lipossomas (20mg /kg/dia), respectivamente, via oral, por gavagem.

2.4.4.2 Indução da úlcera

Após 14 (quatorze) dias de tratamento, foi induzida a úlcera gástrica nos animais de acordo com Choi e colaboradores (2010). Para indução da úlcera, os animais permaneceram em jejum durante 48h, em seguida receberam administração de ácido acetilsalicílico (200 mg/kg), em carboximetilcelulose, por gavagem.

2.4.4.3 Análises histopatológicas e histomorfométricas de estômago e duodeno de ratos

As análises histopatológicas foram realizadas no Centro Acadêmico de Vitória, no Laboratório de Biotecnologia e Fármacos.

Após quatro horas da indução da úlcera, os animais foram sacrificados por eutanásia com overdose do anestésico (Urethane 1,25 g/kg). O estômago e o duodeno foram coletados, clivados e imersos em uma solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução por 48 horas. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 4 μm . Finalmente, os cortes obtidos foram transferidos para lâminas untadas com albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, por 24 horas para secagem. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração por Alcian Blue e Hematoxilina-Eosina (H.E.).

As imagens histológicas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3.0) acoplada ao microscópio óptico (Nikon-E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 30 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.4.4.3.1 Análise da presença de muco

A análise do muco presente tanto no estômago como no intestino foi efetuada através de cortes corados com Alcian Blue em pH 1,0 e 2,5, específicos para sulfomucinas e sialomucinas/sulfomucinas, respectivamente. A análise foi realizada utilizando 60 campos de 100 μm x 100 μm , por grupo de animais, escolhidos aleatoriamente, utilizando a contagem automática do programa através da ferramenta de segmentação de cores. Finalmente os resultados foram obtidos a partir da área encontrada (μm^2).

2.4.4.3.2 Análise do epitélio glandular e vilosidades intestinais

Para análise do epitélio glandular e vilosidades intestinais a avaliação foi efetuada a partir de imagens dos cortes corados com HE. Nesta análise foram efetuadas 400 medidas do epitélio glandular do estômago e intestino, e 100 medidas das vilosidades intestinais, por grupo de animais, obtendo uma espessura epitelial em micrômetros (μm). As medidas do epitélio glandular do estômago foram realizadas da muscular da mucosa até a extremidade da glândula. Por outro lado, as medidas do intestino foram realizadas da muscular da mucosa até as criptas de Lieberkuhn encontradas nas bases das vilosidades, e a altura das vilosidades foram medidas a partir da sua região basal até a sua extremidade.

2.4.5 Análise estatística

Os resultados encontrados foram descritos pelo valor médio e respectivo desvio padrão. Foram adotados os testes *t*-Student pareado, bem como o de Kruskal-Wallis, para análise de variância, das mesmas variáveis, em todos os grupos. Todos os dados obtidos foram avaliados com programa estatístico SPSS.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1. Caracterização físico-química dos lipossomas contendo fucana

Lipossomas contendo fucana (Lipo-FUC) em diferentes concentrações foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico, seguido de sonicação. A concentração de 1 mg/mL foi escolhida uma vez que não apresentou precipitação da fucana, ao contrário das formulações contendo 1,5 e 2 mg/mL que apresentaram precipitados. Após preparadas, as formulações escolhidas apresentaram um aspecto leitoso, homogêneo e com reflexo azulado (efeito tyndall) típico de vesículas unilamelares pequenas.

O tamanho médio, o índice de polidispersão, pH e o potencial zeta podem ser observados na tabela 1. O tamanho médio das vesículas contendo fucana (Lipo-FUC) e lipossomas sem fucana (LB) foi $125,9 \pm 1,2$ e $125,1 \pm 0,3$ nm, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre elas. O índice de polidispersão do Lipo-FUC e LB foi de $0,39 \pm 0,02$ e $0,28 \pm 0,09$, respectivamente indicando que as formulações são monodispersas, uma vez que valores abaixo de 1 indicam

preparações homogêneas (Lapenda, 2010). Em relação ao pH, as formulações apresentaram valores próximos ao neutro (pH 7,35-7,45). Os valores de potencial zeta foram positivos, sendo $+41,5 \pm 1,0$ mV para os Lipo-FUC e de $+37,5 \pm 1,62$ mV para LB. O valor positivo dos lipossomas era esperado e é explicado pela constituição lipídica das vesículas, as quais contêm o lipídeo estearilamina de carga positiva. Segundo Tedesco e colaboradores (2007) quanto mais distante de zero, o valor indica estabilidade física do sistema, uma vez que promove repulsão eletrostática das vesículas. Geralmente, é almejado que o potencial zeta em suspensão seja em torno ou maior que 30 mV (positivo ou negativo), possibilitando que o sistema permaneça estável.

Tabela 1 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta de Lipossomas com e sem fucana.

Formulações	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	pH	Potencial Zeta (mV)
Lipo-FUC	$125,9 \pm 1,2$	$0,39 \pm 0,02$	$6,89 \pm 0,05$	$+41,5 \pm 1,0$
LB	$125,1 \pm 0,3$	$0,28 \pm 0,09$	$7,61 \pm 0,24$	$+37,5 \pm 1,62$

Lipo-Fuc = Lipossomas contendo fucana; LB = Lipossomas sem fármaco.

As suspensões lipossomais Lipo-FUC e LB foram submetidas aos testes de estabilidade acelerado, através de estresse mecânico e de centrifugação e em seguida o tamanho de partícula, o índice de polidispersão, o pH foram avaliados conforme pode ser verificado na Tabela 2. Observou-se que as formulações Lipo-FUC e LB mantiveram-se estáveis após o teste de simulação de transporte por agitação mecânica. Em relação ao teste de centrifugação, as formulações de Lipo-FUC apresentaram um aumento no tamanho de partícula, com um valor de $191,0 \pm 4,8$ nm, aumento esperado devido à ação da força da gravidade, não significando instabilidade nas formulações, uma vez que não foi observado presença de precipitação da fucana, presença de grumos ou separação de fases. Todas as formulações foram analisadas macroscopicamente observando-se características como homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, e separação de fases. Após análise, não foi observada nenhuma alteração na aparência visual permanecendo como uma suspensão branca leitosa com reflexo azulado.

Tabela 2 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH, de Lipossomas com Fucana, antes e após os testes de estresse mecânico e centrifugação.

Parâmetros	Lipo-Branco	Lipo-Fucana
Características iniciais	Ø: 125,1 ± 0,3 nm	Ø: 125,9 ± 1,2 nm
	PDI: 0,28 ± 0,09	PDI: 0,39 ± 0,02
	pH: 7,61 ± 0,24	pH: 6,89 ± 0,05
	AM: Estável	AM: Estável
Centrifugação (6000 r.p.m., por 1h a 4°C)	Ø: 149,55 ± 9,83 nm	Ø: 191 ± 4,8 nm
	PDI: 0,278 ± 0,01	PDI: 0,31 ± 0,01
	pH: 6,93 ± 1,48	pH: 7,29 ± 0,03
	AM: Estável	AM: Estável
Estresse mecânico (180 vibrações/min - 48h - 37°C)	Ø: 129,73 ± 46,59 nm	Ø: 130,1 ± 1,5 nm
	PDI: 0,351 ± 0,01	PDI: 0,30 ± 0,02
	pH: 6,92 ± 0,47	pH: 7,25 ± 0,05
	AM: Estável	AM: Estável

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; pH: Potencial hidrogênionico; AM: Análise macroscópica: homogeneidade, cor, viscosidade, deposição de materiais, formação de grumos, cremagem, floculação, coalescência e separação de fases.

Para os teste de estabilidade a logo prazo foram verificados o tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH das formulações após 0, 7, 15 e 30 dias (Tabela 3). A avaliação foi realizada através da ressuspensão dos líofilos de Lipo-FUC e LB com quantidade suficiente de tampão fosfato, para atingir as condições iniciais. Em todo o período, não foi verificada nenhuma alteração visual nas formulações. O índice de polidispersão não exibiu alteração significativa, apresentando um valor médio de 0,30, indicando que as formulações se mantiveram monodispersas. Já em relação ao pH houve uma variação de 6,89 ± 0,05 a 7,34 ± 0,07, não significando instabilidade para as formulações, uma vez que a maior preocupação está relacionada ao aumento da acidez que pode indicar degradação dos componentes da dos lipídeos presentes na bicamadalipídica (Tedesco, 2007). Em relação ao tamanho houve um aumento gradativo com o tempo, no entanto, permanecendo dentro da faixa nanométrica e não sendo fator limitante para administração por via oral.

Tabela 3 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH de Lipossomas com Fucana em tempos pré-determinados.

Intervalo (Dias)	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	pH
0	125,9 ± 1,2	0,39 ± 0,02	6,89 ± 0,05
7	148,4 ± 2,1	0,27 ± 0,03	7,12 ± 0,05
15	168,6 ± 4,5	0,30 ± 0,01	7,22 ± 0,05
30	139,1 ± 2,6	0,26 ± 0,02	7,34 ± 0,07

2.5.2. Estudo de lesões gastroduodenais induzidas em ratos *Wistar*

O procedimento realizado nos animais dos grupos experimentais controle e tratado transcorreu sem complicações, não ocorrendo óbitos nas avaliações diárias. Durante o período de pré-tratamento não foram observadas nenhum distúrbio gastrointestinal, como vômitos e/ou diarreia. Os animais demonstraram adequada presença de atividade física e disposição para se alimentarem em todos os grupos.

2.5.2.1 Análises histopatológicas e histomorfométricas do estômago de ratos

A análise do muco presente no estômago foi realizada pela coloração Alcian Blue em pH 1,0 para detecção de sulfomucinas e pH 2,5 para sulfomucinas e sialomucinas, conforme observado na Figura 2.1 . Segundo Gaudier e colaboradores (2010), o pH 1,0 revela mucinas ácidas com a presença de grupos sulfatos, já as sialomucinas detectam, além dos grupamentos sulfato, a presença do ácido siálico.

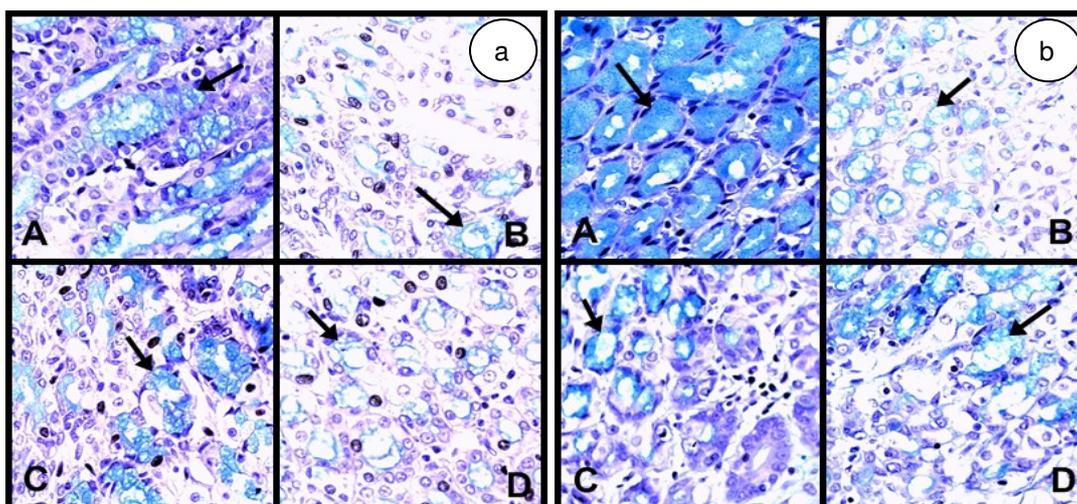


Figura 2.1 – Análise histomorfométrica da área contendo muco em epitélio glandular do estômago de ratos *Wistar*, apresentando (setas) células com muco (mucinas). **A** – Controle positivo (Sem úlcera), **B** – Controle negativo (com úlcera tratados com

carboximetilcelulose), **C** – Fucana livre, **D** – Lipo-Fucana. Alcian Blue (40X e 400X) pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b).

De acordo com os dados obtidos sobre a concentração de muco em pH 1,0, os animais com úlceras sem tratamento (controle negativo) apresentaram área com muco de $3,5 \pm 2,3 \mu\text{m}^2$ com uma pequena região com presença de muco, mostrando que houve modificação após indução da úlcera e conseqüentemente a mucosa gástrica ficou mais susceptível a danos epiteliais ou lesões agudas, ou ao pH ácido do estômago (Figura 2.1 (a)-B). Em relação ao grupo pré-tratado com a fucana livre, os animais permaneceram com uma média da área de muco semelhante ao grupo no qual não houve indução da úlcera ($7,5 \pm 4,5 \mu\text{m}^2$ e $9 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$, respectivamente) não apresentando diferença estatística entre eles ($p < 0,05$) como pode ser observado na figura 2.3. Este resultado sugere que a fucana, extraída da *Sargassum cymosum* promoveu uma preservação das células produtoras de muco, bem como, um aumento na sua produção, sendo demonstrada pela primeira vez esta ação (Fig. 2.1 (a) C e (a) A). De acordo com Lyra e colaboradores (2007), os polímeros, como os polissacarídeos, iniciam um processo de bioadesão ao muco, o qual é constituído principalmente por polissacarídeos e água, através de interações químicas como as ligações covalente e iônica, pontes de hidrogênio, forças de Wan der Wals e forças hidrofóbicas. Deste modo, sugere-se que como a fucana é um polissacarídeo ela pode ser capaz de difundir através da rede de muco que reveste o órgão aumentando a sua proteção.

Por outro lado, ao contrário do que se esperava, a fucana nanoencapsulada em lipossomas exibiu uma área ($2,6 \pm 1,6 \mu\text{m}^2$) similar ao grupo com úlcera não tratado (Fig. 2.3), não apresentando atividade antiulcerogênica esperada, ou mesmo a potencialização do efeito da fucana livre, sugerindo que possivelmente o composto não foi liberado a partir das vesículas no estômago. Estudos realizados *in vitro* simulando ambientes hostis, como o estômago (pH 2,0) demonstraram que os lipossomas constituídos de fosfatidilcolina e colesterol, encapsulando glicose, permaneceram estáveis nessas condições com um percentual de liberação de glicose de $9 \pm 5 \%$ em 120 minutos após a sua administração (Chiang, 1987). Por outro lado, estes dados vão de encontro com os apresentados recentemente nos trabalhos de Park e colaboradores (2011) que afirmam que os lipossomas convencionais constituídos principalmente por fosfolípidios e colesterol seriam propensos à desintegração devido aos efeitos do suco gástrico (Hu, 2013). Segundo Torchilin (2005), a administração oral dos lipossomas requer que eles sejam estáveis e que os lipossomas se movam a partir do intestino para o sangue, e só alí comecem a liberar o

fármaco. No presente estudo, os lipossomas contendo a fucana, foram utilizados com objetivo de realizar uma ação local, que fosse capaz de promover uma proteção da mucosa através de interação da fucana com os componentes da mucosa gastroduodenal, não sendo, portanto necessária a sua absorção.

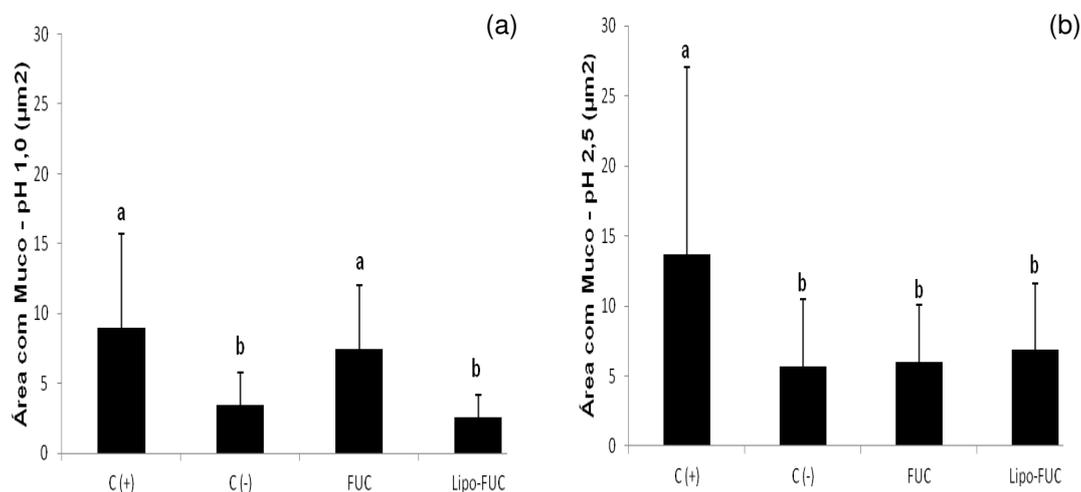


Figura 2.2 – Análise histomorfométrica da área contendo muco em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b) em epitélio glandular do estômago de ratos. **a** e **b** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), Teste *t*-Student pareado e Kruskal-Wallis.

Os resultados correspondentes as áreas com presença de mucinas em pH 2,5, mostraram que os animais sem úlcera apresentaram uma área de $13,7 \pm 13,4 \mu\text{m}^2$ (Fig. 2.1 (b) - A), diferentemente dos demais grupos que se comportaram de maneira semelhante e sem diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (Fig. 2.3). O grupo tratado com a fucana livre, a fucana nanoencapsulada, e o controle negativo, apresentaram uma área de $6,0 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$, $6,9 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$ e $5,7 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$, respectivamente (Fig. 2.1 (b) – B, C e D). Este fato pode ser explicado porque o pH 2,5 é utilizado para detecção de sialomucinas e sulfomucinas, que possuem características diferentes em sua estrutura química. Como a fucana é um polissacarídeo sulfatado, os seus grupamentos sulfatos podem interagir com as sulfomucinas, promovendo uma aumento específico em sua produção, como demonstrado nos resultados correspondentes ao pH 1,0, o que nos leva a perceber que a fucana pode ter exercido sim uma atividade gastroprotetora, no entanto o pH estudado não apresentou sensibilidade e especificidade para sulfomucinas (Lyra, 2007).

Para examinar os danos epiteliais causados na mucosa gástrica, a espessura do epitélio glandular foi medida (em micrômetros), traçando-se uma linha desde a região muscular da mucosa até a superfície epitelial. A média dessa área epitelial preservada foi analisada através de histomorfometria computadorizada, e os resultados obtidos exibidos na Figura 2.4. O epitélio normal (CP) apresentou uma média de espessura ou altura epitelial de $473,6 \pm 78,9 \mu\text{m}$, com manutenção das características normais de um epitélio (Figura 2.3 - A) que se renova periodicamente de 5 a 7 dias, com a presença de fossetas gástricas, e uma considerável área que protege as regiões mais internas da acidez estomacal, como a região muscular da mucosa e submucosa. Não foram visualizadas áreas de esfoliação epitelial, como resultado de lesões agudas.

Conforme observado na figura 2.4, todos os grupos apresentaram diferença estatística. No grupo Lipo-FUC foi observada uma espessura epitelial de $410,3 \pm 153,8 \mu\text{m}$ (Figura 2.3 – D), uma média inferior aos demais grupos. Nesse grupo foi observada uma intensa esfoliação do epitélio glandular, representativa de lesão aguda provocada pelo uso do ácido acetilsalicílico, indicando danos epiteliais. A redução na altura do epitélio glandular observada nos animais tratados com a fucana nanoencapsulada demonstra que a encapsulação do composto em lipossomas não favoreceu sua liberação no estômago, reforçando assim a hipótese de que, as vesículas lipídicas podem ter resistido ao pH ácido do estômago.

Os animais com úlcera não tratados (controle negativo) apresentaram uma média em espessura de $505,8 \pm 105,8 \mu\text{m}$. Mesmo com a presença de esfoliação epitelial, algumas áreas foram mantidas preservadas (Figura 2.3 - B). A manutenção de áreas livre de danos nesse grupo pode ser verificada possivelmente devido às propriedades da carboximetilcelulose, a qual é um polissacarídeo que foi utilizado neste trabalho como um veículo (agente solubilizante), para administração do ácido acetilsalicílico. Como a carboximetilcelulose apresenta elevada viscosidade, supomos que a mesma foi capaz de promover uma barreira física de proteção contra a esfoliação epitelial e acidez estomacal (Fujimoto et. al., 2002).

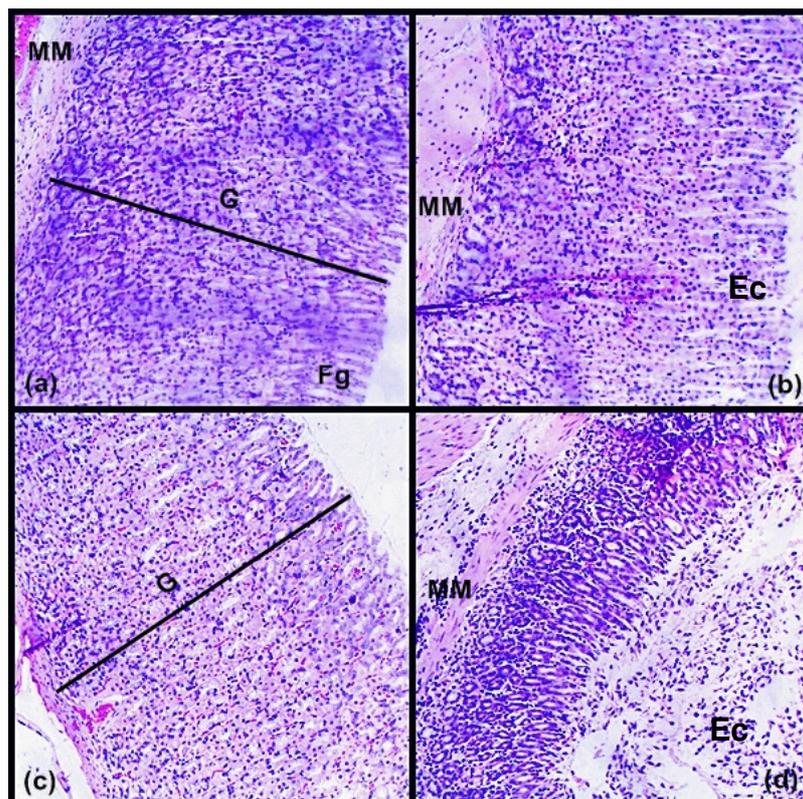


Figura 2.3 – Análise histopatológica e histomorfométrica da espessura do epitélio glandular do estômago de ratos wistar. **(a)** Controle positivo (Sem úlcera), **(b)** Controle negativo (com úlcera tratados com carboximetilcelulose), **(c)** Fucana, **(d)** Lipo-Fucana. **G** - Epitélio glandular, **MM** – Muscular da mucosa, **Ec** - Esfoliação celular, **Fg** - Fosseta gástrica. Coloração Hematoxilina-Eosina (40X e 400X).

Os animais tratados com a fucana livre apresentaram uma espessura epitelial de $547,6 \pm 86 \mu\text{m}$ (Fig. 2.4) média superior aos demais grupos tratados ($p < 0,05$) revelando sua ação gastroprotetora, ou seja, protegendo a mucosa estomacal das agressões ocasionadas pela ação do pH ácido, aumentando sua resistência a esse ambiente hostil, e mantendo sua estrutura organizada. Os dados apresentados estão de acordo com resultados descritos na literatura para a fucana extraída da *Fucus vesiculosus*. Em estudo semelhante, a atividade antiúlcera desta fucana foi observada por promover epitelização, organização celular, tendência de regeneração da mucosa e redução do tamanho da úlcera aguda (Choi et al., 2010).

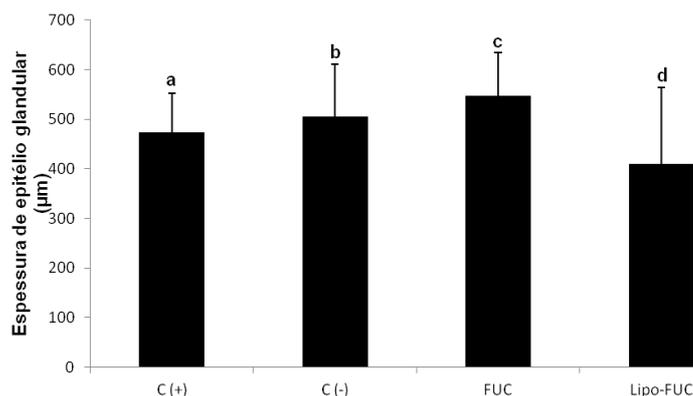


Figura 2.4 - Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular do estômago de ratos *Wistar*. **a**, **b**, **c** e **d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), Teste *t*-Student pareado e Kruskal-Wallis.

2.5.2.2 Análises histopatológicas e histomorfométricas do duodeno de ratos

A junção gastroduodenal é um local onde há grande incidência de úlceras pépticas, cerca de 80 %. É um sítio de digestão enzimática, liberação da bile e secreções pancreáticas, sendo de grande importância clínica e epidemiológica (Carvalho, 2011). Devido a essas características o duodeno dos animais foi retirado para análise, seguindo a mesma metodologia realizada para no estômago, a fim de analisar a influência da fucana livre e encapsulada quando exposta a esse ambiente. Foram analisados, portanto, a presença de muco (área), danos epiteliais e preservação do epitélio. Este estudo foi de grande importância para dispor de dados relacionados à ação da fucana no duodeno, uma vez que, até o momento, nenhum dado na literatura descreveu a ação da fucana nesta região.

As análises histopatológicas que avaliam a presença de muco no duodeno podem ser observadas na figura 2.5. As análises quanto à presença de sulfomucinas (pH 1,0) no duodeno revelaram uma área média de $7,52 \pm 2,42 \mu\text{m}^2$ para um epitélio normal, ou seja sem indução da úlcera, revelando a maior média entre os grupos, conforme observado na figura 2.6 ($p < 0,05$). O grupo CN (controle negativo) exibiu uma área de $6,00 \pm 3,17 \mu\text{m}^2$, o que sugere maior vulnerabilidade a possíveis lesões e menor ação protetora para a mucosa (Fig. 2.5 (a) - B). Os animais tratados com a fucana livre apresentaram área com presença de muco menor que aquela encontrada nos animais sem úlcera, mas maiores que os que não foram tratados (controle negativo). Os resultados sugerem que os animais deste grupo apresentaram uma ação gastroprotetora com uma área de muco correspondente a $6,43 \pm 1,82 \mu\text{m}^2$ (Fig.

2.5 (a) - C), enquanto o grupo referente a fucana encapsulada em lipossomas apresentou uma área de $6,62 \pm 1,31 \mu\text{m}^2$ (Fig. 2.5 (a) - D. De acordo com Park e colaboradores (2011) as vesículas lipídicas sofrem a ação dos sais biliares e enzimas pancreáticas se degradando e liberando o fármaco. Assim, nossos resultados indicam que possivelmente as vesículas lipídicas foram degradadas e o composto foi liberado no intestino, o que não foi observado no estômago, e que houve ainda uma potencialização do efeito da fucana no duodeno quando a mesma encontrava-se na forma encapsulada em lipossomas.

Deve-se também levar em consideração, que uma parte da fucana pode ter ficado no estômago, exercendo sua ação local, o que pode explicar os resultados inferiores apresentados pelo grupo tratado com a fucana livre, uma vez que uma parte do fármaco pode ter permanecido aderida na mucosa gástrica. O mesmo pode ser relacionado ao grupo Lipo-FUC, no entanto, sua ação foi mais efetiva devido a provável degradação das vesículas lipídicas nesta região, e conseqüentemente, liberação do composto para executar sua ação, revelando ação significativa da fucana também no duodeno, tanto de sua forma livre, quanto encapsulada.

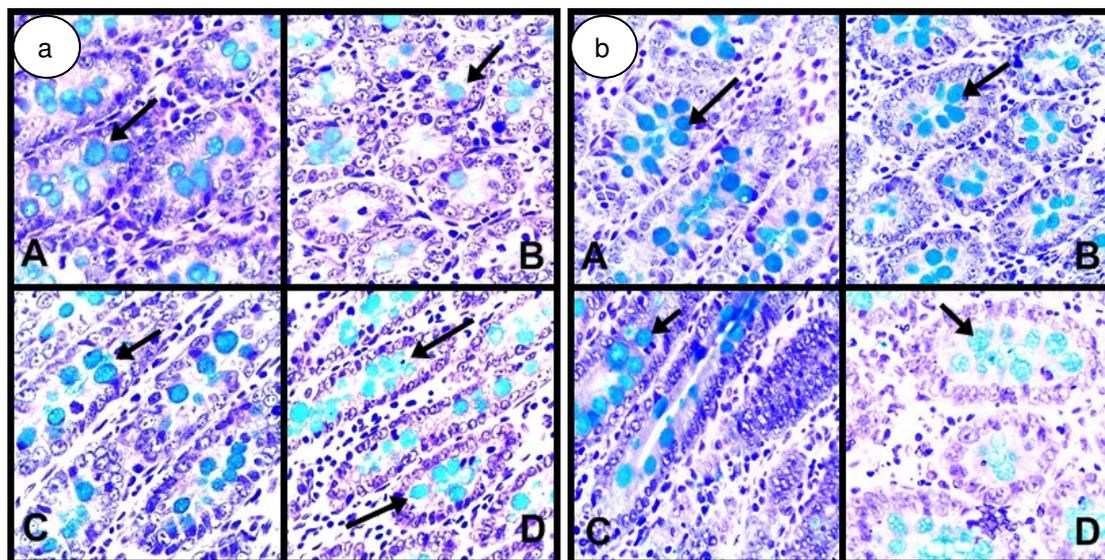


Figura 2.5 – Análise histomorfométrica da área de muco em epitélio glandular do estômago de ratos *Wistar*, apresentando (setas) células com muco (mucinas). **A** – Controle positivo (Sem úlcera) **B** – Controle negativo (com úlcera tratados com carboximetilcelulose), **C** – Fucana livre, **D** – Lipo-Fucana. Alcian Blue (40X e 400X) pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b).

Em relação à detecção de sialomucinas e sulfomucinas em pH 2,5, o grupo com úlcera não tratado (controle negativo) apresentou uma área média com muco de

8,42 ± 3,42 μm^2 (Fig. 2.5 (b) - B) e o grupo controle positivo (sem úlcera) 9,5 ± 4,37 μm^2 (Fig. 2.5 (b) - A). Os grupos tratados com a fucana apresentaram uma média inferior aos grupos citados acima, o que já poderia ser esperado devido ao tipo específico de muco que a fucana poderia aumentar a produção, como foi detectado no pH 1,0 com as sulfomucinas, bem como a quantidade de muco que pode ser liberada de acordo com a lesão na mucosa. Com isso, a fucana livre apresentou uma média de 6,95 ± 2,56 μm^2 e a fucana nanoencapsulada de 7,88 ± 2,67 μm^2 (Fig. 2.5 (b) – C e D, respectivamente) tal resultado reforça os dados encontrados na análise das mucinas em pH 1,0 que nos leva a indicar que uma ação mais efetiva da fucana encapsulada em lipossomas ocorreu no intestino, quando avaliados pela área de muco. Os dados estatísticos revelam que todos os grupos foram diferentes entre si ($p < 0,05$) (Fig. 2.6 (b))

A produção de muco no duodeno é realizada pelas glândulas de Brunner ou glândulas duodenais, que são glândulas tubulares, ramificadas e enoveladas. Essas glândulas atravessam a muscular da mucosa e a lâmina própria, e os ductos abrem-se entre as glândulas de Lieberkühn. A secreção glicoproteica das glândulas de Brünner protege a mucosa do duodeno contra a acidez do quimo e permite um pH ideal para a ação das enzimas pancreáticas (pH 8,2 a 9,3) (Kierszenbaum, 2008). Sendo assim, quanto maior a preservação dessa área consequentemente há uma maior proteção do órgão, o que foi evidenciado através da ação da fucana.

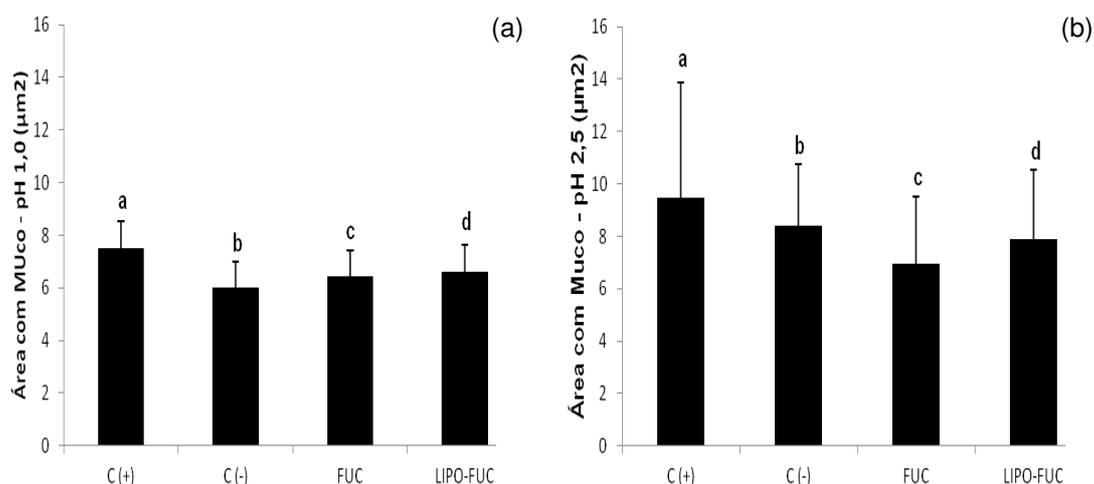


Figura 2.6 – Análise histomorfométrica da área contendo muco muco em epitélio glandular do duodeno de ratos *wistar*, em Alcian Blue pH-1,0 (a) e pH-2,5 (b). **a, b, c e d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), Teste *t*-Student pareado e Kruskal-Wallis.

Para análise da mucosa intestinal além do epitélio glandular, as vilosidades intestinais foram medidas e analisadas para investigação de danos epiteliais e preservação do epitélio. As vilosidades intestinais são evaginações digitiformes da mucosa, com 0.5 a 1.5 mm de altura, dispostas lado a lado e regularmente ao longo de toda a superfície interna do intestino delgado com uma densidade de 15 a 40 por mm^2 , com função de aumentar a superfície de contato para uma maior absorção de água e nutrientes (Carlos, 2006).

As análises histopatológicas avaliando a espessura do epitélio glandular e das vilosidades intestinais no duodeno podem ser observadas na figura 2.7 e 2.8. A fucana livre promoveu nos animais uma extensão do epitélio glandular com uma média de $405,45 \pm 167,08 \mu\text{m}$, seguidos do controle negativo (CN – $321,90 \pm 95,23 \mu\text{m}$) e dos lipossomas com fucana ($289,09 \pm 95,99 \mu\text{m}$). A fucana livre apresentou uma ação mais evidente, quando comparada com a fucana encapsulada em lipossomas, no entanto, ambas exerceram uma ação antiúlcera (Figura 2.7 (c), (b) e (d), respectivamente).

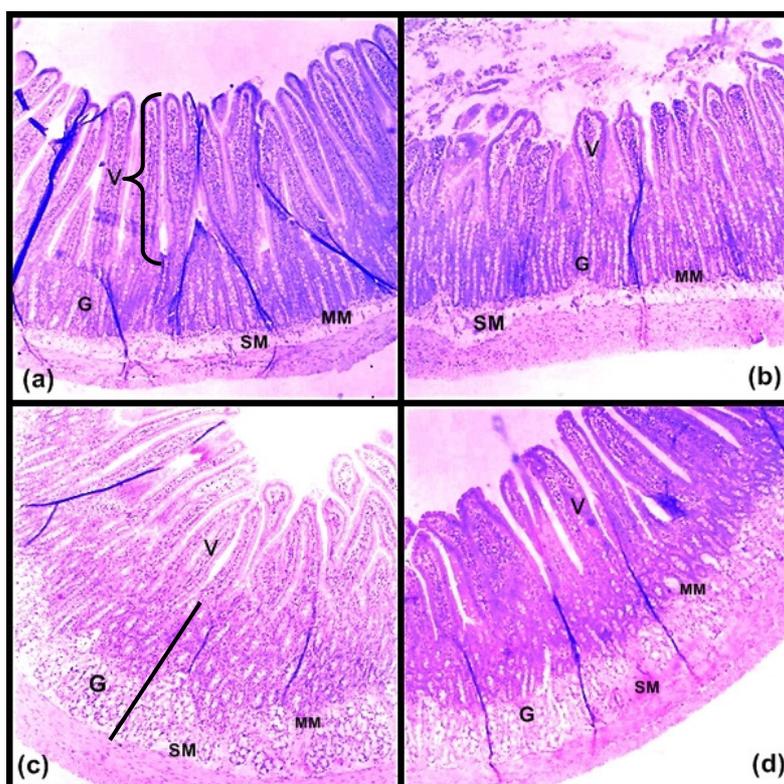


Figura 2.7 – Análise histopatológica e histomorfométrica da área (μm) de epitélio glandular do duodeno de ratos *wistar*. **(a)** – Controle positivo (Sem úlcera), **(b)** – Controle negativo (com úlcera tratados com carboximetilcelulose) **(c)** – Fucana, **(d)** –

Lipo-Fucana. **G** – Epitélio glandular, **MM** – Muscular da mucosa, **SM**- submucosa, **V** – Vilosidade intestinal. Coloração Hematoxilina-Eosina (40X e 400X).

Os animais sem úlcera (CP) apresentaram uma espessura glandular inferior aos demais grupos, com uma altura epitelial de $234,26 \pm 24,09 \mu\text{m}$ (Fig. 2.7 (a)), podemos inferir através do resultado que os grupos previamente tratados promoveram um crescimento epitelial e supostamente atenuaram o processo de renovação celular, com isso, mantiveram uma espessura epitelial preservada no duodeno, conferindo maior proteção a danos, bem como, como maior tendência para regeneração. Os dados estatísticos revelaram que as médias foram diferentes entre os grupos ($p < 0,05$) (Fig. 2.8 (a)).

Em relação à análise das vilosidades intestinais, os animais do grupo controle positivo apresentaram uma média de altura das vilosidades intestinais de $529 \pm 94,21 \mu\text{m}$, com características de preservação epitelial com uma grande densidade de vilosidades intestinais, pequena quantidade de células calciformes, pequena quantidade de células de Paneth na base das criptas de Lieberkhün e glândulas de Brunner na submucosa (Figura 2.7 (a) e 2.8b).

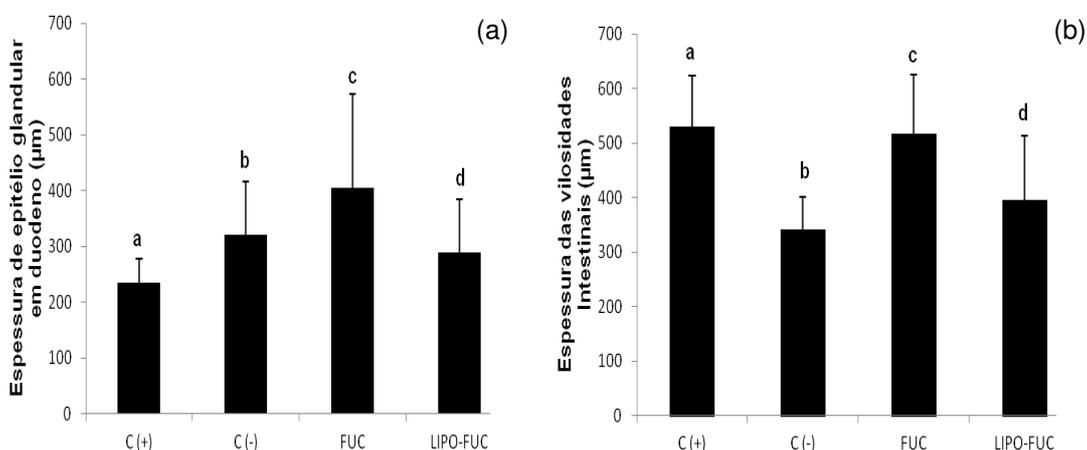


Figura 2.8 - Análise histomorfométrica da espessura (μm) do epitélio glandular (a) e vilosidades duodenais (b) de ratos *wistar*. . **a**, **b**, **c** e **d** são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), Teste *t*-Student pareado e Kruskal-Wallis.

O grupo tratado com a fucana livre conferiu uma maior proteção das vilosidades intestinais, bem como, de seu epitélio de revestimento, com uma espessura média de $517,30 \pm 108,6 \mu\text{m}$ (Fig. 2,7 (c) e 2.8 (b)) com características bem

semelhantes de um epitélio normal. A fucana encapsulada em lipossomas exerceu uma atividade citoprotetora com uma extensão média de $395,53 \pm 118,64 \mu\text{m}$, no entanto, inferior ao grupo com o composto livre, mas superior ao grupo referente ao controle negativo, o qual apresentou uma área de $314,10 \pm 59,71 \mu\text{m}$ (Figura 2.7 (d) e (b), respectivamente).

Segundo Ichikawa e colaboradores (2002) a integridade das vilosidades intestinais e mucosa duodenal é uma importante barreira para entrada de microorganismos. A hipoproliferação celular e hipoplasia da mucosa são comumente associadas à disfunção da via digestória, modificação do tipo de mucinas secretadas, danos epiteliais e maior susceptibilidade a infecções e lesões.

De posse dos resultados, os dados corroboram para uma hipótese consistente do efeito protetor da fucana extraída da *Sargassum cymosum*, no trato gastrointestinal, pela maior produção de muco, preservação do tecido epitelial glandular e das vilosidades intestinais.

2.6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que os lipossomas contendo a fucana, obtidos através da técnica de hidratação do filme lipídico, permaneceram estáveis de acordo com os testes de estabilidade sem apresentar alterações macroscópicas. A fucana extraída da alga *Sargassum cymosum* apresentou atividade gastroprotetora e antiúlcera significativa, evidenciada pelo aumento da quantidade de mucinas, diminuição de danos epiteliais quando expostos à ambiente de elevada acidez, representadas pela manutenção da mucosa com áreas do epitélio glandular no estômago e intestino, e vilosidades intestinais com características histológicas de um epitélio normal.

Quando encapsuladas em lipossomas, a fucana apresentou uma melhor ação no duodeno, sugerindo que as vesículas lipídicas resistiram ao pH ácido estomacal, e ao chegarem no duodeno, supostamente sofreram a ação do suco pancreático e sais biliares, sendo degradadas, podendo assim efetuar sua ação citoprotetora local. Inclusive apresentado uma quantidade de muco superior ao grupo tratado com a fucana livre, podendo sugerir, a potencialização seu efeito.

2.7 AGRADECIMENTOS

Agradecimento à CAPES pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de pós-graduação em nível de Mestrado e pelo financiamento do projeto.

2.8 REFERÊNCIAS

1. ADHIKARI, U.; MATEU, C. G.; CHATTOPADHYAY, K.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytoche*, v. 67, p. 2474–2482, 2006.
2. BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 43, p 167-179, 2007.
3. BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicles characterization and in vivo behavior. *Biochim. Biophys. Acta – Biomem.*,v.1196, p. 65-75, 1994.
4. BRUNNER e SUDDARTH. *Tratado de Enfermagem Médico Cirúrgica – 9ª Edição*, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara / Koogan, 2005.
5. CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries. *J. Pharm. Sci.*, v.85, p. 530-536, 1996.
6. CARLOS, J. Estudo morfológico e morfométrico de intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos a dieta enteral contendo prebióticos e contaminadas por *Klebsiella pneumoniae*. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e estrutural. Universidade Federal de Viçosa, 2006.
7. CARVALHO, C. A.; FERNANDES, K. M.; MATTA, S. L. P.; SILVA, M. B.; OLIVEIRA, L. L.; FONSECA, C. C. Evaluation of antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage) on *wistar* rat gastric ulceration. *Arq Gastroenterol.*, v. 48, n. 4, dez. 2011.
8. CAVATI, B.; FERNANDEZ, V. O. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno – Linhagens, Estado do Espírito Santo, Brasil: variação espacial e temporal. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.*, v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.
9. CHIANG, C., WEINER, N. Gastrointestinal uptake of liposomes. I: *in vitro* and *in situ* studies. *Int. J. Pharm.*, v. 37, p. 75–85, 1987.
10. CHOI, J.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNG, N.; KIM, J.; CHUN, B. S.; AHN, D. H.; CHOI, H.; KANG, K; LEE, J. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. *Chem-Biol. Inter.*, v. 183, n. 2010, p.249–254, 2009.
11. COLA, M. M; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA, L. C.A.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. *Biota Neotrop.* Dec vol. 6, n. 3, 2006.
12. COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CAMARA, R. B. G., et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. and Pharma.*, v. 64, p. 21–28, 2010.

13. FUJIMOTO, J.; REIS, E.A.O.; PETRI, D. F. S.. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. *Quim. Nova.*, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.
14. GAUDIER E.; R. M.; B. M.P.; R. I.; H. C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol. Res.*, v. 58, n.1, p. 111-9, 2008.
15. HIDARI, K.I.P.J.; TAKAHASHI, N.; ARIHARA, M.; NAGAOKA, M.; KOICHI, M.; TAKAHASHI, S. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Bioc. And Biophy. Res. Comm.*, v. 376, p. 91-95, 2008.
16. HU,S.; NIU,M.; HU ,F.; LU, Y.; QI, J.; YIN, Z.; WU, W. Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media. *Inter. J. of Pharm.*, v. 441, p. 693 – 700, 2013.
17. ICHIKAWA, H.; SHINEA. R. Gastric or retal instillation of shot-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats. *Digest. Dise. and Scie.* v. 47, n. 5, p. 1141-1146, 2002.
18. LAPENDA, T.L.S.; MORAIS, W.A.; MACIEL, M.A.M.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Validation of an UV spectrophotometric method for determining trans-dehydrocrotonin in inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Anal. Letter.*, 2010.Submetido.
19. LYRA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.,;BRASILEIRO, M.T.; ROCA, M.F.L.; BARRAZA, J.A.; VIANA O.S.; ROLIM-NETO P.J.. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivospara Liberação Controlada de Fármacos. *Latin. Ameri. J. of Phar.* v. 26 (5), p. 784-93, 2007.
20. KIERSZENBAUM, A. L. *Histologia e Biologia celular: uma introdução à Patologia.* 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.433-488, 2008.
21. KUTTY, K.; SCHAPIRA, R. M.; RUISWYK, J. V.; KOCHAR, M. S.; Úlcera péptica. In: *Tratado de Medicina Interna.*, Rio de Janeiro, Guanabara-koogan, p. 398-400, 2005.
22. MARZIO, L. D.; ESPOSITO, S.; RINALDI, F.; MARIANECCI, C.; CARAFA, M. Polysorbate 20 vesicles as oral delivery system: In vitro characterization. *Coll. and Surf. B: Bioin.*, v. 104, p. 200–206, 2013.
23. NEW, R. R. C. *Liposomes: A practical approach.* Oxford: IRL/ Oxford University Press. p.432, 1990.
24. PARMENTIERA, J.; THEWES, B.; GROPP, F.; FRICKER, G. Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. *Inter. J. of Pharm.*, v. 415, p. 150– 157, 2011.
25. PARMENTIERA, J.; BECKER, M.M.M.; HENTZ, U.; FRICKER, G. Stability of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids in simulated gastrointestinal fluids. *Inter. J. of Pharm.*, v. 405, p. 210–217, 2011.
26. PARK, K.; KWON, I.C.; PARK, K. Oral protein delivery: current status and future prospect. *React. Funct. Polym.*, v. 71, p. 280–287, 2011.

27. ROCHA DE SOUZA, M. C.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; FERREIRA DA SILVA, F. R.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulphated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. of App. Phyco.*, v. 19, p. 153–160, 2007.
28. ROWLAND, R.N., WOODLEY, J.F. Uptake of free and liposome-entrapped ¹²⁵I-labelled PVP by rat intestinal sacs in vitro: evidence for endocytosis. *Biosci. Rep.*, v.1, p. 399–406, 1981.
29. ROWLAND, R.N., WOODLEY, J.F. Uptake of free and liposome-entrapped insulin by rat intestinal sacs in vitro. *Biosci. Rep.*, v.1, p. 345–352, 1981.
30. SANTOS, M. N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, v. 208, p. 71-80, 2000.
31. TEDESCO, A.C.; SIMIONI, A.R.; PRIMO, F.L. Introdução a tecnologia. In: MORALES, M.M. *Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada á saúde*. Rio de Janeiro, Ed. Atheneu, p. 237-264, 2007.
32. TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Rev. Drug Disc.*, v. 4, p. 145-160, 2005.
33. WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. of Biol. Macro.*, v. 42, p. 127–132, 2008.
34. WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbo. Polym.*, v. 84, p. 4 - 21, 2011.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi descrito pela primeira vez estudos *in vivo* relacionados à ação gastroprotetora da Fucana, extraída da alga *Sargassum cymosum*, na sua forma livre bem como encapsulada em lipossomas. Ademais, a ação de fucanas na região do duodeno, até o momento, não foi descrita na literatura.

As formulações lipossomais preparadas através da técnica de hidratação de filme lipídico apresentaram-se estáveis, permanecendo na escala nanométrica e monodispersas após testes de estabilidade.

As análises histológicas foram fundamentadas na avaliação dos mecanismos protetores da mucosa do trato gastrointestinal, como a presença de muco, espessura de tecido glandular do estômago e intestino, e espessura das vilosidades intestinais, bem como, avaliação dos possíveis danos à mucosa.

A fucana quando administrada da sua forma livre apresentou uma efetiva proteção à mucosa do trato gastrointestinal contra danos provocados por ação de ácidos. Houve um aumento na produção e quantidade de muco, uma proliferação da área de epitélio glandular no estômago e intestino, bem como sua preservação, e uma área de vilosidades intestinais superior nos animais pré-tratados com a fucana, quando comparadas aos outros grupos. Esses resultados fornecem subsídios para novas pesquisas utilizando esta fucana como alternativa promissora na proteção contra úlceras gástricas e duodenais.

Por outro lado, a fucana na forma encapsulada apresentou ação gastroprotetora e antiúlcera menos eficiente. No entanto, sua ação foi mais significativa no duodeno, levando a hipótese de que os lipossomas resistiram ao pH ácido do estômago e foram capazes de atuar no duodeno após sofrerem a ação do suco pancreático e sais biliares.

Os resultados obtidos nos encorajam a utilizar a fucana livre e encapsulada em outros estudos para esclarecimento do comportamento mais detalhado no trajeto do tratogastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I.R.; QUEIROZ, K. C.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H.A. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 2, p. 167-171, 2004.
- ANDRADE, C.A.S., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., NASCIMENTO, S.C., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 278, p. 435-445, 2004.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J.R. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. São Paulo: Artmed, p. 775, 2007.
- ARAÚJO, A.R.; Expresso Lipossoma: Farmácia propõem uso de nanopartículas para levar fármacos a áreas afetadas por tumores. **Boletim Informativo UFMG** [Online][acesso 2006 out.11], v. 1503(32), p.24-31, 2005. Disponível em: <http://www.ufmg.br/boletim/bol1503/sexta.shtml>.
- AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, A. G.. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **J. of Sau. Chem. Soc.** 2012. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.03.002>.
- BAGATTOLI, L. A.; Gratton, E.; **Biophys. J.**, v 79, p. 434, 2000.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, p 167-179, 2007.
- BERSTAD, K.; BERSTAD, A. *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease. **Scand J. Gastroentero.**,v. 28, p. 561-7, 1993.
- BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Dru. of the Fut.**, v.20, p.1237-1249, 1995.
- BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicles characterization and in vivo behavior. **Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.**, v.1196, p. 65-75, 1994.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p. 530-536, 1996.
- CARLOS, J. **Estudo morfológico e morfométrico de intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos a dieta enteral contendo prebióticos e contaminadas por *Klebsiella pneumoniae***. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e estrutural. Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- CARVALHO, C. A.; FERNANDES, K. M.; MATTA, S. L. P.; SILVA, M. B.; OLIVEIRA, L. L.; FONSECA, C. C. Evaluation of antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage) on *wistar* rat gastric ulceration. **Arg Gastroenterol.**, v. 48, n. 4, dez. 2011.

CAVATI, B.; FERNANDEZ, V. O. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno – Linhagens, Estado do Espírito Santo, Brasil: variação espacial e temporal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences.**, v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.

CHIANG, C., WEINER, N. Gastrointestinal uptake of liposomes. I: *in vitro* and *in situ* studies. **Int. J. Pharm.**, v. 37, p. 75–85, 1987.

CHIANG, C., WEINER, N. Gastrointestinal uptake of liposomes. II: *in vivo* studies. **Int. J. Pharm.**, v. 40, p. 143–150, 1987.

CHOI, J.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNG, N.; KIM, J.; CHUN, B. S.; AHN, D. H.; CHOI, H.; KANG, K; LEE, J. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. **Chem-Biol. Inter.**, v. 183, n. 2010, p.249–254, 2009.

CHRISTENSEN ,D.; FOGED, C.; ROSENKRANDS, I.; NIELSEN, H.M.; ANDERSEN, P.; AGGER, E.M. Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1768, p. 2120– 2129, 2007.

COLA, M. M; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA, L. C.A.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotrop.**, vol. 6, n. 3, Dec , 2006.

COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., CORDEIRO, S. L., OLIVEIRA, R. M., SABRY, D. A., CÂMARA, R. B. G., Nobre, L. T. D. B., COSTA, M. S. S. P., ALMEIDA-LIMA, J., FARIAS, E. H. C., LEITE, E. L., ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed. Pharmacot.**, v. 64, p. 21–28, 2010.

COSTA, M.; BROOKES, S.J.H. The enterical nervous system. **Am. J. Gastroenterol.**, v.89, p.S129-S137, 1994.

CRUZ, M. E. M.; **Bol. Biotecnol.**, v. 58, p. 3, 1997.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Ver. Bras. de Farmacog.**, v. 19(1B), p. 309-314, Mar, 2009.

DIETRICH, C.P.; Dietrich, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v. 70(2), p. 645-647, 1976.

DOKMECI, D.; AKPOLAT, M.; AYDOGU, N.; DOGANAY, L.; TURAN, F.N. Carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Pharma. Rep.**, v. 57, p. 481–488, 2005.

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M. BACCHI, E. M.; **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 19(1A), p. 89-94, Mar, 2009.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J. of Biol. Chem.**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERREIRA, L.A. **Desenvolvimento e avaliação da atividade anti-inflamatória de preparações tópicas contendo nimesulida**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

FILIFE, M.I. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. **Inv. Cel. Pathol.**, v.2, n. 3, p. 195-216, 1979.

FLORENCE A.T.; ATTWOOD D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, p. 534-542, 2003.

FONSECA, R.J.C., OLIVEIRA, S.N.M.C.G., MELO, F.R., PEREIRA, M.G., BENEVIDES, N.M.B.; MOURÃO, P.A.S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb. Haemost.**, v. 99(3), p. 539-545, 2008.

FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 372, p. 79–87, 2005.

FRÉZARD F., SCHETTINI D.A., ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI C. Lipossomas: propriedades físico químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim Nova**, v. 3, p. 511-8, 2005.

FUJIMOTO, J.; REIS, E.A.O.; PETRI, D. F. S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.

GAUDIER E.; R. M.; B. M.P.; R. I.; H. C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol. Res.**, v. 58, n. 1, p. 111-9, 2008.

GLAVAS-DODOVA, M.; FREDRO-KUMBARADZIA, E.; GORACINOVAA, K.; SIMONOSKAA, M.; CALISB, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKAA, S.; HINCALB, A.A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. **Int. J. Pharm.**, v. 291, p. 79–86, 2005.

GLICKSMAN, M. Food hydrocolloids: natural plant exudates – seaweed extracts. Baton Raton: CRC Press, 1983.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B.E.; **FEBS Lett.** v.14, p. 95, 1971.

GOLD, D.V.; S. D.; M. F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **J. Biol. Chem.**, v. 25, n. 256(12), p. 6354-8, 1981.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C; BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb. Res.** v.100, p.453-459, 2000.

HELMKE, C.D. Wound Healing – part 1. **Inter. J. of Pharm. Comp.** v. 8, n.4, p.269 – 274, 2004.

HU,S.; NIU,M.; HU ,F.; LU, Y.; QI, J.; YIN, Z.; WU, W. Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media. **Inter. J. of Pharm.**, v. 441, p. 693– 700, 2013.

ISRAEL, A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. **Inter. J. of Pharm. Comp.** v.7, n.3, p.176 – 178, 2003.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorg. and Med. Chem.**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JULIANO, R. L.; Trends Pharmacol. **Sci.** v. 39, Feb., 1981.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia celular: uma introdução à Patologia.** 2ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p.433-488, 2008.

KUTTY, K.; SCHAPIRA, R. M.; RUISWYK, J. V.; KOCHAR, M. S.; Úlcera péptica. In:**Tratado de Medicina Interna.**, Rio de Janeiro, Guanabara-koogan, p. 398-400, 2005.

KUTCHAI, H. C. Gastrointestinal System. In: **Princ. of Phys.**, Ed. By R. M. Berneand M. N. Levy, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, USA, p. 437-498.1996.

LAPENDA, T.L.S.; MORAIS, W.A.; MACIEL, M.A.M.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Validation of an UV spectrophotometric method for determining trans-dehydrocrotonin in inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Anal. Letter**, 2010.Submetido.

LI, B.; WEI, X. J.; SUN, J. L.; XU, S. Y. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, Hizikia fusiforme. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1135-1146, 2006.

LICHTENBERG, D.; Barenholz, Y.; **Methods Biochem. Anal.**, v. 33, p. 337, 1988.

LIMA, J. A. **Análise toxicological *in vitro* e *in vivo* de uma fucana antitrombótica da alga marrom spatoglossum schfoederi.** Dissertação mestrado. Programa de pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do rio Grande do Norte, 2009.

LIRA, M.C.B.; SIQUEIRA-MOURA,M.P.; ROLIM-SANTOS, H.M.; GALETTI, F.C.; SIMIONI, A.R.; SANTOS, N.P.; TABOSA DO EGITO, E.S.; SILVA, C.L.; TEDESCO, A.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **J. Liposome Res.**, v. 19, p.49-58, 2009.

LYRA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.;BRASILEIRO, M.T.; ROCA, M.F.L.; BARRAZA, J.A.; VIANA O.S.; ROLIM-NETO P.J.. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivospara Liberação Controlada de Fármacos. **Latin. Amer. J. of Pharm.**, v. 26 (5), 2007.

MARZIO, L.D.; ESPOSITO, S.; RINALDI, F.; MARIANECCI, C.; CARAFA, M. Polysorbate 20 vesicles as oral delivery system: In vitro characterization. **Col. and Surf. B: Bioint.**, v. 104,p. 200– 206, 2013.

MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. **Cur. Med. Chem.**, v. 2, p. 13–19, 2004.

MOURÃO, S. C., COSTA, P. I., SALGADO, H. R. N., GREMIÃO, M. P. D. Improved of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholinecontaining liposomes. **Inter. J. Pharm.** v. 295, p. 157-162, 2005.

MULLOY B.; MOURÃO P. A. S.; GRAY E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. of Biotechnol.**, v.77, p.123-135, 2000.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbo. Poly.**, 2008.

NEW, R.R.C. Liposomes: A practical approach. **IRL/ Oxford University Press, Oxford**, p.432, 1990.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. **Thromb. Res.**, v. 64, p.723–731, 1991.

NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUMO, T.; SUZUKI, H. Effects of fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. **Thromb. Res.**, v. 99, p. 623–634, 2000.

OLINDA, T.M. **Atividade gastroproptetora do 2-O-metil-L-inisitol isolado de *Magonia Glabrata* St. Hill: Possíveis Mecanismos.** Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em farmacologia. Universidade Federal do Ceará. 2008.

PAPAHADJOPOULOS, D.; ALLEN, T.M.; GABIZON, A. ;MAYHEW, E.; MATTHAY, K.; HUANG S.K. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88(24), p.11460-4, Dec, 1991.

PARMENTIERA, J.; THEWES, B.; GROPP, F.; FRICKER, G. Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes. **Inter. J. of Pharm.**, v. 415, p. 150– 157, 2011.

PARMENTIERA, J.; BECKER, M.M.M.; HENTZ, U.; FRICKER, G. Stability of liposomes containing bio-enhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. **Inter. J. of Pharm.**, v. 405, p.210–217, 2011.

PARK, K.; KWON, I.C.; PARK, K.. Oral protein delivery: current status and future prospect. **React. Funct. Polym.**, v. 71, p. 280–287, 2011.

PAVÃO, M. S.; AN. ACAD. BRAS. **Cl.**, v. 74, p. 105. 2002.

PENGZHAN, Y.;QUANBIN, Z.; NING, L.;ZUMONG, X.; YANMEI,W; ZHIEN, L. Polysacharydes from *Ulva pertusa* (clorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemie activity. **J. Appl. Phycol.**, v.15, p. 21-27, 2003.

PERCIVAL, E. G. V., MC DOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.** London: Academic Press, p.219, 1967.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carb. Rese.**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PINTO, J. F.E.; B. C.T.; M. A. C.; O. A.J.; J. S. M. B. H.M. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. **Acta. Cir. Bras.**, v. 22, n. 3, p. 195-201, 2007.

PRISTA, L.V.N.; ALVES A.C.; MORGADO R.M.R.; **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

RIOS, E. R. V. **Efeitos farmacológicos da esculina em modelos animais de lesão gástrica e possíveis mecanismos envolvidos**. Dissertação (mestrado), programa de pós-graduação em farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

ROCHA, H. A.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schoroederi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Bras. J. Biol. Res.**, v. 34, n.5, p. 621-626, 2001.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Ver. Ciên. Agro.**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009.

ROWLAND, R.N., WOODLEY, J.F. Uptake of free and liposome-entrapped 125Ilabelled PVP by rat intestinal sacs in vitro: evidence for endocytosis. **Biosci. Rep.**, v.1, p. 399–406, 1981.

ROWLAND, R.N., WOODLEY, J.F. Uptake of free and liposome-entrapped insulin by rat intestinal sacs in vitro. **Biosci. Rep.**, v. 1, p. 345–352, 1981.

SANTOS NC. Castanho MARB. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quim Nova.**,v. 25, p.1181-5, 2002.

SANTOS, M. N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Curr. Drug. Deliv.**, v. 2(4), p. 369-81, Oct., 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D. A.; Control of gastric acid secretion in health and disease . **Gastroenterol.**, v.134, n.7, p. 1842-1860, 2008.

SILVA, J. L.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; SILVA, G. D. F.; FILHO, S. A. V. FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C. A.; **Ver. Bras. de Farmac.**, v. 15(1), p. 30-35, Mar., 2005.

SILVA, L.M. **Mecanismos de ação envolvidos no efeito Gastroprotetor do extrato etanólico de *arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzida por ácido Acético em ratos**. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

SINKO, J.; MARTIN, J **Físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. São Paulo: Editora Artmed, p. 809, 2008.

SOARES, C. L. S.; PEREZ,C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S.; MELO, L. F. A.. **Ver. Bra. Farmac.**,v.16(4),p. 463-468, 2006.

SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1497, n. 1, p. 127-134, 2000.

SZE, P. **A biology to the algae**. New York: McGraw- Hill, 1997.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug. Disc.**, v. 4, p. 145-160, 2005.

USTER, P.S.; ALLEN, T.M.; DANIEL, B.E.; MENDEZ, C.J.; NEWMAN, M.S.; ZHU, G.Z.; Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. **FEBS Lett.**, v. 386(2-3), p.243-6, 1996.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta. Helvetica.**, v. 70, p. 95-111, 1995.

WAGNER H. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **J. Of Cont. Release.**, v.75, p.283-295, 2001.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am. J. Med.**, v.110, n.1A, p.19S-23S, 2001.

WANG, Y.; SU, W.; ZHANG, C.; XUE, C.; CHANG, Y.; WU, X.; TANG, Q.; WANG, J.. **Food Chemi.**, v. 133 (2012), p. 1414–1419, 2012.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S.. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carb. Poly.**, v. 84, p. 4–21, 2011.

WOODLE, M.C.; MATTHAY, K.K.; NEWMAN, M.S.; HIDAYAT, J.E.; COLLINS, L.R.; REDEMANN, C., et al. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. **Biochim. Biophys. Acta.**; v. 1105(2), p.193-200, 1992.

WOUK A.F. P.F.; DINIZ J.M.; CÍRIO H.S.; BALTAZAR E.L.; ACCO A. Membrana Biológica (Biofill) - Estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Arch. Vet. Scienc.**, v.3(1), p.31-37, 1998.

ANEXO

Normas para submissão do artigo à Revista Journal of Biomedical Nanotechnology (*JBN*)

- **TYPING:** All manuscripts must be in English, typed double-spaced on one side of the page throughout (including footnotes, references, tables, legends) on 8.5" x 11" or A4 white paper leaving at least 1 inch left hand margin.
- **INTRODUCTORY MATERIAL:** The first page of the manuscript should have a concise title limited to about 15 words and the names of all authors, complete mailing address for correspondence, telephone, fax numbers and email address. Please indicate with an asterisk (*) the author to whom correspondence regarding the manuscript should be directed.
- **ABSTRACT:** All manuscripts must contain an informative 100 to 250 words abstract explaining the essential contents of the work, key ideas and results.
- **KEYWORDS:** A list of 5-10 "Keywords" should be included with the abstract.
- **MAIN AUTHOR'S BIOGRAPHICAL SKETCH (FOR REVIEW ARTICLES ONLY):** JBN publishes author's biographical sketch for the review articles. Prepare the sketch based on the following template.
- **FIGURES:** It is very important to supply high quality figures in a form suitable for reproduction. All figures, tables, illustrations, photographs should be prepared in such a way that they could be printed in a single column size with a width of 3 1/4 inches or 8.25 cm. Only if absolutely necessary should figures/tables/photos occupy double columns. Each figure must be referred to in the text and will be printed in black and white unless otherwise instructed by the authors. Each Figure should be submitted on a separate sheet and marked with the name of the author, title of manuscript and figure number. All formulae and figures should be carefully drafted and never drawn freehand. Use same font and size for all figure legends. High quality original figures and glossy prints of all photographs are required. Photocopies of the figures and photographs are not acceptable. Use 12 font for numbering and 14 font for legends.

- **MANUSCRIPT PROCESSING FEES:** Authors should understand that there are many occurring publishing expenses per journal page associated with manuscript processing, editorial, production, typesetting, printing, paper, binding, shipping, web-hosting, and archiving. However authors pay no publication fees as well as the costs of any color figure/illustration in a print edition to American Scientific Publishers whatsoever, therefore, publisher is doing all services to authors free of costs and/or at fractional costs, hence, publisher is not obligated to provide any hard/softcopies of journal issue and/or research article to anyone whatsoever. Authors may download pdf file of their published papers from Ingenta after paying fractional costs. If authors require a hardcopy of the journal issue having their research articles then authors may also purchase hardcopies of the journal issue or subscribe to the journal by contacting the publisher. No free hard/softcopies of journal issue and/or research article are provided. On the other hand, if authors want to support the journal by paying full manuscript processing fees plus all costs of color figures/illustrations/photos in a print edition through their research grants or affiliated institutions, then publisher will provide hardcopy of journal issue or pdf file of his/her research article after receiving a full payment. American Scientific Publishers highly appreciate for author's kind understanding and support.
- **FREE COLOR PRINTING:** Color illustrations are most welcome by the journal as they are effective in conveying complex graphs and photographs. Free color printing at the Editor-in-Chief's discretion, will provide an opportunity to publish color figures/illustrations in print at NO COST to the authors.
- **PHOTOGRAPHS:** Half-tone illustrations should be supplied as clear, glossy, unmounted prints. The author's name, title of manuscript and figure number should be written on the back.
- **TABLES:** Each table must be referred to in the text. Each table should be typed double-spaced on a separate sheet and identified sequentially by Arabic numerals corresponding to the order in which they appear in the text. Each table should have a brief explanatory title, which should be labeled unambiguously. The position of each table should be clearly marked in the text.
- **UNITS:** Internationally accepted units of measurement must be used. The units of measurement are used in conjunction with their numerical values; the units

should be abbreviated as suggested below. If more commonly used units are adopted, conversion factors should be given at their first occurrence. Greek symbols may be used. %, °C, nm, μm (not m), mm, cm, cm³, m, h (or hr), min, s (or sec), μg, mg, g (or gm), kg, cal, kcal, in. (or write out inch), ml [write out liter(s)].

The APS style guide can be used as a general reference on matter of units, grammar and formatting

- **ABBREVIATIONS:** No abbreviations are allowed in the title and abstract and should be defined the first time they are used within the text. The "Journal of Biomedical Nanotechnology" should be abbreviated as J. Biomed. Nanotech. for the citation purpose. .
- **REFERENCES:** References should be in the proper format on a separate page, numbered in the sequence (1,2,3,4,5, ..) in which they occur in the text. Cite the references in the text as Arabic numbers in one consecutive series by the order of appearance in the text, with the text citations presented as unparenthesized superscripts. Include the title of the article in the cited reference.