



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO  
MODIFICADA DE ÁCIDO ALFA-LIPOICO**

**GRASIELLY ROCHA SOUZA**

**TERESINA-PI**

**2018**

**GRASIELLY ROCHA SOUZA**

**OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO  
MODIFICADA DE ÁCIDO ALFA-LIPOICO**

Defesa de dissertação submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Federal do Piauí, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Livio César Cunha Nunes  
Co-orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto  
Guedes da Silva Almeida

**TERESINA-PI**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do CCS  
Serviço de Processamento Técnico

Souza, Grasielly Rocha.  
S729o Obtenção tecnológica de comprimidos de liberação modificada de ácido alfa-lipoico / Grasielly Rocha Souza. – 2018.  
118 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.  
Bibliografia

1. Doença Inflamatória Intestinal. 2. Ácido Alfa-lipoico. 3. Comprimidos de Liberação Modificada. I. Título.

CDD 615.3

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Maria de Carvalho Leite

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)  
Nível: Mestrado

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado composta pelos Professores Doutores, Lívio César Cunha Nunes- Universidade Federal do Piauí (Orientador/Presidente), Hilris Rocha e Silva- Universidade Federal do Piauí (Examinadora/Externa), Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno- Universidade Federal do Pernambuco (Examinadora/Externa), perante o qual Grasielly Rocha Souza aluna regularmente matriculada no Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, defendeu em sessão pública, para preenchimento do requisito de Mestre, sua Dissertação intitulada **“Obtenção Tecnológica de Comprimidos de Liberação Modificada de Ácido alfa-lipoico”** A defesa da referida dissertação de mestrado ocorreu, das 14:00 horas às 15:40 horas, tendo a mestranda sido submetida à arguição, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda APROVADA (aprovada/reprovada) por unanimidade.

Eu, Lívio César Cunha Nunes, que presidi a Banca de Defesa da Dissertação, assino a presente ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina, 30 de agosto de 2018. Este documento não tem valor de diploma.

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes  
Universidade Federal do Piauí  
(Orientador/Presidente)

Profa. Dra. Hilris Rocha e Silva  
Universidade Federal do Piauí  
(Examinadora/Externa)

Profa. Dra. Lina Clara Gayoso e Almendra  
Ibiapina Moreno  
Universidade Federal do Pernambuco  
(Examinadora/Externa)

“Sei que os que confiam no Senhor  
revigoram suas forças, suas forças se renovam.  
Posso até cair ou vacilar, mas consigo levantar,  
pois recebo d’Ele asas.  
E como águia me preparo pra voar.  
Eu posso ir, muito além de onde estou,  
vou nas asas do Senhor,  
o teu amor é que me conduz.”

(Celina Borges)

Aos meus pais, Chagas e Mercês, por acreditarem nos meus sonhos e terem me permitido alcançá-los sem medir esforços.

Ao meu marido, Nicodemos Júnior, pelo companheirismo de uma vida inteira e por acreditar mais em mim do que eu, pela força que você me transmite todos os dias das nossas vidas, atuando diretamente para que eu não desistisse desse sonho.

À minha filha, Maria Tereza, que veio como um presente de Deus no meio do mestrado, me fazendo perceber que sou mais forte do que imaginava.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS fiel, por estar sempre presente em minha vida, sendo o meu guia e o meu refúgio! Não conseguiria sem a presença constante do Senhor;

Ao meu orientador, prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes, pela confiança depositada desde o primeiro instante, pela amizade, pelo apoio incondicional ao saber da minha gestação no meio do mestrado e pelas contribuições técnicas imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho;

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, pela oportunidade única de ter iniciado a minha vida científica, por estar sempre apto a ajudar, sob qualquer circunstância, pela amizade e pelo exemplo de profissional, o senhor é “o cara”;

A Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela oferta do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e por toda estrutura disponível para o desenvolvimento desse trabalho;

Ao Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) pela disponibilidade do espaço físico, do material e dos recursos humanos, em especial, à dona Ivelta, ao sr. Ari, sr. Francisco e sr. Orlando, por tornarem os dias de trabalho mais leves e pela contribuição direta e indireta para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha família pelo incentivo constante, vocês são a razão de tudo!!! Aos meu pais, por sempre mostrar que através da educação podemos construir os nossos sonhos. Ao meu marido, Nicodemos Júnior, por acreditar em mim e sempre me incentivar a conseguir mais. A minha filha, Maria Tereza, você é a maior razão para tudo isso existir!! Quero ser exemplo de que podemos conquistar tudo que desejarmos. Obrigada por tudo!!

Ao grupo LITE, em especial à Antônia Leal, pela nossa amizade, pelo exemplo de superação, garra, vontade de vencer, você foi uma grande motivação para eu chegar até o fim!! Ao amigo Oskar, que me acolheu desde o primeiro dia no laboratório. À Ana Cristina, um presente que surgiu no momento que mais precisava, não tenho palavras para agradecer a sua contribuição!! À Louise que me socorreu durante a minha gravidez, muito obrigada por tudo. À Brenda e Mírian pela ajuda nos experimentos. À Bárbara, por todas as contribuições científicas e pelo



exemplo de fé, que faz a gente acreditar ainda mais que Deus sabe de todas as coisas e tudo acontece no tempo dEle. À Lécia por todos as lições de vida.

A coordenação de Farmácia, em especial às técnicas de laboratório, Josany e Jéssica obrigada pela amizade e disponibilidade!!

A todos os alunos da turma 2016-2018 do PPGCF, em especial à Elvilene, um presente que Deus me enviou nessa turma, muito obrigada pela amizade sincera, pelo exemplo de fé, superação, vontade de vencer e por estar presente no dia do nascimento da minha filha, e a Roberta, por possibilitar a aquisição de todo o material dessa pesquisa de um jeito muito mais fácil, muito obrigada!!

A todos os professores que fazem parte do PPGCF, pelos ensinamentos compartilhados;

A CAPES pelo financiamento do projeto.

SOUZA, Grasielly Rocha. **Obtenção tecnológica de comprimidos de liberação modificada de ácido alfa-lipoico**, 2018, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

## RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) podem ser representadas pela doença de Crohn (DC) e pela retocolite ulcerativa (RCU), essas patologias são caracterizadas pelo caráter crônico e recidivante da inflamação. Ainda não existe consenso acerca do agente etiológico, mas alguns estudos apontam para a existência de fatores ambientais, genéticos, da microbiota intestinal, imunológicos, além do estresse oxidativo. Sabe-se que a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio está aumentada durante o processo inflamatório, sendo um fator agravante para a fisiopatologia das DII. Dessa forma, a utilização de um agente antioxidante como adjuvante no tratamento seria uma possibilidade para melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O ácido alfa-lipoico (AAL) é um composto organossulfurado, contendo oito átomos de carbono e dois átomos de enxofre, está presente em células procarióticas e eucarióticas apresentando um papel central no metabolismo energético, além de possuir um potencial redox de  $-0,32$  V, sendo denominado de antioxidante universal. Assim, o objetivo principal desse trabalho foi obter comprimidos de liberação modificada de AAL para utilização como adjuvante no tratamento das DII. Através da prospecção científica foi possível confirmar a eficácia do AAL nas DII, sendo a atividade atribuída principalmente as suas propriedades antioxidantes, enquanto que a prospecção tecnológica revelou uma área em potencial para exploração, uma vez que poucas patentes foram depositadas com essa aplicação. O método analítico foi desenvolvido, sendo este de fácil execução e de baixo custo, além disso, foi validado, uma vez que atendeu aos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, sendo seletivo, linear, preciso, exato e robusto. A análise da morfologia das partículas por MEV demonstrou a característica cristalina, que foi confirmada pela difração de raios-X, além disso, apresentou uma média de tamanho de partícula de  $250 \mu\text{m}$ . O estudo das propriedades de fluxo demonstrou a necessidade de utilização de excipientes específicos para a melhoria desta característica, pois o pó apresentou razão de Hausner de 1,51 e índice de Carr de 34,1%, ângulo de repouso e tempo de escoamento infinitos, revelando um fluxo ruim. As técnicas de espectroscopia no infravermelho e RMN confirmaram a identidade da matéria-prima utilizada para a obtenção dos comprimidos através de comparação com o padrão analítico. Foram obtidos comprimidos de AAL com a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), mesocarpo de babaçu e estearato de magnésio sem e com revestimento com Eudragit<sup>®</sup> S (lotes 2 e 4, respectivamente), os quais atenderam aos critérios de qualidade exigidos pela Farmacopeia Brasileira. O ensaio de dissolução *in vitro* mostrou que os comprimidos do lote 2 apresentaram uma liberação convencional, uma vez que 90% do conteúdo foi liberado em 30 minutos nos meios de dissolução com pH 1,2 e 7,4, enquanto que os comprimidos do lote 4 apresentaram uma liberação modificada, uma vez que não houve liberação do conteúdo em pH 1,2, sendo este totalmente liberado após 30 minutos em pH 7,4. Dessa forma, foram desenvolvidos comprimidos de liberação entérica, ideais para utilização por pacientes com DII.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal; ácido alfa-lipoico; comprimidos de liberação modificada.

SOUZA, Grasielly Rocha. **Technological obtainment of modified release tablets of alpha-lipoic acid**, 2018, Dissertation (Master Degree in Pharmaceutical Sciences) – Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina.

## ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) may be represented by Crohn's disease (DC) and ulcerative colitis (RCU), these pathologies are characterized by the chronic and recurrent character of the inflammation. There is still no consensus about the etiological agent, but some studies point to the existence of environmental, genetic, intestinal microbiota, immunological factors, besides oxidative stress. It is known that the formation of reactive species of oxygen and nitrogen is increased during the inflammatory process, being an aggravating factor for the pathophysiology of IBD. Thus, the use of an antioxidant agent as adjuvant in the treatment would be a possibility to improve the patients' quality of life. Alpha-lipoic acid (AAL) is an organosulfur compound, containing eight carbon atoms and two sulfur atoms, is present in prokaryotic and eukaryotic cells and plays a central role in energy metabolism, besides having a potential redox of -0.32 V, being denominated of universal antioxidant. Thus, the main objective of this work was to obtain modified release AAL tablets for use as an adjuvant in the treatment of IBD. Through the scientific prospecting it was possible to confirm the effectiveness of AAL in the IBD, with the activity attributed mainly to its antioxidant properties, while the technological prospecting revealed a potential area for exploration, since few patents were deposited with this application. The analytical method was developed, which is easy to execute and low cost. In addition, it was validated, since it met the parameters established by Brazilian legislation, being selective, linear, precise, accurate and robust. The analysis of the particle morphology by SEM showed the crystalline characteristic, which was confirmed by the X-ray diffraction, in addition, presented a mean particle size of 250  $\mu\text{m}$ . The study of flow properties demonstrated the need for specific excipients to improve this characteristic, as the powder presented Hausner's ratio of 1.51 and Carr index of 34.1%, infinite rest angle and flow time, revealing a bad flow. Infrared and NMR spectroscopy techniques confirmed the identity of the raw material used to obtain the tablets by comparison with the analytical standard. AAL tablets were obtained with hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), babassu mesocarp and magnesium stearate without and with Eudragit® S coating (batches 2 and 4, respectively), which met the quality criteria required by the Brazilian Pharmacopoeia. The *in vitro* dissolution test showed that the tablets in batch 2 showed a conventional release, since 90% of the contents were released within 30 minutes in the dissolution media at pH 1.2 and 7.4, whereas the tablets in the batch 4 presented a modified release, since there was no release of the content at pH 1.2, which was totally released after 30 minutes at pH 7.4. Thus enteral release tablets were developed, ideal for use by patients with IBD.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease; alpha-lipoic acid; modified release tablets.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1: Estrutura molecular do ácido alfa-lipoico 18

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Aspectos histopatológicos da retocolite ulcerativa e da doença de Crohn 23

Figura 2: Padrões de etiopatogenia das DII 24

Figura 3: Esquema ilustrando a relação entre os fatores etiológicos, inflamação e estresse oxidativo na patogênese das DII 29

Figura 4: Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase 31

Figura 5: Molécula de ácido alfa lipoico 32

Figura 6: Formas enantioméricas do AAL. 32

Figura 7: Formas oxidada e reduzida do ácido lipoico 33

Figura 8: Rota biossintética proposta para o AAL 34

Figura 9. Absorção e eliminação do AAL por via oral 36

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Molécula de AAL 42

Figura 2. Artigos selecionados pela metodologia PICo antes e após a seleção pelos critérios inicialmente selecionados 44

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Esquema ilustrando a preparação da solução mãe e as respectivas diluições para construção da curva de calibração. 74

Figura 2. Relações para a determinação dos limites de detecção e de quantificação 74

Figura 3. Fórmula para obtenção da exatidão do método 75

Figura 4. Molécula de AAL 76

Figura 5. Espectro de varredura do AAL em espectrofotômetro para determinação do comprimento de onda máximo de absorção 78

Figura 6. Sobreposição dos espectros de absorção do AAL, mesocarpo de babaçu, HPMC e CMC 79

Figura 7. Curva de calibração do AAL 80

### CAPÍTULO 3

Figura 1: Equações utilizadas para determinação do índice de Hausner e do índice de Carr.	90
Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do ácido alfa-lipoico	91
Figura 3. Repartição granulométrica	92
Figura 4. Difratoograma do AAL	94
Figura 5. Espectros de absorção na região do infravermelho do AAL	95
Figura 6. Espectro de RMN $H^1$ do AAL padrão USP em clorofórmio deuterado, 400 MHz	96
Figura 7. Espectro de RMN $H^1$ do AAL matéria-prima em clorofórmio deuterado, 400 MHz.	97
Figura 8. Espectro de RMN $C^{13}$ do AAL padrão USP em clorofórmio deuterado, 100 MHz.	97
Figura 9. Espectro de RMN $C^{13}$ do AAL matéria-prima em clorofórmio deuterado, 100 MHz.	98
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Figura 1. Figura 1. Comprimidos obtidos na UFPI	107
Figura 2. Perfil de dissolução dos comprimidos de AAL em pH 1,2	109
Figura 4. Perfil de dissolução dos comprimidos de AAL em pH 7,4	110

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Descritores e/ou palavras-chave selecionados, segundo a metodologia PICO	43
Tabela 2. Palavras-chave utilizadas na prospecção tecnológica.	44
Tabela 3. Resultados obtidos na prospecção tecnológica.	56
Quadro 1. Principais resultados das publicações científicas sobre a utilização do AAL nas DII	46
Quadro 2. Patentes depositadas com o AAL na inflamação e nas DII.	58

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Avaliação da solubilidade do AAL em diferentes solventes	77
Tabela 2. Análise de variância para linearidade do método de doseamento de ácido alfa-lipoico por espectrofotometria UV-Vis.	80
Tabela 3. Resultados da repetibilidade do método para quantificação do ácido alfa lipoico em espectrofotometria UV-Vis.	81
Tabela 4. Resultados da precisão intermediária	82
Tabela 5. Resultados da exatidão para três níveis da concentração do ácido alfa-lipoico.	83
Tabela 6. Resultados da robustez após análise pelo teste t de <i>Student</i> .	83

### CAPÍTULO 3

Tabela 1: Parâmetros avaliados para determinação das propriedades de fluxo do AAL	93
---	----

### CAPÍTULO 4

Tabela 1. Composição dos comprimidos de liberação modificada de AAL utilizados nesse estudo	104
Tabela 2. Resultados do controle de qualidade físico-químico	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Ácido alfa-lipoico
ADHL	Ácido dihidrolipoico
CAT	Catalase
CMC	Carboximetilcelulose
DL	Dose Letal
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DC	Doença de Crohn
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Gpx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IL	Interleucina
INF	Interferon
IV	Infravermelho
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
PCR	Proteína C reativa
PICo	Problema, Interesse, Contexto
TNBS	Trinitrobenzeno sulfônico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
RCU	Retocolite ulcerativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOD	Superóxido Dismutase
SSD	Sulfato de sódio dextran

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 OBJETIVOS</b>	19
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	21
<b>CAPÍTULO 1: Utilização do ácido alfa-lipoico como adjuvante no tratamento das doenças inflamatórias intestinais: Uma prospecção científica e tecnológica</b>	38
<b>CAPÍTULO 2: Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria UV-Vis para quantificação do ácido alfa-lipoico</b>	68
<b>CAPÍTULO 3: Estudo de pré-formulação do ácido alfa-lipoico</b>	85
<b>CAPÍTULO 4: Obtenção tecnológica de comprimidos de liberação modificada de ácido alfa-lipoico</b>	99
<b>4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	113
<b>REFERÊNCIAS</b>	116



# **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são representadas pela Doença de Crohn (DC) e pela retocolite ulcerativa (RCU). As duas patologias são conhecidas há bastante tempo, mas ainda não se sabe ao certo o que provoca esse processo inflamatório crônico e recidivante (FIOCCHI, 1998). Sabe-se que na DC a inflamação normalmente acomete a região do intestino delgado e grosso, ocorrendo de forma descontínua, ou seja, existem segmentos intestinais saudáveis entre os segmentos inflamados. Enquanto que na RCU a inflamação ocorre de forma contínua, encontrando-se restrita ao cólon e ao reto (PAPACOSTA et al., 2017).

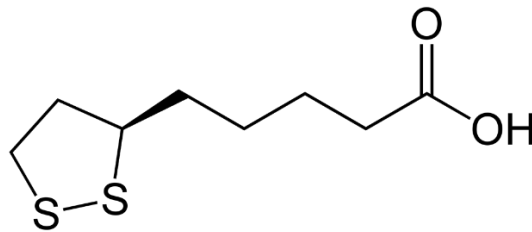
Apesar da incerteza da etiologia, tem-se conhecimento de que uma série de fatores podem estar envolvidos, como os desencadeantes ambientais, fatores genéticos, defeitos imunorregulatórios e fatores microbianos/disfunção da barreira intestinal (Xavier & Podolsky 2007). Além disso, está sendo cada vez mais investigado o papel do estresse oxidativo como um outro fator desencadeante dessas doenças (ZHU & LI, 2012).

No trato gastrointestinal há formação contínua de agentes pró-oxidantes, isso acontece em decorrência da presença de microrganismos, resíduos alimentares, além da interação entre as células do sistema imunes. Assim, o estresse oxidativo, que consiste na incapacidade do organismo em neutralizar as EROs e as ERNs, encontra-se aumentado nos pacientes com DII, uma vez que a capacidade antioxidante nesses indivíduos se encontra reduzida, mesmo quando a doença está na fase assintomática (MOURA et al., 2015).

Nesse contexto, estudos demonstraram que a administração de compostos antioxidantes exógenos era capaz de prevenir o início da doença ou de retardar o seu desenvolvimento. Normalmente, esse efeito protetor vem acompanhado da redução dos biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo no tecido colônico e no sangue periférico (ZHU & LI, 2012).

Dessa forma, o ácido alfa-lipoico (AAL) (figura 1), composto organossulfurado presente em células procarióticas e eucarióticas, possui uma capacidade antioxidante relevante, tanto que o seu par redox, composto pela forma oxidada e reduzida da molécula, apresenta um potencial redox de -0,32 V, classificando-o como “antioxidante universal”. Além disso, essa molécula possui uma cadeia com oito átomos de carbono apresentando um anel ditiolano em uma extremidade e um grupo ácido carboxílico na outra, essa característica permite que a molécula mantenha a sua função antioxidante tanto no citoplasma quanto na membrana celular, outra característica importante para essa função (GORACA et al., 2011).

Figura 1. Molécula do AAL



Fonte: Autoria própria.

O AAL exerce essa função através de quatro mecanismos: capacidade de quelar metais, neutralizar diretamente as EROs, regenerar antioxidantes endógenos e reparar sistemas (BIEWENGA et al.,1997).

Tendo em vista que a administração de compostos antioxidantes exógenos surge como uma possibilidade de melhoria das condições de saúde dos pacientes portadores das DII, esse estudo foi desenvolvido com a finalidade de obter comprimidos de liberação modificada contendo o antioxidante ácido alfa-lipoico. Esse composto foi utilizado pelo seu potencial antioxidante associado a sua baixa toxicidade, uma vez que se trata de um composto endógeno. Além disso, a tecnologia de liberação modificada do ativo foi selecionada com o objetivo de liberar o composto no órgão-alvo, para isso foi utilizado um revestimento de Eudragit S<sup>®</sup>, solúvel em pH maior que 7, assim, o AAL poderia exercer a sua função antioxidante no local da inflamação, sendo ainda mais efetivo. Vale ressaltar que este produto inovador não possui a intenção de substituir a terapia convencional, mas ser utilizado como um adjuvante no tratamento.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Obter comprimidos de liberação modificada contendo ácido alfa-lipoico para utilização como adjuvante no tratamento da Doença Inflamatória Intestinal (DII).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica para verificar a utilização do ácido alfa-lipoico nas doenças inflamatórias intestinais;
- Desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria UV-Vis para quantificar o ácido alfa-lipoico;
- Caracterizar o ácido alfa-lipoico através das técnicas analíticas: análise térmica, infravermelho, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN);
- Realizar o estudo da reologia do pó de ácido alfa-lipoico;
- Obter comprimidos de liberação modificada contendo hidroxipropilmetilcelulose ou carboximetilcelulose com ou sem revestimento com eudragit S-100<sup>®</sup> para liberação no cólon;
- Realizar o estudo de dissolução *in vitro* dos comprimidos.

# **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

---

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS (DII)

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas por uma inflamação crônica e descontrolada da mucosa do intestino, sendo a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC) as duas formas mais comuns. Existem inúmeros desafios para a realização do diagnóstico dessas doenças, sendo a distorção da arquitetura do tecido uma característica importante para esse fim. Vale destacar que isso pode acontecer pela presença de um infiltrado granulomatoso transmural e/ou por células inflamatórias agudas. Entretanto, pode haver a presença de uma inflamação crônica no intestino normal sem qualquer anormalidade diagnóstica, e a incapacidade de regular essa resposta inflamatória caracteriza as DII (HANAUER, 2006).

É importante destacar que a realização dos estudos epidemiológicos com as DII pode ser difícil, uma vez que o início da doença pode ser gradual, por não existir um padrão-ouro como técnica de diagnóstico e pela amplitude do diagnóstico diferencial. Apesar disso, sabe-se que os maiores índices de incidência e prevalência foram descritos no norte da Europa, Reino Unido e América do Norte, que são as regiões geográficas historicamente associadas as DII, contudo, foi possível verificar uma estabilização destes índices. Em contrapartida, foi possível observar uma tendência em aumentar nos locais de baixa incidência, como o sul da Europa, a Ásia e a maioria dos países em desenvolvimento (LOFTUS, 2004).

Na América do Norte, as taxas de prevalência de DC para hispânicos é de 4,1 para 100.000/ano e de 5,6 para 100.000/ano para os asiáticos, sendo muito inferiores às dos brancos 43,6 para 100.000/ano e afro-americanos 29,8 para 100.000/ano (BAUMGART & CARDING, 2007). Vale ressaltar que existe um estudo que aponta a importância das diferenças étnicas no local da doença e nas suas complicações extraintestinais (NGUYEN et al., 2006).

Sabe-se que a RCU e a DC são mais comumente diagnosticadas no final da adolescência e no início da idade adulta, entretanto, o diagnóstico pode ocorrer em todas as idades. Com relação ao gênero, pode-se verificar uma predominância do sexo feminino na DC, podendo estar relacionado a fatores hormonais, enquanto que na RCU há predominância do sexo masculino (LOFTUS, 2004).

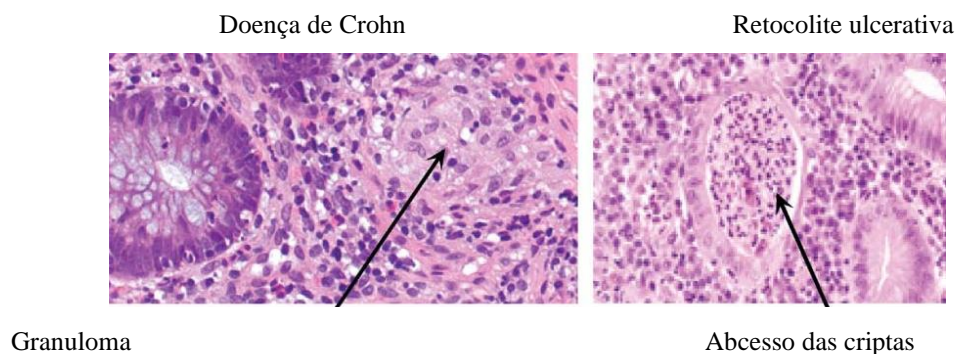
Apesar de extensas pesquisas realizadas na área, ainda não existe um consenso sobre a patogênese dessas doenças, contudo, acredita-se que o processo inflamatório recidivante seja decorrente da interação de inúmeros fatores, como: conteúdo do canal alimentar,

caracterizando-se pela presença de antígenos bacterianos e/ou alimentares, podendo haver um aumento da permeabilidade intestinal a esses produtos; e alteração na resposta imunológica da mucosa, com a presença de linfócitos T com uma reatividade anormal. Vale ressaltar que, embora ainda seja desconhecido, o fator genético está diretamente relacionado ao desenvolvimento dessas doenças. Acredita-se que as alterações possam estar na função de barreira epitelial do intestino, nas respostas imunológicas, inata e adaptativa e/ou na composição da microbiota intestinal (ESBERARD, 2012).

A RCU é caracterizada por uma inflamação difusa da mucosa, estando limitada ao cólon: tem início no reto, podendo se difundir proximalmente, de maneira contínua, além de poder envolver a região periapendicular. Ademais, pode haver o desenvolvimento de uma ulceração extensa na mucosa superficial por conta da associação entre uma inflamação proeminente com uma produção aumentada de diversos mediadores inflamatórios. As principais características histopatológicas (figura 1) consistem na presença de um infiltrado neutrofílico na lâmina própria e nas criptas, com a formação de microabscessos, além da depleção de mucina de células caliciformes (XAVIER & PODOLSKY, 2007).

Vale ressaltar que a DC pode envolver qualquer segmento do trato gastrointestinal, ocorrendo de forma mais comum no íleo terminal ou na região perianal. As lesões aparecem de forma descontínua e pode haver associação com a presença de complicações como estenoses, abscessos e fístulas. Histologicamente (figura 1), caracteriza-se por um espessamento da submucosa, inflamação transmural, ulceração fissurada e granulomas não caseosos (KHOR et al., 2011).

Figura 1. Aspectos histopatológicos da retocolite ulcerativa e da doença de Crohn.



À esquerda: doença de Crohn - biópsia de um íleo terminal com doença ativa. A figura ilustra um granuloma discreto composto por macrófagos compactos, células gigantes e células epitelióides. Circundando o nódulo, há acentuada infiltração de linfócitos, plasmócitos e outras células inflamatórias, mas não há necrose. À direita, retocolite ulcerativa - biópsia da mucosa colônica retirada de um paciente com doença ativa. O abscesso da cripta é composto de neutrófilos transmigrados e o epitélio circundante exibe características de lesão da mucosa aguda.

Fonte: Xavier & Podolsky, 2007.

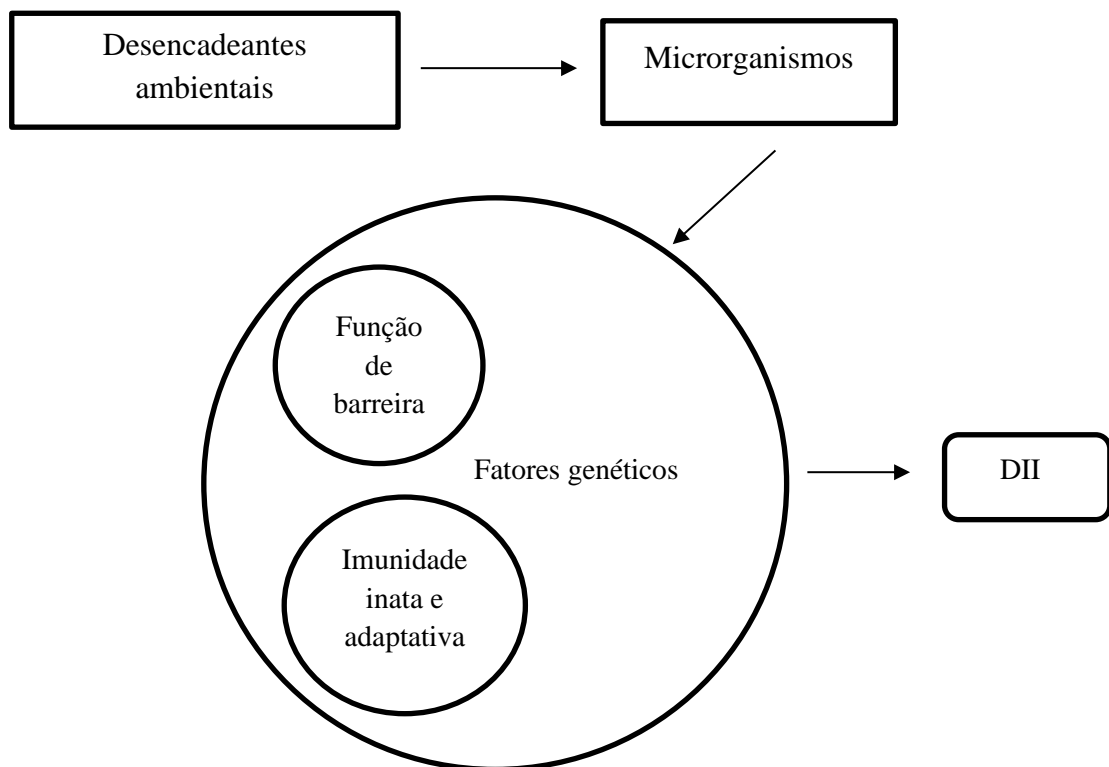


### 3.1.1 Etiopatogenia das DII

Vários fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de inflamação da mucosa, embora a etiologia das DII ainda não seja totalmente compreendida, acredita-se que existam quatro fatores que possam estar envolvidos (figura 2):

1. Desencadeantes ambientais
2. Fatores genéticos
3. Defeitos Imunorregulatórios
4. Fatores microbianos e disfunção da barreira intestinal

Figura 2. Padrões de etiopatogenia das DII



A inflamação intestinal na DII resulta da alteração na interação entre os micróbios residentes e a mucosa. Isso pode resultar da influência de fatores ambientais e/ou fatores do hospedeiro, que variam dependendo da herança genética em vários loci de suscetibilidade. Fatores genéticos descobertos até o momento afetam a função de barreira e a imunidade inata e adaptativa.

Fonte: Xavier & Podolsky (2007)

### 3.1.1.1 Desencadeantes Ambientais

Dentre as diversas possibilidades de desenvolvimento das DII, a forma como os fatores ambientais estão envolvidos está entre os menos compreendidos e mais difíceis de abordar. Entretanto, os fatores ambientais são tão importantes para o desenvolvimento das DII quanto a genética do indivíduo. Dentre as variáveis mais importantes, estão: tabagismo, contraceptivos orais, dieta, higiene, ocupação, educação, clima, poluição, estresse e diversos componentes, como apendicectomia, amigdalectomia, transfusões de sangue, contato com animais e atividade física. Entre estes, a associação mais conhecida é com o tabagismo, mas a reprodutibilidade e a força da associação com outros fatores de risco necessitam de mais estudos (FIOCCHI, 1998). Alguns fatores ambientais envolvidos na patogênese das DII estão descritos abaixo.

- “Ocidentalização”

Acredita-se que a “ocidentalização” do estilo de vida, com modificações na dieta, tabagismo e variações na exposição à luz solar, poluição e produtos químicos industriais, esteja diretamente relacionado à maior prevalência das DII nas regiões desenvolvidas, como os EUA, Reino Unido e Escandinávia, da mesma forma que o aumento da incidência foi recentemente observado nos países em desenvolvimento (HANAUER, 2006).

- Saneamento e exposição a infecções

Pode-se observar que as condições de saneamento estão inversamente relacionadas ao desenvolvimento das DII, ou seja, à medida que houve melhora nas condições de saúde, com menos infecções e doenças parasitárias, melhores condições sanitárias, acesso a vacinas e adoção de hábitos alimentares nas sociedades ocidentais, os pacientes foram menos expostos a infecções na infância, tornando o sistema imunológico menos preparado para lidar com as exposições antigênicas com o passar da vida (ESBERARD, 2012).

- Ocupação

A maior incidência das DII tem sido observada em indivíduos com cargos gerenciais, administrativos e de vendas, que envolvem tipicamente trabalho sedentário e em ambientes fechados. Em contraste, entre os agricultores e trabalhadores da construção civil observa-se

baixa incidência. Dessa forma, acredita-se que o trabalho desenvolvido ambiente externo e com atividade física, pode atuar como protetor contra as DII, enquanto o trabalho em locais artificiais confere um risco aumentado (HANAUER, 2006).

- Dieta

Estudos que buscam relacionar dieta e DII são geralmente inconclusivos. Há algumas evidências de que uma maior ingestão de ácidos graxos aumenta o risco de DII. Da mesma forma, acredita-se que a ingestão frequente de “fast-food” confere um risco 3 a 4 vezes maior de DII (HANAUER, 2006).

- Tabagismo

O efeito do tabagismo ou, curiosamente, o efeito oposto do tabagismo sobre o desfecho de cada forma de DII representa a conexão mais intrigante entre os fatores ambientais. Sabe-se que o tabagismo é um fator de risco independente para recidiva clínica, cirúrgica e endoscópica na DC e influencia a atividade da doença após a cirurgia. Enquanto que os adesivos de nicotina transdérmicos adicionados à terapia convencional melhoram os sintomas em pacientes com RCU leve a moderada (FIOCCHI, 1998).

### 3.1.1.2 Fatores Genéticos

A realização de estudos epidemiológicos demonstrou que fatores genéticos estão diretamente relacionados à maior suscetibilidade das DII. Entretanto, apenas um modelo genético não é suficiente para explicar o desenvolvimento dessas doenças. Vale ressaltar que a RCU e a DC podem ser distúrbios poligênicos heterogêneos e podem compartilhar alguns *loci* de suscetibilidade. Contudo, o fenótipo da doença é determinado por vários fatores, incluindo interação entre as variantes alélicas em vários locais, bem como influências genéticas e ambientais (SATSANGI et al., 2003).

Foram identificados dois grupos NOD2 (também designado por CARD15 e IBD1) como gene de susceptibilidade na DC, através da utilização de abordagens posicionais de clonagem e genes candidatos. Desde então, vários *loci* de suscetibilidade adicionais foram identificados e confirmados por replicação: IBD5, IL23R e ATG16L1 (XAVIER, 2007).

### 3.1.1.3 Defeitos imunorregulatórios

O epitélio intestinal saudável é colonizado por bactérias potencialmente pró-inflamatórias, mas há tolerância pelo organismo, sem o recrutamento de neutrófilos para a superfície epitelial, por conta do fenótipo dos macrófagos residentes no intestino, que não expressam receptores para o reconhecimento dessas bactérias. Assim, se houver a expressão dos receptores TREM-1 na superfície celular de macrófagos, neutrófilos e monócitos, esses microrganismos serão reconhecidos como não-próprios e a resposta inflamatória será amplificada, aumentando a degranulação e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Vale ressaltar que menos de 10% dos macrófagos da lâmina própria intestinal expressam essa molécula, logo, as respostas inflamatórias são prevenidas (SCHENK et al., 2005).

Dessa forma, existe uma relação simbiótica entre as bactérias comensais e o hospedeiro. Acredita-se que a exposição a essas bactérias comensais regula negativamente os genes inflamatórios com o bloqueio da ativação da via do NF- $\kappa$ B, inibindo, assim, a resposta imune inflamatória do intestino a esses microrganismos e a antígenos alimentares aos quais está constantemente exposto. Nas DII esta tolerância é perdida. A exposição à microflora luminal desencadeia agora uma resposta inflamatória pelas células que revestem a mucosa, levando a uma resposta imunitária crônica e destrutiva (HANAUER, 2007).

### 3.1.1.4 Fatores microbianos e disfunção da barreira epitelial

Os fatores microbianos parecem participar diretamente da patogênese das DII, uma vez que vários estudos demonstraram que não há o desenvolvimento da doença quando se utilizam modelos experimentais que não possuem flora intestinal (ESBERARD, 2012). Outras pesquisas já demonstraram alguns microrganismos que estão envolvidos na patogênese das DII, como: *Mycobacterium paratuberculosis*, *M paramyxovirus*, *Listeria monocytogenes*, e *Helicobacter hepaticus* (COLLETTI, 2004). Outros estudos sugerem uma ligação entre a DC e uma infecção precoce por sarampo (HENDRICKSON et al., 2002).

Outro fator importante na patogênese das DII é o aumento da permeabilidade intestinal. Alguns estudos já demonstraram que a permeabilidade intestinal se encontra aumentada nos parentes de primeiro grau dos pacientes, sendo essa característica de extrema importância, uma vez que representa um fator predisponente que pode levar a manifestação dos sintomas. O aumento da permeabilidade intestinal pode levar ao aumento do número de células B CD45R01

circulantes, sugerindo que pode haver aumento da absorção de antígenos, com o aumento das células B maduras circulantes (FIOCCHI, 1998).

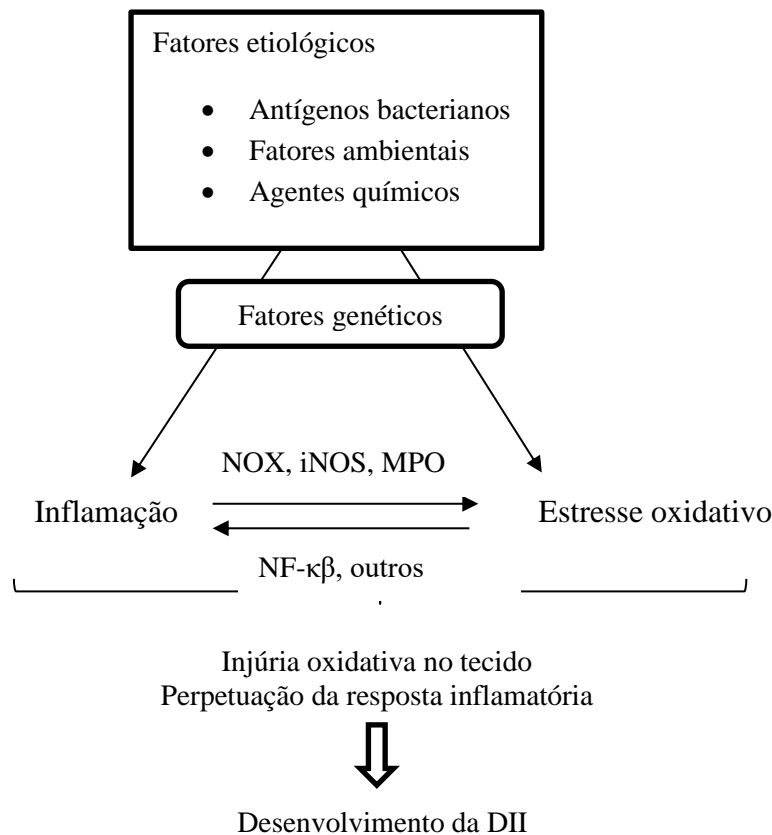
Estudos em animais mostram uma tendência para o desenvolvimento de inflamação severa em áreas do intestino que se encontram abaixo do defeito de permeabilidade (BOUMA & STROBER, 2003). As bactérias do lúmen intestinal parecem intensificar ainda mais o defeito de permeabilidade, estabelecendo um ciclo auto-sustentado de inflamação da mucosa que permite a captação e translocação de bactérias (FARRELL & LAMONT, 2002).

O epitélio intestinal saudável possui como principal característica junções celulares eficazes contra a passagem de microrganismos e outros antígenos presentes no lúmen intestinal, aliado a isso, existe um mecanismo de defesa que impede a ativação inadequada do sistema imune. Entretanto, uma vez que os produtos bacterianos sejam capazes de atravessar essa barreira, eles entrarão em contato direto com as células do sistema imunológico, resultando numa resposta imune adaptativa clássica. Dessa forma, há produção intensiva de uma série de citocinas inflamatórias, recrutando células adicionais na parede do intestino. Além disso, elas são capazes de aumentar a permeabilidade intestinal, reduzindo as junções celulares das células endoteliais, aumentando a infiltração de neutrófilos e o processo inflamatório (HANAUER, 2007).

### **3.1.2 Estresse oxidativo e as DII**

Apesar dos possíveis fatores etiológicos já descritos para as DII, ainda existe um quinto fator, de extrema importância para a fisiopatologia dessas doenças, o estresse oxidativo (figura 3). Estudos sugerem que a inflamação intestinal crônica está associada a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN). Essa superprodução de ERO/ERN e o consequente estresse oxidativo demonstraram ter um papel crítico na fisiopatologia das DII tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos (ZHU & LI, 2012).

Figura 3. Esquema ilustrando a relação entre os fatores etiológicos, inflamação e estresse oxidativo na patogênese das DII



Fonte: ZHU & LI, 2012

A oxidação ocorre de forma natural no metabolismo aeróbico, uma vez que durante o processo de respiração celular, são produzidas várias espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser radicalares, como o ânion superóxido ( $O_2^- \cdot$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) e não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl). Essas moléculas possuem elétrons não pareados, o que lhes confere uma alta reatividade (BARREIROS et al., 2006). Já está bem definido que quando presentes em concentrações adequadas, podem exercer várias funções benéficas, como atuar na síntese de ATP (energia), através da cadeia transportadora de elétrons, na fertilização do óvulo, na ativação de genes e nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Contudo, a produção excessiva pode levar a danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010).

Numa tentativa de neutralizar ou minimizar os efeitos desses radicais livres, o organismo possui um eficaz sistema de defesa antioxidante, que pode ser produzido pelo corpo ou adquirido pela alimentação. Segundo Halliwell (2000): “Antioxidante é qualquer substância

que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.

O sistema de defesa antioxidante próprio do organismo pode atuar de forma enzimática, como a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimática, como a glutathione reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido alfa-lipoico. Ademais, os antioxidantes podem ser adquiridos pela dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina- E),  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e compostos fenólicos (BARREIROS et al., 2006).

Sabe-se que quando a produção de EROs não for totalmente neutralizada pelos sistemas antioxidantes do organismo, havendo excesso dessas moléculas, ocorre o processo de estresse oxidativo. Esse fenômeno pode resultar na oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

Dentre as doenças que podem ser causadas pelo estresse oxidativo, tem-se as DII, diversos estudos já foram realizados com modelos animais e em humanos na tentativa de elucidar o papel das ERO/ERN na patogênese dessas doenças. Assim, foi possível verificar que existe aumento na produção de ERO/ERN, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peroxinitrito, na mucosa do cólon em modelos animais de DII. Em consonância, houve redução dos níveis dos antioxidantes endógenos no tecido colônico, incluindo glutathione e superóxido dismutase (ZHU & LI, 2012).

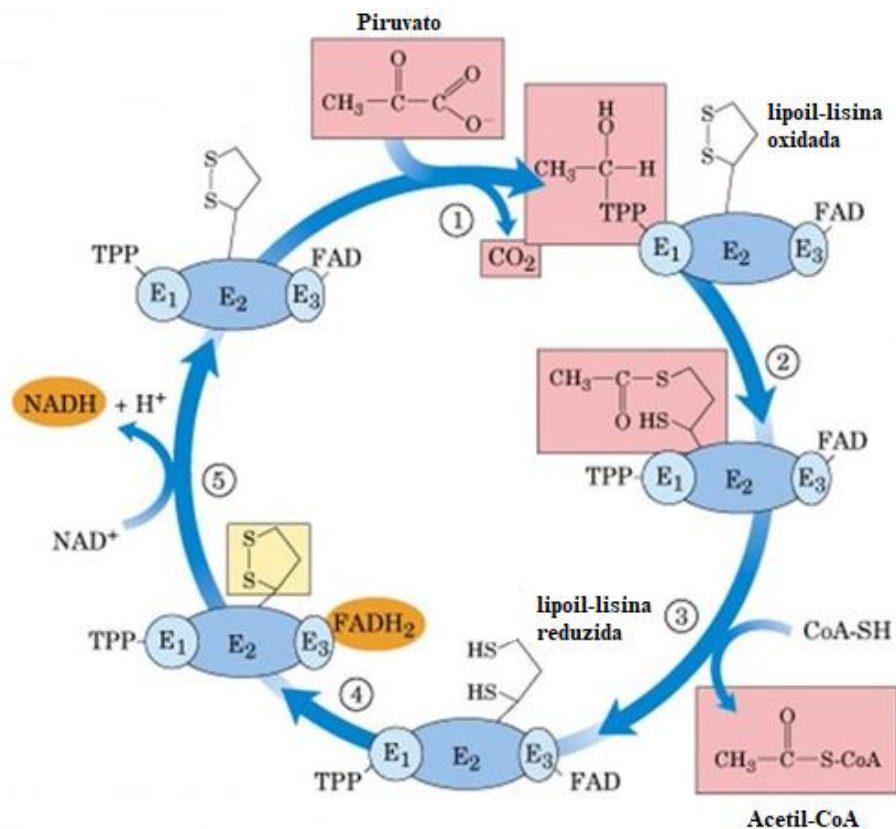
Além disso, verificou-se que a administração de compostos antioxidantes exógenos era capaz de prevenir o início da doença ou de retardar o seu desenvolvimento. Normalmente, esse efeito protetor vem acompanhado da redução dos biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo no tecido colônico e no sangue periférico. A evidência mais convincente para uma relação de causa e efeito entre o estresse oxidativo e as DII vem de estudos utilizando modelos animais manipulados geneticamente, assim como modelos químicos para modificar seletivamente enzimas antioxidantes do cólon. Por exemplo, a superexpressão transgênica de Cu, ZnSOD ou transferência de gene SOD extracelular ex vivo resultou na atenuação da colite induzida por DDS em camundongos (ZHU & LI, 2012).

### **3.2 ÁCIDO ALFA-LIPOICO**

O ácido alfa-lipoico (AAL), também denominado de ácido tióctico ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ), está presente na maioria das células eucarióticas e

procarióticas, desempenhando um papel central no metabolismo energético, uma vez que compõe o complexo piruvato desidrogenase, atuando na descarboxilação oxidativa do piruvato (figura 4), processo essencial para a conversão do piruvato em acetil-CoA, etapa subsequente à glicólise no processo de respiração celular (NAVARI-IZZO et al., 2002). Foi isolado pela primeira vez por Reed e colaboradores, a partir de fígado bovino, em 1951 (GORACA et al., 2011). Entretanto, a sua existência já era conhecida desde 1930, quando foi descoberto que um “fator de crescimento da batata” era necessário para o crescimento de algumas bactérias (NAVARI-IZZO et al., 2002).

Figura 4. Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da piruvato desidrogenase.

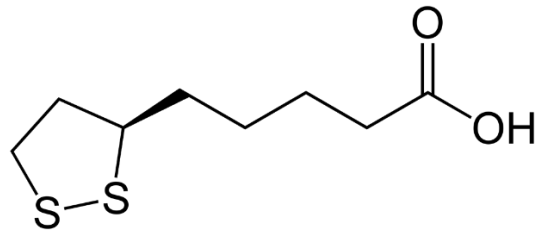


Fonte: Nelson & Cox, 2002.

É um composto organossulfurado derivado do ácido octanoico, com a presença de um grupo ácido carboxílico em uma extremidade e um grupo dissulfeto redox na outra, formando um anel ditiolano (figura 5). O carbono na posição seis possui quatro ligantes distintos, constituindo um centro quiral, logo é um composto opticamente ativo, ou seja, consegue desviar o ângulo da luz polarizada (MOURA et al., 2015).



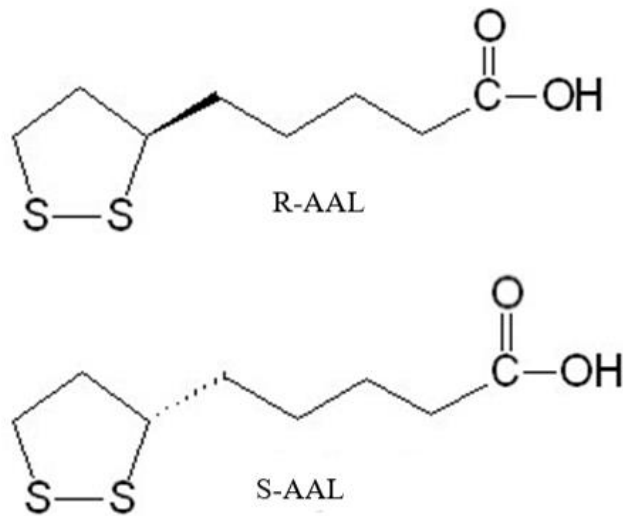
Figura 5: Molécula de ácido alfa lipoico.



Fonte: Autoria própria.

Por apresentar um carbono assimétrico, possui dois enantiômeros: AAL-R, forma sintetizada pelo organismo e que se liga as proteínas, e o AAL-S. Vale ressaltar que a mistura racêmica está disponível comercialmente, ou seja, AAL-R e AAL-S (figura 6) (GORACA et al., 2011).

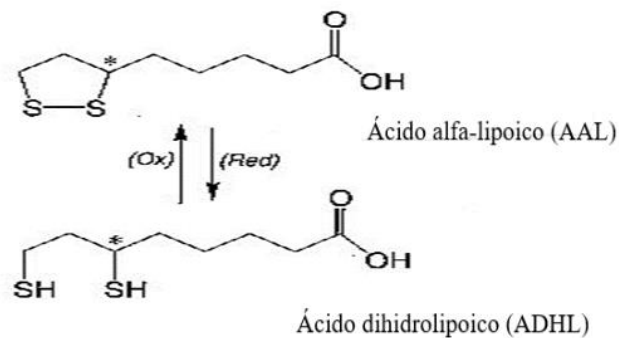
Figura 6: Formas enantioméricas do AAL.



Fonte: Autoria própria.

Sabe-se que os dois grupos tiol podem estar oxidados, constituindo o AAL, ou reduzidos, formando o ácido dihidrolipoico (ADHL) (figura 7). A forma reduzida possui capacidade de interagir com as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) de maneira mais intensa do que a forma oxidada, contudo, ambas as formas possuem capacidade antioxidante, ou seja, são capazes de eliminar radicais livres (GORACA et al., 2011; MOURA et al., 2015).

Figura 7: Formas oxidada e reduzida do ácido lipoico.



Fonte: Autoria própria.

Outra característica importante consiste na capacidade em atuar nos meios hidrofílico e lipofílico, embora o composto seja insolúvel em água na sua forma molecular ( $2,24 \times 10^{-1}$  g/L), a sua base conjugada, o lipoato, possui maior solubilidade, sendo a forma predominante em condições fisiológicas, isso permite a manutenção da atividade antioxidante no citoplasma e na membrana plasmática celular. Ademais, o potencial redox do par AAL/ADHL fica em torno de  $-0,32\text{V}$ . O conjunto dessas características permitiu a denominação do AAL como “antioxidante universal” (MOURA et al., 2015).

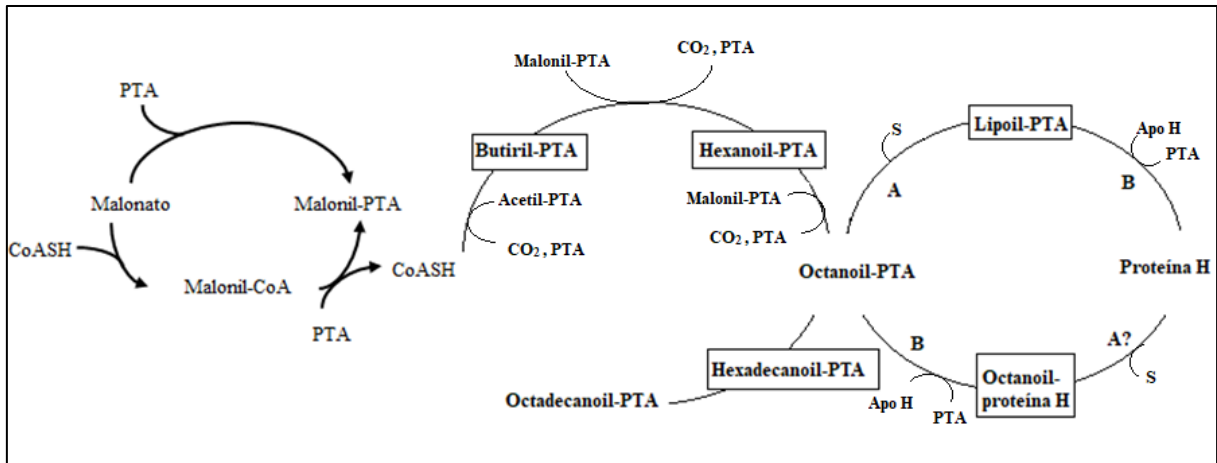
### 3.2.1 Biossíntese do AAL

Apesar da riqueza de informações acerca do grupo prostético lipoil, bem como as suas funções em diferentes complexos enzimáticos, como na piruvato desidrogenase e/ou na  $\alpha$ -cetoglutarato, a biossíntese do AAL ainda não está bem compreendida nos organismos procariontes e eucariontes. Acredita-se que, nos procariontes, o precursor seja o ácido octanoico e o grupo carbonossulfureto seja resultado da ação enzimática da lipase do AAL (NAVARIZZO et al., 2002).

Sabe-se que a biossíntese do AAL nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias, em estudo realizado por Wada e colaboradores (1997), cuja finalidade foi verificar a função da proteína transportadora de acil (PTA) em mitocôndrias isoladas de ervilhas, os pesquisadores descobriram que a PTA está envolvida na síntese “de novo” de ácidos graxos e que a principal função desta via é a síntese de precursores do AAL. Em outro estudo, Jordan e Cronan (1997) também encontraram uma transferase de lipoato que utiliza lipoil-PTA, como doador de lipoato

aos complexos de desidrogenase. Um esquema da possível rota biossintética pode ser visualizada na figura 8.

Figura 8: Rota biossintética proposta para o AAL.



Fonte: Navari-Izzo et al., 2002.

### 3.2.2 Potencial Terapêutico do AAL

Muitos estudos estão sendo realizados com a finalidade de verificar o potencial terapêutico do AAL, nos quais foram encontrados excelentes resultados para esta molécula como antioxidante e anti-inflamatório em sistemas *in vitro* e *in vivo* (MOURA et al., 2015). Sabe-se que existe uma relação íntima entre o estresse oxidativo e o processo inflamatório, uma vez que as EROs podem ativar o fator de transcrição NF- $\beta$ , que possui muitas citocinas inflamatórias entre os seus genes alvos. Por outro lado, a inflamação pode induzir a formação de EO, como por exemplo, no caso de produção de EROs por neutrófilos polimorfonucleares (GHEZZI et al., 2018). O estresse oxidativo também desempenha um papel importante na patogênese de muitas outras doenças, como síndrome do desconforto respiratório, artrite reumatoide, distúrbios inflamatórios locais ou sistêmicos, sepse, diabetes, aterosclerose e câncer (ODABASOGLU et al., 2011).

#### 3.2.2.1 Farmacologia Antioxidante do AAL

O AAL é considerado um antioxidante ideal por ser absorvido através da dieta e convertido pelas células e tecidos em uma forma utilizável, pela sua capacidade de interagir

com compostos tanto na membrana celular quanto no citoplasma e sua baixa toxicidade (GORACA et al., 2011). Biewenga e colaboradores (1997) relataram que essa atividade ocorre através de quatro mecanismos possíveis: capacidade de quelar metais, neutralizar diretamente as EROs, regenerar antioxidantes endógenos e reparar sistemas.

A capacidade de quelar metais pode resultar em atividade antioxidante ou pró-oxidante. A atividade antioxidante é obtida quando um complexo é formado no qual o metal é protegido e todos os locais de coordenação para o O<sub>2</sub> são ocupados ou quando a densidade eletrônica é retirada do metal para o quelante, portanto, os elétrons não podem ser transferidos para O<sub>2</sub>. A atividade pró-oxidante é obtida quando os locais de coordenação para O<sub>2</sub> estão presentes e o metal é reduzido. O ligante transfere elétrons para o metal, e os elétrons são transferidos para O<sub>2</sub>. O metal de transição mais importante no estresse oxidativo é o ferro (BIEWENGA et al., 1998). O AAL e o ADHL possuem capacidades distintas de quelar vários íons metálicos, assim, estudos *in vitro* demonstraram que o AAL se liga, preferencialmente aos íons Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup>, mas não pode quelar Fe<sup>3+</sup>, enquanto o ADHL forma complexos com Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> (SHAY et al., 2009).

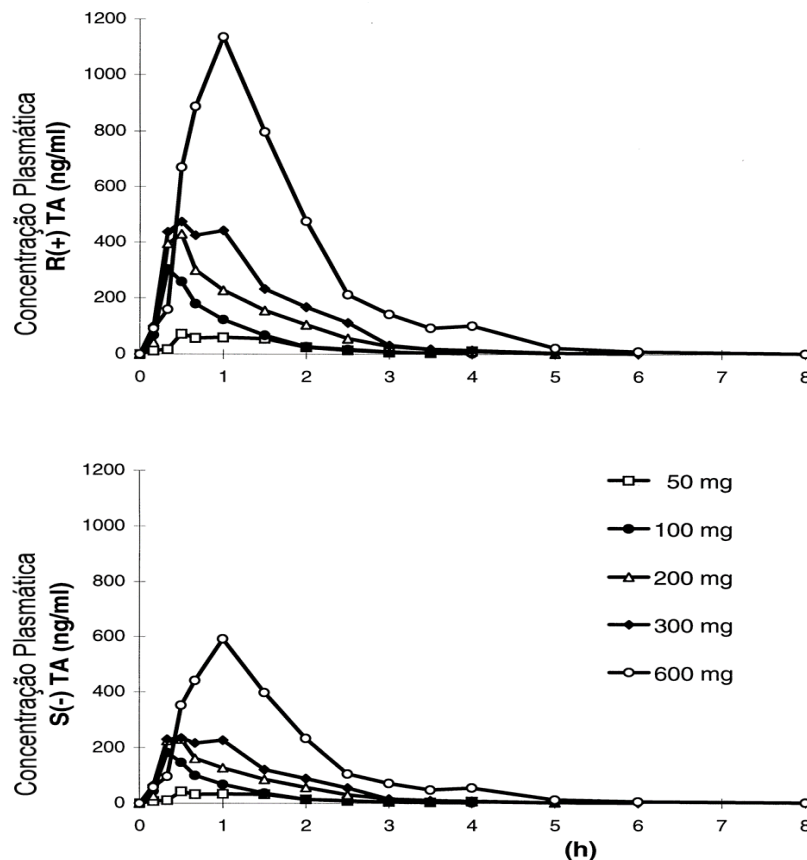
Quimicamente, os grupos tiol de AAL e ADHL os tornam capazes de capturar uma variedade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). O par redox AAL-ADHL apresenta um potencial de redução padrão de -0,32V, tornando o ADHL um dos antioxidantes naturais mais potentes. Estudos já demonstraram a capacidade que esses compostos possuem de neutralizar as EROs, assim, tanto o AAL quanto o ADHL podem eliminar os radicais hidroxila e o ácido hipocloroso, enquanto o AAL também elimina o oxigênio singlete. Entretanto, nenhuma das duas formas é eficaz na eliminação do peróxido de hidrogênio. O AAL, e especialmente o ADHL, tem a capacidade de eliminar o hipoclorito. Além disso, o ADHL parece regenerar outros antioxidantes endógenos (por exemplo, vitaminas C e E) e tem a propriedade de neutralizar os radicais livres sem se tornar um no processo (SHAY et al., 2009).

### 3.2.3 Farmacocinética do AAL

Diversos estudos já foram realizados a fim de verificar a biodisponibilidade de uma dose oral de AAL, revelando que a absorção ocorre rapidamente no trato gastrointestinal, elevando os níveis plasmáticos desse composto. Em trabalho realizado por Breithaupt-Grogler e colaboradores (1999), foi possível observar que as concentrações plasmáticas máximas eram evidentes entre 0,5 e 1 hora após uma dose oral, além disso, os autores também notaram uma

biodisponibilidade diferencial entre os enantiômeros R e S, tanto em relação a concentração plasmática máxima quanto a AUC, sendo que os dois foram significativamente maiores para a forma R quando comparado a forma S (figura 9). Esses resultados foram confirmados por Smith e colaboradores (2004), uma vez que eles também conseguiram observar uma rápida absorção e depuração em indivíduos após a administração oral de AAL.

Figura 9. Absorção e eliminação do AAL por via oral



Fonte: Breithaupt-Grogler e colaboradores (1999)

Dessa forma, pode-se observar que a absorção do AAL ocorre de maneira efetiva ao longo do trato gastrointestinal, sendo observado pelo aumento da concentração plasmática, entretanto, de maneira igualmente rápida, ocorre a eliminação desse composto, sendo reflexo da distribuição para os tecidos, bem como da filtração glomerular e sua excreção renal. A distribuição do AAL ocorre principalmente, mas transitoriamente, no fígado, coração e músculo esquelético (SHAY et al., 2009).

### 3.2.4 Segurança e toxicidade do AAL

Apesar do AAL ser um composto naturalmente sintetizado pelo organismo humano, a sua utilização como suplemento alimentar aumentou de forma significativa e questionamentos acerca de sua segurança e eficácia foram surgindo. Apesar de não ter sido estabelecido um limite superior de consumo em seres humanos, níveis seguros para ingestão oral aguda de AAL foram definidos em animais, com diferenças marcantes a depender da espécie. Assim, foi estabelecida a dose letal que matou 50% da amostra (DL50) em cães, como sendo de 400-500 mg de AAL/kg de peso corporal; em ratos esse valor foi maior, sendo maior que 2000 mg/kg de peso corporal. Nessa dose, alguns ratos demonstraram redução dos sinais de bem-estar, incluindo sedação, apatia, piloereção, postura encurvada e/ou fechamento ocular. Não houve efeito do tratamento observável no ganho de peso corporal ou no exame patológico macroscópico (SHAY et al., 2009).

Em estudo realizado por Cremer e colaboradores (2006) houve avaliação da toxicidade aguda, subcrônica de quatro semanas e análise da genotoxicidade pelo teste do micronúcleo. Os autores verificaram uma  $DL_{50} > 2000$  mg/kg de peso corporal para ratos, confirmando estudos realizados anteriormente, indicando uma baixa toxicidade, entretanto, no ensaio do micronúcleo realizado com camundongos, 6/19 machos e 4/17 fêmeas morreram como resultado do tratamento por sonda oral com AAL na dose de 825 mg/Kg de peso corporal. Isso demonstra que camundongos são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos agudos do AAL quando comparados aos ratos.

Já foram realizados diversos ensaios clínicos para avaliar a eficácia e a presença de efeitos adversos do AAL em seres humanos. Assim, os ensaios clínicos ALADIN (I, II e III), SYDNEY (I e II) e ORPIL utilizaram suplementos de AAL até 2400 mg/dia sem efeitos adversos relatados em comparação ao placebo. O AAL também foi administrado por via intravenosa em doses de 600 mg/dia por três semanas, sem evidência de efeitos colaterais sérios (ZIEGLER et al., 1995). Doses orais de 1800 mg de LA (600 mg t.i.d.) durante 6 meses não provocaram efeitos adversos significativos em comparação com o placebo (ZIEGLER et al., 1999). O LA tem sido utilizado na Alemanha há mais de 50 anos como terapia para a neuropatia e retinopatia diabética (SHAY et al., 2009).

## Capítulo 1

### Utilização do ácido alfa-lipoico como adjuvante no tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais: Uma Prospecção Científica e Tecnológica

Grasielly Rocha Souza<sup>1</sup>, Antônia de Sousa Leal<sup>2</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>3</sup>, Lívio César Cunha Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Grajau-MA

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, Petrolina-PE

#### RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) caracterizam-se pelo caráter crônico e recidivante do processo inflamatório, podendo acometer qualquer segmento do trato gastrointestinal e de forma descontínua, como na doença de Crohn (DC) ou podendo estar limitado ao cólon e reto, ocorrendo de forma contínua, como na retocolite ulcerativa (RCU). Sabe-se que o processo inflamatório está diretamente relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), levando ao estresse oxidativo, que culmina com a liberação de mais mediadores inflamatórios, agravando o quadro clínico. Logo, acredita-se que a utilização de um agente antioxidante seria eficaz na melhora do quadro clínico dessas doenças. Assim, esse estudo foi realizado com o objetivo de verificar, na literatura científica, a utilização do ácido alfa-lipoico (AAL) no tratamento dessas doenças, além disso, realizar uma prospecção tecnológica para verificar se há produtos disponíveis com esse composto para o tratamento das DII. Para isso, foi realizada uma prospecção científica utilizando-se a metodologia PICO nas bases de dados *PubMed*, *Web of Science* e *Scopus*. Foram obtidos 45 artigos nas bases de dados pesquisadas, sendo 10 na plataforma *PubMed*, 17 na *Web of Science* e 18 na *Scopus*. Após a exclusão dos artigos pelos critérios estabelecidos, restaram nove artigos. A maioria dos estudos demonstrou que o AAL é eficaz para o tratamento das DII principalmente por sua ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo uma molécula promissora para utilização como adjuvante no tratamento dessas doenças. A prospecção tecnológica foi realizada nas bases WIPO, Espacenet, USPTO e INPI, sendo verificados 29 depósitos de patentes com a combinação dos termos “alpha-lipoic acid” AND *inflammation*, após análise desses resultados

e adoção dos critérios de exclusão, verificou-se que haviam 10 documentos. Além disso, a combinação dos termos “alpha lipoic acid” AND “inflammatory bowel disease” e “alpha lipoic acid” AND “Crohn disease” resultaram em 1 patente para cada combinação. Logo, essa área possui grande possibilidade de investigação.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Ácido tióctico; Colite Ulcerativa; Doença de Crohn.

## **ABSTRACT**

Inflammatory bowel diseases (IBD) are characterized by the chronic and recurrent character of the inflammatory process, which can affect any segment of the gastrointestinal tract and in a discontinuous way, as in Crohn's disease (DC) or may be confined to the colon and rectum, occurring ulcerative colitis (RCU). It is known that the inflammatory process is directly related to the increase of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RN), leading to oxidative stress, which culminates with the release of more inflammatory mediators, aggravating the clinical picture. Therefore, it is believed that the use of an antioxidant would be effective in improving the clinical picture of these diseases. Thus, this study was carried out with the objective of verifying the use of alpha-lipoic acid (LAA) in the treatment of these diseases in the scientific literature, in addition to carrying out a technological prospection to verify if there are products available with this compound for the treatment of IBD. For this, a scientific prospection was carried out using the PICO methodology in PubMed, Web of Science and Scopus databases. There were 45 articles in the databases searched, 10 on the PubMed platform, 17 on the Web of Science and 18 on Scopus. After articles were excluded by the established criteria, nine articles remained. Most studies have demonstrated that AAL is effective in the treatment of IBD mainly because of its anti-inflammatory and anti-inflammatory action and is a promising molecule for use as an adjuvant in the treatment of these diseases. Technological prospecting was carried out at the WIPO, Espacenet, USPTO and INPI databases. Twenty-nine patent deposits were verified with the combination of the terms "alpha-lipoic acid" AND inflammation, after analyzing these results and adopting the exclusion criteria. there were 10 documents. In addition, the combination of the terms "alpha lipoic acid" AND "inflammatory bowel disease" and "alpha lipoic acid" AND "Crohn disease" resulted in 1 patent for each combination. Therefore, this area has great possibility of investigation.

**Keywords:** Antioxidant; Thioctic acid; Ulcerative Colitis; Crohn's disease.



## 1 INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn e a colite ulcerativa são desordens inflamatórias crônicas e recidivantes que acometem o trato gastrointestinal. Podem ser denominadas coletivamente como doenças inflamatórias intestinais (DII), vale ressaltar que outras patologias, menos comuns, também estão incluídas nesse grupo (FERRAZ, 2016).

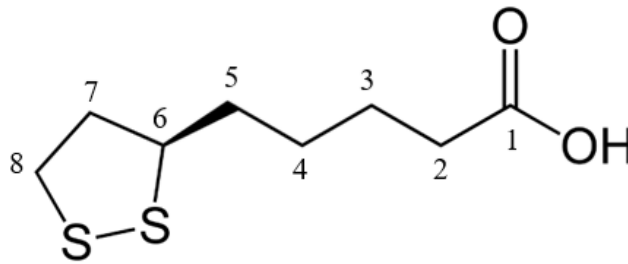
De modo geral, as DII possuem como sintomatologia desconforto ou dor abdominal, diarreia seguida de sangramento, febre, perda de peso, entre outras. Histologicamente, pode-se observar a formação de abcesso com distorção das criptas e infiltração de células do sistema imune, principalmente neutrófilos e linfócitos (BAUMGART & CARDING, 2007).

A realização de estudos clínicos e experimentais demonstrou que tanto o início como a progressão dessas doenças ocorre de modo multifatorial, estando envolvidos o fator genético, o sistema imune do indivíduo, além de fatores ambientais. Sabe-se que nos indivíduos com envolvimento do fator genético, o processo inflamatório crônico resulta na disfunção da barreira mucosa, podendo levar a invasão de microrganismos e ativação de uma resposta imune inadequada, com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs/ERNs) (BRENNAN et al., 2013).

O aumento da produção de EROs e ERNs possui um papel central no processo inflamatório, uma vez que a liberação desses compostos ocorre através da ativação de células pró-inflamatórias e de enzimas oxidativas, como NADPH oxidase, mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase induzível (NOSi). Entretanto, se houver um desequilíbrio entre esses produtos e os mecanismos de defesa antioxidantes, pode haver aumento da lesão, redução dos níveis de agentes antioxidantes, como a glutathione, ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), resultando na ativação de mais células pró-inflamatórias (MAZZOLIN, 2013).

Nesse contexto, a utilização de agentes antioxidantes como adjuvante no tratamento das DII tem mostrado melhora significativa das manifestações clínicas (VONG et al., 2012). O ácido alfa-lipoico (AAL) é um composto organossulfurado derivado do ácido octanóico, caracteriza-se pela presença de oito átomos de carbono, um grupo ácido carboxílico em uma extremidade e um dissulfeto redox na outra, formando um anel ditiolano (figura 1). O carbono na posição seis possui quatro ligantes distintos, sendo denominado de assimétrico, constituindo um centro quiral, logo é um composto opticamente ativo, ou seja, consegue desviar o ângulo da luz polarizada (MOURA et al., 2015).

Figura 1. Molécula de AAL.



Fonte: Autoria própria.

Muitos estudos estão sendo realizados com a finalidade de verificar o potencial terapêutico do AAL, nos quais foram encontrados excelentes resultados para esta molécula como antioxidante e anti-inflamatório em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Sabe-se que o processo inflamatório está diretamente relacionado ao desequilíbrio redox e, conseqüentemente, com a patogênese de diversas doenças, tais como: o câncer, as complicações do diabetes, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, como a epilepsia, entre outras (MOURA et al., 2015).

Nesse contexto, essa revisão foi realizada com o objetivo de verificar a utilização do AAL como tratamento principal ou adjuvante nas DII em ensaios pré-clínicos através da produção científica e tecnológica.

## 2 METODOLOGIA

A prospecção científica foi realizada utilizando a metodologia PICO (Problema, Interesse e Contexto), direcionada para estudos pré-clínicos, em que foi formulada uma pergunta direcionadora da pesquisa e, a partir disso, foram retiradas as palavras-chave correspondentes a cada termo.

Assim, após avaliar o problema a ser resolvido, formulou-se a seguinte pergunta: “O ácido alfa-lipoico, por apresentar propriedades antioxidantes relevantes, pode ser utilizado como adjuvante no tratamento das DII?”. Os descritores e/ou palavras-chave selecionadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Descritores e/ou palavras-chave selecionados, segundo a metodologia PICO.

<i>AND</i>		
<b>PROBLEMA</b>	<b>INTERESSE</b>	<b>CONTEXTO</b>
<i>Thioctic acid</i> <i>OR</i> <i>Alpha lipoic acid</i> <i>Lipoic acid</i>	<i>Antioxidants</i> <i>OR</i> <i>Free radicals</i> <i>Oxidative stress</i>	<i>Inflammatory bowel disease</i> <i>OR</i> <i>Mucous colitis</i> <i>Irritable colon</i> <i>Crohn disease</i> <i>Crohn's enteritis</i> <i>Granulomatous Colitis</i> <i>Colitis</i>

Fonte: Autoria própria.

A pesquisa foi realizada para cada palavra-chave individualmente e os resultados foram combinados com os operadores booleanos “OR” dentro de cada coluna e “AND” entre as colunas. Foram avaliados os artigos das bases de dados *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, sendo realizada em agosto de 2017. Vale ressaltar que os estudos duplicados e aqueles com assuntos divergentes no título e/ou resumo foram excluídos.

Para a realização da prospecção tecnológica, foram utilizadas as palavras-chave dispostas na Tabela 2. As buscas foram realizadas nas bases de dados de patentes WIPO, Espacenet, USPTO e INPI, verificando a presença dos termos no título e/ou resumo. Foram excluídas as patentes duplicadas e aquelas com assuntos divergentes do objetivo da pesquisa.

Tabela 2. Palavras-chave utilizadas na prospecção tecnológica.

---

“Thioctic acid”
“Thioctic acid” AND <i>inflammation</i>
“Thioctic acid” AND “Inflammatory bowel disease”
“Thioctic acid” AND “mucous colitis”
“Thioctic acid” AND “irritable colon”
“Thioctic acid” AND “Crohn disease”
“Thioctic acid” AND “Inflammatory bowel disease ” AND “oxidative stress”
“Thioctic acid” AND inflammation AND “stress oxidative”
“Alpha-lipoic acid”
“Alpha-lipoic acid” AND <i>inflammation</i>
“Alpha-lipoic acid” AND “Inflammatory bowel disease ”
“Alpha-lipoic acid” AND “mucous colitis”
“Alpha-lipoic acid” AND “irritable colon”
“Alpha-lipoic acid” AND “Crohn disease”
“Alpha-lipoic acid” AND “ <i>Inflammatory bowel disease</i> ” AND “oxidative stress”
“Alpha-lipoic acid” AND inflammation AND “stress oxidative”

---

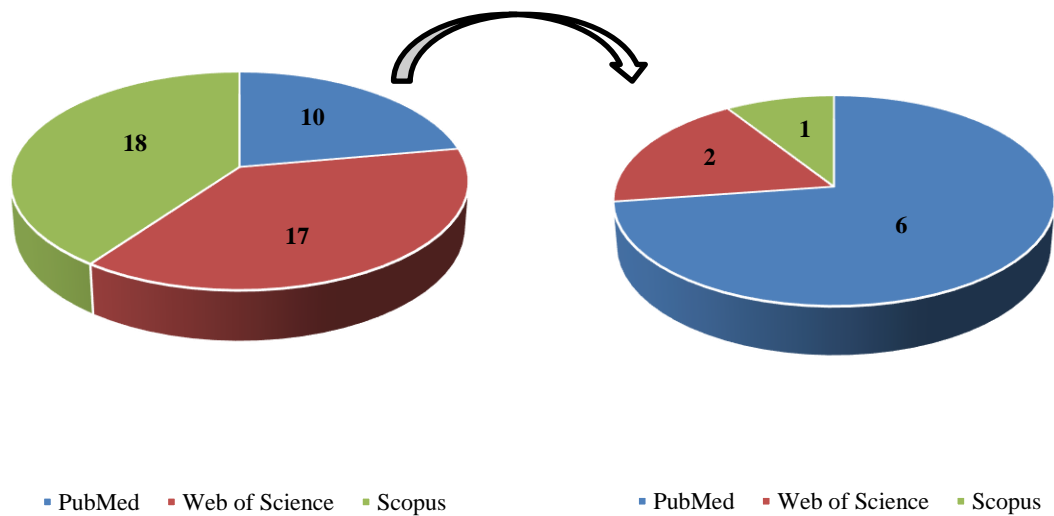
Fonte: Autoria própria.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Prospecção Científica

Foram obtidos 45 artigos nas bases de dados pesquisadas, sendo 10 na plataforma *PubMed*, 17 na *Web of Science* e 18 na *Scopus*. Após a exclusão dos artigos duplicados e dos que estavam fora do objetivo do estudo, restaram nove artigos. A figura 2 mostra a quantidade de trabalhos antes e após a adoção dos critérios de exclusão.

Figura 2. Artigos selecionados pela metodologia PICO antes e após a seleção pelos critérios inicialmente selecionados.



Fonte: Autoria própria.

O primeiro trabalho publicado com a finalidade de verificar uma possível atividade anti-inflamatória e antioxidante do AAL na colite ulcerativa data de 2007, mostrando ser um campo de pesquisa relativamente novo. Além disso, pode-se observar que todos os trabalhos avaliaram a utilização do AAL nas DII utilizando apenas modelos animais para colite ulcerativa envolvendo o cólon, com exceção do trabalho realizado por Kolgazi e colaboradores (2007), que induziu ileíte e colite. A indução da inflamação foi realizada com os agentes químicos sulfato de sódio dextran (SSD), ácido acético ou ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Os principais resultados estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Principais resultados das publicações científicas sobre a utilização do AAL nas DII.

<b>Autores</b>	<b>Situação clínica</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Principais resultados</b>
Kangawa et al., 2017	Carcinoma colorretal induzido por azoximetano/sulfato de sódio dextran (SSD); proliferação celular em células de câncer de cólon e em células epiteliais da mucosa com colite aguda induzida por SSD.	Camundongos fêmeas BALB/c com 4 semanas	Antocianina 5,0% Cilostazol 0,3%  Isoquercitrina modificada enzimaticamente 1,5%  Ácido alfa-lipoico 0,2%  Foram adicionados na alimentação dos animais	O AAL não demonstrou atividade anti-inflamatória e nem preveniu a proliferação celular.
Kangawa et al., 2016	Colite induzida por 5% de SSD	Camundongos fêmeas BALB/c com 4 semanas	Cilostazol 0,3%  Isoquercitrina modificada enzimaticamente 1,5%  Ácido alfa-lipoico 0,2%  Foram adicionados na alimentação dos animais	Houve supressão da diarreia em todos os grupos tratados, o AAL reduziu os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de atuar na modificação da adesão celular, regulação do citoesqueleto, proliferação celular e apoptose. Foi capaz de prevenir o edema submucoso e a infiltração de células inflamatórias.
Moura et al., 2016	Colite ulcerativa leve induzida com 2% de SSD	Ratos machos Wistar adultos	AAL 100 mg/kg/dia  N-acetilcisteína (NAC) 100 mg/kg/dia  AAL + NAC 100 mg/Kg/dia	NAC fígado: $\uparrow$ SOD NAC cólon: $\downarrow$ MDA, MPO, SOD, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> AAL fígado: $\uparrow$ MDA, CAT, GPx e GSH AAL cólon: sem alterações

			Foram adicionados na alimentação dos animais.	NAC + AAL fígado: ↑ TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$ , H2O2 NAC + AAL cólon: ↑ TNF- $\alpha$ e IL-10
Piechota-Polanczyk et al., 2016	Colite ulcerativa induzida com 4% de SSD	Camudongos machos BALBc/C57	Grupo 1: controle Grupo 2: DSS 4% Grupo 3: AAL 25 mg/kg (i.p) 21 dias Grupo 4: AAL 50 mg/kg (i.p) 21 dias Grupo 5: DSS 4% + AAL 25 mg/kg por 14 dias Grupo 6: DSS 4% + 50 mg/kg por 14 dias	↓ Danos ao cólon, IL-6, relação p-eNOS/eNOS total ↑ MPO, cav-1, expressão de OH-1 e p-eNOS/eNOS total O AAL não influenciou nos níveis das citocinas pró-inflamatórias
El-Gowelli et al., 2015	Colite ulcerativa induzida por ácido acético (AA) 5% v/v	Ratos machos com 6 meses de idade	Grupo 1: Controle negativo Grupo 2: AA 5% v/v 1mL/rato/dia via intra-retal Grupo 3: AA + AAL 35 mg/kg (ip) Grupo 4: AA + ciclosporina A 5 mg/kg (sc)	AAL impediu a perda de peso corporal; relação peso/comprimento do cólon normal; score normal para a formação de úlceras ↑ GSH, ↓ MDA e restaurou a atividade da SOD e CAT Concentração plasmática de PCR e TNF- $\alpha$ normais ↑ Expressão gênica de VEGF, TGF- $\beta$ 1 e miR-21 e ↓ de COX-2

			Grupo 5: AA + AAL+ Ciclosporina A	A associação com a ciclosporina não apresentou efeitos benéficos.
Sun et al., 2015	Colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)	Camundongos machos BALB/c	Grupo 1: Controle  Grupo 2: AAL 80 mg/Kg  Grupo 3: Colite induzida por TNBS  Grupo 4: AAL 80 mg/Kg + colite	Facilitou a recuperação das alterações no cólon, com ↑ peso corporal, ↓ índice de massa do cólon e do score histopatológico  Inibiu a apoptose - ↑ Bcl-2 e ↓ Bax e atividade das caspases 3 e 9  ↓ MDA, NO, iNOS e ↑ atividade da SOD e o teor de GSH  Inibiu a fosforilação da ERK, JNK e p38
Trivedi & Jena, 2013	Colite ulcerativa induzida por SSD	Camundongos machos Swiss	Grupo 1: água por 28 dias  Grupo 2: AAL 80 mg/Kg por 28 dias  Grupo 3: SSD 3% por 7 dias, remissão por 14 dias e retorno por 7 dias  Grupo 4: SSD 3% + AAL 20 mg/kg por 7 dias, remissão por 14 dias e retorno por 7 dias  Grupo 5: SSD 3% + AAL 40 mg/kg por 7 dias, remissão por 14 dias e retorno por 7 dias	↓ gravidade da colite ulcerativa pela ↓ da inflamação, EO, fibrose, dano ao DNA e citotoxicidade no cólon  ↓ permeabilidade intestinal e do nível plasmático de LPS.



			Grupo 6: SSD 3% + AAL 80 mg/kg por 7 dias, remissão por 14 dias e retorno por 7 dias	
Sehirli et al., 2008	Colite ulcerativa induzida por TNBS	Ratos Sprague-Dawley dos dois sexos	Grupo 1: Controle – 1mL de salina via intra-retal  Grupo 2: Colite induzida por TNBS + AAL 80 mg/Kg vo  Grupo 3: Colite induzida por TNBS + salina vo	<p>↓ Peso úmido do cólon, score das lesões macroscópicas, LDH, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> e IL-6 e ↑ capacidade antioxidante total;</p> <p>Análise histopatológica – ↓ Edema e congestão dos vasos, mas as células PMN estavam presentes</p> <p>↓ MDA, MPO, fragmentação do DNA e ↑ GSH</p> <p>Não reverteu o acúmulo de colágeno</p>
Kolgazi et al., 2007	Colite ulcerativa induzida por TNBS	Ratos Sprague-Dawley	Grupo 1: Ileíte - AAL 25 mg/Kg ip  Grupo 2: Colite - AAL 25 mg/Kg ip	Reverteu os scores macroscópicos, as alterações microscópicas e a peroxidação lipídica, com ↓ MDA e ↑ de GSH, prevenção do aumento de MPO e CL nos tecidos acometidos.

Fonte: Autoria própria

Dessa forma, pode-se observar que o AAL apresentou resultados relevantes nos modelos avaliados, reduzindo os mediadores inflamatórios e/ou do estresse oxidativo, além de apresentar outras funções relevantes, como anti-apoptótica, e na prevenção de danos ao DNA. De modo geral, as atividades terapêuticas atribuídas ao AAL devem-se às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários modelos animais para avaliar as DII. Embora nenhum deles consiga mimetizar a complexidade dessas doenças nos seres humanos, são válidos para avaliar alguns aspectos da patogênese, bem como as opções terapêuticas. Os modelos que utilizam agentes químicos para induzir colite ou ileíte em murinos são os mais utilizados. Vale ressaltar que o SSD é utilizado nos modelos de colite por acumular-se no cólon, perturbando a barreira epitelial e induzindo uma resposta inflamatória secundária, caracterizada pela produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (PERSE; CERAR, 2012).

O modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) através da administração intracolônica de soluções de TNBS diluídas em etanol tem a capacidade de gerar um processo inflamatório difuso no cólon. Morfologicamente, caracteriza-se pelo aumento da infiltração leucocitária, com formação de edema e ulceração, podendo evoluir para um estágio crônico, sendo semelhante à doença de Crohn. Acredita-se que o processo tenha início com o etanol, uma vez que este desorganiza a barreira mucosa, permitindo a passagem do TNBS através da membrana, o qual se liga a substâncias de alto peso molecular, como proteínas de superfície celular no tecido colônico. Dessa forma, há formação de um processo inflamatório e de outras reações imunológicas, que por sua vez podem levar à geração de EROs e outros mediadores (por exemplo, citocinas e prostaglandinas). Assim, o desenvolvimento de novos fármacos capazes de sequestrar esses radicais livres e de estabilizar a estrutura das membranas proporcionaria novas oportunidades terapêuticas (SEHIRLI et al., 2008).

Sabe-se que a colite ulcerativa está associada ao aumento dos níveis plasmáticos de vários marcadores do processo inflamatório, como a mieloperoxidase (MPO), interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator nuclear kappa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Ademais, o estresse oxidativo está intimamente relacionado ao processo inflamatório, também sendo capaz de alterar alguns marcadores sensíveis a mudança redox do meio, como o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e os dois processos são capazes de gerar fibrose e danos ao DNA em diferentes órgãos (TRIVEDI; JENA, 2013).

No trabalho realizado por Kangawa e colaboradores (2017), a finalidade foi avaliar a capacidade de prevenção do fármaco inibidor da fosfodiesterase-3, cilostazol (CZ), e dos antioxidantes, isoquercitrina modificada enzimaticamente (EMIQ) e AAL, contra a colite induzida por SSD e contra o câncer colorretal induzido por azoximetano (AOM) em camundongos. Os antioxidantes foram avaliados por apresentar atividade anti-inflamatória.

Além disso, avaliou-se uma possível atividade anticâncer direta, por meio da análise da atividade proliferativa em linhagens celulares de câncer de cólon e em células epiteliais da mucosa com colite aguda induzida por SSD.

Os resultados demonstraram que o AAL não apresentou atividade satisfatória por ausência de atividade anti-inflamatória, contrapondo-se ao trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisas no ano anterior (Kangawa et al., 2016). Eles atribuíram esse resultado negativo à forma de administração do composto, que foi adicionado a alimentação dos animais. Sabe-se que o AAL possui sensibilidade a luz e a umidade, logo a molécula pode ter sofrido degradação e, conseqüentemente, a perda da atividade.

O trabalho realizado por Kangawa e colaboradores (2016), com o objetivo de verificar a atividade anti-inflamatória do AAL em modelo de colite induzida por SSD em camundongos, foi possível observar que as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  tiveram os seus níveis plasmáticos reduzidos com a manutenção da produção de mucina, havendo prevenção da degeneração epitelial e da necrose. Além disso, houve redução do edema submucoso e do infiltrado de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, na lâmina própria e na submucosa. Uma análise por *microarray* demonstrou valores estatisticamente significativos para a regulação dos genes responsáveis pela apoptose, sinalização de quimiocinas, replicação de DNA, adesão focal, controle do ciclo celular G1 a S, sinalização de IL-3 e IL-5, adesão celular mediada por integrina, sinalização MAPK, sinalização TLR, sinalização de interferon tipo II, entre outros. Esses dados demonstram que o AAL apresentou atividade anti-inflamatória no modelo utilizado. Vale ressaltar que não foram encontrados efeitos adversos no fígado dos animais.

Em 2016, Moura e colaboradores investigaram uma forma mais branda da colite ulcerativa, induzindo em ratos com SSD 2%, com a finalidade de mimetizar a forma da doença mais prevalente na população. Além disso, os autores avaliaram os danos hepáticos causados pelas DII e se o tratamento com os antioxidantes era capaz de preveni-los. Os grupos foram tratados com 100 mg/Kg/dia AAL, N-acetilcisteína 100 mg/Kg/dia e AAL + NAC 100mg/Kg/dia de cada composto, em que estes foram adicionados na alimentação dos animais. Foram avaliados marcadores do processo inflamatório e do estresse oxidativo. Dessa forma, foi

possível observar que não houve aumento dos marcadores da inflamação, TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$ , no grupo com colite sem tratamento, os autores atribuem esse resultado ao tipo de lesão, logo tornou-se inviável avaliar o efeito anti-inflamatório nesse modelo. Entretanto, a combinação de AAL + NAC promoveu aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , indicando que o processo inflamatório foi maior no grupo que recebeu esse tratamento.

Enquanto que no trabalho de 2016, realizado por Piechota-Polanczyk e colaboradores, o AAL apresentou uma atividade anti-inflamatória discreta em modelo de colite ulcerativa induzida por 4% de SSD. Nesse estudo, os tratamentos com AAL foram realizados nas doses de 25 e 50 mg/Kg e a administração foi realizada pela via intraperitoneal, por 21 dias para os grupos sem colite e por 14 dias para os grupos com colite. Os autores verificaram que houve redução dos danos ao cólon nos grupos com colite tratados com AAL, mas os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A e IL-23 não foram reduzidos, logo investigaram mecanismos antioxidantes para justificar a redução de danos ao cólon.

No trabalho realizado por El-Gowell e colaboradores (2015), os resultados foram bastante promissores para o AAL, mostrando relevantes atividades anti-inflamatória e antioxidante. A colite ulcerativa foi induzida com ácido acético 5% (v/v), por meio de administração via retal por 3 dias consecutivos e os animais foram tratados com AAL 35 mg/Kg com administração intraperitoneal, ciclosporina A (CSA) 5 mg/Kg pela via subcutânea e a combinação dos dois tratamentos. A CSA é um imunomodulador normalmente utilizado no tratamento das DII para evitar a remissão dos sintomas. Como o AAL é bastante utilizado como suplemento alimentar, estando presente em diversas formulações, os autores resolveram investigar o sinergismo entre essas duas substâncias na colite ulcerativa.

O AAL apresentou atividade relevante em todos os protocolos experimentais avaliados, assim, os animais do grupo tratado com este composto não apresentaram perda de peso, as fezes permaneceram normais e o percentual de mortalidade foi o menor entre os grupos com colite. Além disso, avaliou-se a relação peso/comprimento do cólon, um indicador da presença de edema, não houve aumento no grupo tratado apenas com AAL, assim como foi possível observar uma redução significativa de úlceras no cólon. Com relação aos marcadores da inflamação, houve manutenção dos níveis normais de proteína C reativa e de TNF- $\alpha$  e aumento da expressão gênica de VEGF, TGF- $\beta$ 1 e miR-21 e redução da expressão de COX-2. Também houve redução de todos os marcadores do estresse oxidativo. De forma surpreendente, a associação entre o AAL e a CSA reverteu todos os efeitos benéficos dos dois compostos quando utilizados separadamente, provavelmente por aumentar a produção de NO e a expressão de COX-2 e miR-210 e por reduzir a expressão de VEGF e miR-21.

No trabalho realizado por Sun e colaboradores em 2015, a colite ulcerativa foi induzida com TNBS através de administração via intra-retal. Foram avaliados quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido. Assim, o grupo 1 era o controle, recebeu DMSO 2%, o grupo 2 recebeu apenas AAL 80 mg/Kg, o grupo 3 teve colite ulcerativa induzida com TNBS e o grupo 4 teve indução da colite, mas foram tratados com 80 mg/Kg de AAL. Com relação aos sinais clínicos da doença, houve melhora significativa no grupo 4, onde os animais reduziram significativamente a perda de peso, em relação ao grupo 3, além disso, houve reversão do espessamento da parede do cólon, dos altos níveis de infiltração de células inflamatórias na mucosa e da perda de células caliciformes, com redução do índice de massa do cólon.

Além disso, avaliou-se o papel do AAL na proteção contra o estresse oxidativo através dos marcadores SOD, NO, GSH, MDA e expressão da proteína iNOS. No grupo 3, como já era esperado, houve aumento dos níveis de NO e de MDA e redução da atividade de SOD e dos níveis de GSH. Todos esses resultados foram revertidos com o uso do AAL, logo os marcadores NO e MDA foram reduzidos, a SOD teve a sua atividade aumentada e o nível de GSH foi restaurado, indicando que o AAL reduziu o estresse oxidativo induzido por TNBS.

Esse grupo de autores também investigaram se o AAL era efetivo na inibição da apoptose na colite ulcerativa induzida por TNBS, por meio da quantificação das proteínas bax, bcl-2 e caspases 3 e 9. Sabe-se que a apoptose é um mecanismo programado de morte celular, controlado por genes, sendo um dos principais contribuintes da colite ulcerativa. Foi possível observar que o grupo com colite apresentou expressão aumentada da bax e das caspases 3 e 9 e redução da bcl-2, enquanto que no grupo com colite que recebeu tratamento com 80 mg/Kg de AAL houve reversão desses efeitos, ou seja, a expressão da bax e das caspases 3 e 9 foram reduzidas e da bcl-2 aumentada. Dessa forma, o tratamento com AAL foi capaz de atenuar a apoptose no cólon dos animais com colite ulcerativa tratados com TNBS.

Ademais, o grupo de pesquisas verificou se a atuação do AAL ocorre através da via de sinalização da MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno). Esta proteína está envolvida em numerosas sinalizações fisiológicas e patológicas e responde à proliferação celular e a regulação da apoptose. Através de análise por *western blot*, pode-se observar que houve aumento da fosforilação da cinase regulada por sinal extracelular (ERK), cinase N-terminal de C-Jun (JNK) e da p38 no grupo com colite, enquanto que no grupo com colite tratado com AAL houve redução na fosforilação das três proteínas, a inibição da MAPK pode contribuir, em parte, para os efeitos protetores.

No trabalho realizado por Trivedi & Jena (2013), os camundongos receberam SSD 3% (p/v) dissolvidos na água por sete dias, logo após receberam água potável por 14 dias seguidos,

retornando ao tratamento com SSD por mais sete dias, encerrando os dois ciclos de tratamento. O AAL foi administrado em dois ciclos, sendo um co-tratamento e um pós-tratamento nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg/dia. O objetivo principal foi verificar os mecanismos envolvidos na proteção mediada pelo AAL contra os danos locais e sistêmicos associados a colite ulcerativa em camundongos.

Os resultados demonstraram que o AAL conseguiu reduzir a gravidade da colite ulcerativa pela diminuição da inflamação, estresse oxidativo, fibrose, dano ao DNA e citotoxicidade no cólon de camundongos através da modulação de vários alvos moleculares como NF- $\kappa$ B, COX-2, IL -17, STAT3, Nrf2, NADPH: quinona oxidoreductase-1 (NQO-1), MMP-9 e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF). Além disso, reduziu a permeabilidade intestinal elevada induzida por UC e o nível plasmático de LPS, que foi associado com uma redução significativa na inflamação sistêmica e genotoxicidade.

Em 2008, Sehirli e colaboradores, realizaram um trabalho para verificar se o AAL apresentava algum efeito protetor contra a colite ulcerativa induzida por TNBS, em ratos, administrado por via intra-colônica. O tratamento com AAL foi realizado por via oral na dose de 100 mg/Kg/dia por três dias. No quarto dia, os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram retiradas para análise dos níveis de lactato desidrogenase (LDH), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e capacidade antioxidante total. Além disso, os segmentos distais do cólon foram removidos para classificação macroscópica das lesões, enquanto outros segmentos foram congelados para medida dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH), a atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e o conteúdo de colágeno.

Os resultados mostraram que o tratamento com AAL conseguiu reduzir, de forma significativa, as lesões macroscópicas induzidas pelo TNBS, os níveis de LDH, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Além disso, houve prevenção do aumento dos níveis de MDA e os níveis de GSH foram preservados, da mesma forma que a atividade da enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e o conteúdo de colágeno. Dessa forma, esses dados sugerem que o tratamento com AAL seja capaz de atenuar a gravidade do dano ao cólon causados pelo estresse oxidativo, ao mesmo tempo que reduz as citocinas pró-inflamatórias séricas, sugerindo que o AAL possui um poderoso efeito anti-inflamatório e antioxidante no tecido inflamado.

O primeiro trabalho publicado acerca do tema foi em 2007 por Kolgazi e colaboradores, cujo objetivo foi avaliar o perfil do AAL em dois modelos de inflamação intestinal, ileíte e colite em ratos, como resposta a uma administração intraluminal de TNBS. Para isso, foi realizada uma laparotomia para o modelo de ileíte, em que o TNBS foi administrado na alça ileal terminal e o tratamento com AAL (25 mg/Kg) foi realizado por via intraperitoneal, duas

vezes por dia, e teve início 5 minutos após a indução da inflamação, sendo realizado por três dias consecutivos. A colite foi induzida pela administração intra-retal de 1 mL de uma solução de TNBS em etanol e o tratamento com AAL (25 mg/Kg) foi realizado de maneira semelhante ao grupo com ileíte.

As amostras do íleo e do cólon foram removidas e classificadas, quanto às lesões, de forma macroscópica e através de uma avaliação histológica em “scores” pré-estabelecidos. Além disso, amostras dos tecidos foram armazenados em  $-70^{\circ}\text{C}$  para medida dos níveis de MDA, GSH e atividade da mieloperoxidase. Além disso, a formação de EROs nos tecidos foi monitorada com luminol ou lucigenina pelo método de quimioluminescência. Foi possível observar que os grupos tratados com AAL tiveram uma melhora estatisticamente significativa com relação ao grupo com ileíte ou colite sem tratamento, tanto quanto as lesões macroscópicas como quanto a avaliação histológica. Além disso, houve redução significativa dos níveis de MDA, GSH, da atividade da MPO e dos níveis de luminol e lucigenina.

### **3.2 Prospecção Tecnológica**

A prospecção tecnológica foi realizada a fim de verificar a situação do depósito de patentes com o AAL na inflamação, assim como nos tratamentos das DII. Para isso, foram utilizados diferentes termos como meio de ampliar os possíveis resultados, que estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos na prospecção tecnológica.

Termos pesquisados	WIPO	WIPO	ESPACENET	USPTO	USPTO	INPI	Total
	título	resumo		título	resumo		
“Thioctic acid”	114	270	311	18	27	-	740
“Thioctic acid” AND inflammation	-	-	-	-	-	-	-
“Thioctic acid” AND “inflammatory bowel disease”	-	-	-	-	-	-	-
“Thioctic acid” AND “mucous colitis”	-	-	-	-	-	-	-
“Thioctic acid” AND “irritable colon”	-	-	-	-	-	-	-
“Thioctic acid” AND “Crohn disease”	-	-	-	-	-	-	-
“Alpha-lipoic acid”	295	648	970	28	77	5	2023
“Alpha-lipoic acid” AND inflammation	1	13	15	-	-	-	29
“Alpha-lipoic acid” AND “inflammatory bowel disease”	-	10	1	-	-	-	11
“Alpha-lipoic acid” AND “mucous colitis”	-	-	-	-	-	-	-
“Alpha-lipoic acid” AND “irritable colon”	-	-	-	-	-	-	-
“Alpha-lipoic acid” AND “Crohn disease”	-	9	-	-	-	-	9

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar 2763 patentes depositadas com os termos “Thioctic acid” e “alpha-lipoic acid”, mostrando que esse composto possui grande potencial para utilização em diversas áreas do conhecimento. Contudo, ao avaliar a sua ação na inflamação e, mais especificamente, nas DII, verifica-se uma redução significativa. Isso demonstra que estudos nessa área ainda são bastante necessários.



A combinação dos termos “alpha-lipoic acid” AND *inflammation* resultou em 29 depósitos de patentes nas bases WIPO e Espacenet, entretanto, após análise desses resultados e adoção dos critérios de exclusão, verificou-se que haviam apenas 10 documentos. Além disso, a combinação dos termos “alpha lipoic acid” AND “inflammatory bowel disease” e “alpha lipoic acid” AND “Crohn disease” resultaram em 1 patente para cada combinação. Os principais resultados estão no Quadro 2.

Pode-se observar que apenas dois documentos tratam efetivamente da utilização do AAL nas DII, através das suas propriedades antioxidantes. Os demais depósitos tratam da sua utilização para outras desordens inflamatórias. Isso demonstra que existe uma grande lacuna a ser preenchida nessa área, uma vez que a prospecção científica demonstrou o potencial que esse composto possui na redução dos sintomas dessas doenças.

Quadro 2. Patentes depositadas com o AAL na inflamação e nas DII.

Nº da patente/ano de depósito	Inventores	País de proteção	CIP	Título	Inovação
DE000004313428/1993	Rabien Margarethe	DE	A61K	<i>Combination patente comprising alpha-lipoic acid + pantothenic acid (or dexpanthenol) against inflammations, skin diseases of inflammatory + allergic nature, poorly healing wounds.</i>	Uma combinação do AAL com ácido pantotênico para utilização nas doenças de pele, distúrbios dos órgãos formadores de pêlos, distúrbios funcionais do trato gastrointestinal, queimaduras e feridas de extração, úlceras e fissuras e outras feridas de cura deficiente.
DE4327462/1993	Weischer Carl Heinrich e colaboradores.	DE	A61K	<i>N-Acetyl-p-aminophenol derivatives for controlling pain.</i>	Utilização dos ésteres do N-acetil-p-aminofenol com ácidos carboxílicos contendo enxofre, tais como cisteína ou derivados de cisteína, como acetilcisteína ou carbocisteína ou AAL, ou ácido di-hidrolipóico, ou os metabólitos do AAL, como o ácido 6,8-bisnortetralóico, ácido tetranorlipóico ou as formas R e S do AAL na forma oxidada e reduzida e os seus sais para produzir composições farmacêuticas com efeitos analgésicos e antipiréticos para a terapia da dor.
US5728735/1998	Heinz, Ulrich e colaboradores.	US	A61K	<i>Pharmaceutical composition containing R-alpha-lipoic acid or S-alpha-lipoic acid as active ingredient.</i>	Composições farmacêuticas e processos para a sua preparação contendo ácido R-AAL ou S-AAL ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas possuem atividade citoprotetora, sendo adequadas para o combate da dor e da inflamação.

WO200100194/2001	Jacobs, Robert H.	AU	A61K	<i>A method for optimizing immune activity in the treatment of auto-immune diseases and chronic immune conditions.</i>	São descritos um método e uma composição eficazes na redução da inflamação, da atividade viral nos hepatócitos e dos radicais livres carcinogênicos e para melhorar o sistema imunológico de indivíduos infectados com HIV/Aids, melhorando os mecanismos corporais, incluindo comunicação intracelular, regulação gênica, reparação de genes e efeitos de membrana.
KR20040097820/2004	Cho, You Sook e colaboradores.	KR	A61P	<i>Composition containing alpha lipoic acid as effective ingredient to prevent and treat asthma without adverse side effect.</i>	Trata-se de uma composição contendo AAL como ativo eficaz na redução da inflamação alérgica nos brônquios, dos eosinófilos e da imunoglobulina E. Portanto, é eficaz na prevenção e no tratamento da asma, sem efeito colateral.
US2007072937/2007	Park Sung-Kwang; Kim Won; Lee Sik; Moon Sang-Ok	US	A61K	<i>Pharmaceutical composition comprising alpha-lipoic acid for inflammatory diseases.</i>	Tem-se uma composição farmacêutica contendo o AAL como um ingrediente ativo. O AAL é um inibidor da expressão de fractalcina e exibe efeitos de alívio da inflamação devido a endotoxemia, reduzindo a expressão de fractalcina e a ligação de células endoteliais a monócitos.
KR20070108973/2007	Cho, Dong Lyun	KR	A61F	<i>Alpha-lipoic acid coating method of a stent for a blood vessel which restrains sclerosis by using the action of alpha-lipoic acid applied on the stent.</i>	Um método de revestimento de um stent para vaso sanguíneo com AAL com a finalidade de reduzir a oxidação de um vaso sanguíneo e a inflamação.
US20070166321/2007	Villeponteau, Bryant Richard	US	A61K	<i>Compositions and methods for reducing cholesterol and inflammation.</i>	Uma composição que promove uma redução potente do colesterol, minimizando os efeitos colaterais prejudiciais ao fígado, músculos e neurônios, além de reduzir a inflamação

					sistêmica crônica, que é um determinante de doença cardiovascular e mortalidade.
KR20080020023/2008	Lee, Young Chul	KR	A61K	<i>Agent for treating acute lung injury through VEGF inhibition and vascular permeability control comprising alpha-lipoic acid as active ingredient.</i>	Um agente terapêutico da lesão pulmonar aguda contendo o AAL como antioxidante para tratar a lesão pulmonar aguda através da inibição do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e do controle da permeabilidade vascular.
WO/2008/156671/2008 2691132/2008 101707877/2010 63/MUMNP/2010 MX/a2009/013683/2010 102100038098/2010 2008266996/2010 20150105356/2015 20170182067/2017 20170296559/2017	Pravda Jay	WO CA CN IN MX KR AU US US US	A61K	<i>Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress.</i>	A presente invenção refere-se a materiais e métodos para a prevenção e o tratamento de estados de doença associados com o estresse oxidativo ou um ambiente redutor comprometido, incluindo as doenças inflamatórias do intestino tais como doença de Crohn e colite ulcerativa.
US2010233145/2010	Van Veen Theodorus	US	A23L A61K A61P B63H	<i>Composition used as a nutritional supplement and medication for the treatment of degenerative visual disorders and inflammation.</i>	Uma composição e uma unidade de dosagem que pode ser usada como suplemento nutricional ou como medicação para o tratamento da retinite pigmentosa (RP).
EP2392321/2011	Pravda Jay		A61K	<i>Combined composition for rectal administration for the treatment of inflammatory bowel disease.</i>	A presente invenção refere-se a materiais e métodos para a prevenção e o tratamento de estados de doença associados com o estresse oxidativo ou um ambiente redutor comprometido, incluindo as doenças inflamatórias do intestino tais como doença de Crohn e colite ulcerativa.

Fonte: Autoria própria.

## 4 CONCLUSÃO

A maioria dos estudos realizados com o AAL demonstraram que este composto é eficaz no tratamento das DII, apesar de que alguns ainda mostram alguma controvérsia. Acredita-se que o seu potencial como antioxidante e anti-inflamatório sejam os responsáveis na redução dos danos do estresse oxidativo promovidos pelas EROs e ERNs geradas durante a patogênese dessas doenças. Além disso, a prospecção tecnológica demonstrou a possibilidade de utilização desse composto direcionado para essas doenças, uma vez que já existem produtos destinados a isso, mas há uma grande possibilidade de inovação na área. Dessa forma, esta molécula mostra-se promissora como adjuvante no tratamento das DII.

## REFERÊNCIAS

BAUMGART, D.C., CARDING, S.R. Inflammatory bowel disease; cause and immunobiology. **Lancet** 2007; 369, 1627-1640.

BRENNAN, Ø., FURNES, M.W., DROZDOV, I., GRANLUND, A. B., FLATBERG, A., SANDVIK, A.K., ZWIGGELAAR, R.T. M., MÅRVIK, R., NORDRUM, I.S., KIDD, M., GUSTAFSSON, B.I. Relevance of TNBS-colitis in rats: A methodological study with endoscopic, histologic and transcriptomic characterization and correlation to IBD. **PLoS One** 2013; 8(1), e54543.

CHO, D. L. Alpha-lipoic acid coating method of a stent for a blood vessel which restrains sclerosis by using the action of alpha-lipoic acid applied on the stent. KR20070108973. 2007.

CHO, Y. S. et al. Composition containing alpha lipoic acid as effective ingredient to prevent and treat asthma without adverse side effect. KR20040097820. 2004.

EL-GOWELLI, H. M.; SAAD, E. I.; ABDEL-GALIL, A. A.; IBRAHIM, E. R. Co-administration of  $\alpha$ -lipoic acid and cyclosporine aggravates colon ulceration of acetic acid-induced ulcerative colitis via facilitation of NO/COX-2/miR-210 cascade. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 2015.

FERRAZ, F. B. Panorama Geral Sobre Doenças Inflamatórias Intestinais: Imunidade e Suscetibilidade da Doença de Crohn e Colite Ulcerativa. **J Health Sci** 2016;18(2):139-43.

HEINZ, U. et al. Pharmaceutical composition containing R-alpha-lipoic acid or S-alpha-lipoic acid as active ingrediente. US5728735. 1998.

JACOBS, R. H. A method for optimizing immune activity in the treatment of auto-immune diseases and chronic immune conditions. WO200100194. 2001.

KANGAWA, Y.; YOSHIDA, T.; MARUYAMA, K.; OKAMOTO, M.; KIHARA, T.; NAKAMURA, M.; OCHIAI, M.; YOSHITAKA, H.; HAYASHI, S.; SHIBUTANI, M.

Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology** 2016; 100, 103-114.

KANGAWA, Y.; YOSHIDA, T.; ABE, H.; SETO, Y.; MIYASHITA, T.; NAKAMURA, M.; KIHARA, T.; HAYASHI, S.; SHIBUTANI, M. Anti-inflammatory effects of the selective phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, and antioxidants, enzymatically-modified isoquercitrin and  $\alpha$ -lipoic acid, reduce dextran sulfate sodium-induced colorectal mucosal injury in mice. **Exp Toxicol Pathol** 2017.

KOLGAZI, M.; JAHOVIC, N.; YÜKSEL, M.; ERCAN, F.; ALICAN, I.  $\alpha$ -Lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 2007; 22, 1859–1865.

LEE, Y. C. Agent for treating acute lung injury through VEGF inhibition and vascular permeability control comprising  $\alpha$ -lipoic acid as active ingredient. KR20080020023. 2008.

MAZZOLIN, L. P. Avaliação da atividade antioxidante de Qualea parviflora sobre a doença inflamatória intestinal e a úlcera péptica induzidas em roedores. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP, 2013.

MOURA, F. A.; ANDRADE, K. Q.; SANTOS, J. C. F.; GOULART, M. O. F. Lipoic acid: Its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2015, 15; 458-483.

MOURA, F. A.; ANDRADE, K. Q.; ARAÚJO, O. R. P.; SOUZA-NUNES, V.; SANTOS, J. C. F.; RABELO, L. A.; GOULART, M. O. F. Colonic and Hepatic Modulation by Lipoic Acid and/or N-Acetylcysteine Supplementation in Mild Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016.

PARK, S.K.; Kim, W.; Lee, S.; Moon, S.O. Pharmaceutical composition comprising  $\alpha$ -lipoic acid for inflammatory diseases. US2007072937/2007.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2012.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; ZIELINSKA, M.; PIEKIELNY, D.; FICHNA, J. The influence of lipoic acid on caveolin-1-regulated antioxidative enzymes in the mouse model of acute ulcerative colitis. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 2016; 84, 470–475.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. WO/2008/156671/2008.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 2691132/2008.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 101707877/2010.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 63/MUMNP/2010. 2010.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. MX/a2009/013683.2010.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 102100038098. 2010.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 2008266996. 2010.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 20150105356. 2015.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 20170182067. 2017.

PRAVDA, J. Materials and methods for treatment and diagnosis of disorders associated with oxidative stress. 20170296554. 2017.

PRAVDA, J. Combined composition for rectal administration for the treatment of inflammatory bowel disease. EP2392321. 2011.

RABIEN, M. Combination patente comprising alpha-lipoic acid + pantothenic acid (or dexpanthenol) against inflammations, skin diseases of inflammatory + allergic nature, poorly healing wounds. DE000004313428. 1993.

SEHIRLI, A. O.; TATLIDEDE, E.; YÜKSEL, M.; CETINEL, S.; ERZİK, C.; YEGEN, B.; SENER, G. Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid Against Oxidative Injury in TNBS-induced Colitis. **Erciyes Týp Dergisi (Erciyes Medical Journal)** 2009;31(1):015-026.

SUN, J.; ZHANG, H.; GUAN, L.; ZHOU, H.; SUN, M. Alpha-lipoic acid attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. **Int J Clin Exp Med** 2015;8(1):358-367.

TRIVEDI, P. P.; JENA, G. B. Role of a-lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. **Food and Chemical Toxicology** 2013; 59, 339–355.

VAN, V. T. Composition used as a nutritional supplement and medication for the treatment of degenerative visual disorders and inflammation. US2010233145. 2010.

VILLEPONTEAU, B. R. Compositions and methods for reducing cholesterol and inflammation. US20070166321. 2007.

VONG, L. B.; TOMITA, T.; YOSHITOMI, T. MATSUI, H.; NAGASAKI, Y. An orally administered redox nanoparticle that accumulates in the colonic mucosa and reduces colitis in mice. **Gastroenterology**, 2012; 143: 1027-1036.

WEISCHER, C. H. et al. N-Acetyl-p-aminophenol derivatives for controlling pain. DE4327462. 1993.



## ANEXOS

PubMed		
Busca	Termos da busca	Resultados
<b>PROBLEMA</b>		
#1	"thioctic acid"[MeSH Terms]	<b>3653</b>
#2	thioctic acid[Text Word]	<b>3797</b>
#3	Alpha lipoic acid[Text Word]	<b>2248</b>
#4	Lipoic acid[Text Word]	<b>3996</b>
#5	((("Thioctic Acid"[MeSH]) OR thioctic acid[Text Word]) OR Alpha lipoic acid[Text Word]) OR Lipoic acid[Text Word]	<b>5127</b>
<b>INTERESSE</b>		
#6	"Antioxidants"[MeSH]	<b>110582</b>
#7	antioxidants[Text Word]	<b>115834</b>
#8	"Free radicals"[MeSH]	<b>263587</b>
#9	Free radicals[Text Word]	<b>50539</b>
#10	"Oxidative stress"[MeSH]	<b>104833</b>
#11	Oxidative stress[Text Word]	<b>171767</b>
#12	(((((("Antioxidants"[Mesh]) OR antioxidants[Text Word]) OR "Free Radicals"[Mesh]) OR Free radicals[Text Word]) OR "Oxidative Stress"[Mesh]) OR Oxidative stress[Text Word]	<b><a href="#">458281</a></b>
<b>CONTEXTO</b>		
#13	"inflammatory bowel disease"[MeSH Terms]	<b>5762</b>
#14	Inflammatory bowel disease [Text Word]	<b>11796</b>
#15	Mucous colitis[Text Word]	<b>18</b>
#16	Irritable colon[Text Word]	<b>442</b>

#17	"crohn disease"[MeSH Terms]	<b>34581</b>
#18	Crohn disease[Text Word]	<b>35669</b>
#19	Crohn's enteritis[Text Word]	<b>13</b>
#20	Granulomatous Colitis[Text Word]	<b>340</b>
#21	"Colitis"[Mesh]	<b>46455</b>
#22	Colitis[Text Word]	<b>66201</b>
#23	((((((((("irritable bowel syndrome"[MeSH Terms]) OR Irritable Bowel Syndrome[Text Word]) OR Mucous colitis[Text Word]) OR Irritable colon[Text Word]) OR "crohn disease"[MeSH Terms]) OR Crohn disease[Text Word]) OR Crohn's enteritis[Text Word]) OR Granulomatous Colitis[Text Word]) OR "Colitis"[Mesh]) OR Colitis[Text Word]	<b>99950</b>
#24	((((("thioctic acid"[MeSH Terms]) OR thioctic acid[Text Word]) OR Alpha lipoic acid[Text Word]) OR Lipoic acid[Text Word])) AND (((("Antioxidants"[MeSH]) OR antioxidants[Text Word]) OR "Free radicals"[MeSH]) OR Free radicals[Text Word]) OR "Oxidative stress"[MeSH]) OR Oxidative stress[Text Word])) AND (((((((("irritable bowel syndrome"[MeSH Terms]) OR Irritable Bowel Syndrome[Text Word]) OR Mucous colitis[Text Word]) OR Irritable colon[Text Word]) OR "crohn disease"[MeSH Terms]) OR Crohn disease[Text Word]) OR Crohn's enteritis[Text Word]) OR Granulomatous Colitis[Text Word]) OR "Colitis"[Mesh]) OR Colitis[Text Word]	<b>10</b>

<b>Web of Science</b>		
<b>Busca</b>	<b>Termos da busca</b>	<b>Resultados</b>
#1	"thioctic acid"	<b>661</b>
#2	"Alpha lipoic acid"	<b>3952</b>
#3	"Lipoic acid"	<b>6409</b>
#4	#3 OR #2 OR #1	<b>6786</b>
#5	Antioxidants	<b>257180</b>
#6	"Free radicals"	<b>61099</b>
#7	"Oxidative stress"	<b>279721</b>
#8	#7 OR #6 OR #5	<b>466720</b>
#9	"irritable bowel syndrome"	<b>18615</b>
#10	"Mucous colitis"	<b>13</b>
#11	"Irritable colon"	<b>259</b>
#12	"crohn disease"	<b>3381</b>
#13	"Crohn's enteritis"	<b>5</b>
#14	"Granulomatous Colitis"	<b>358</b>
#15	"Colitis"	<b>79577</b>
#16	#15 OR #14 OR #13 OR #12 OR #11 OR #10 OR #9	<b>98968</b>
#17	#16 AND #8 AND #4	<b>17</b>

<b>SCOPUS</b>		
<b>Busca</b>	<b>Termos da Busca</b>	<b>Resultados</b>
#1	"thioctic acid"	<b>7345</b>
#2	"Alpha lipoic acid"	<b>2872</b>
#3	"Lipoic acid"	<b>5276</b>
#4	#1 OR #2 OR #3	<b>8775</b>
#5	Antioxidants	<b>306482</b>
#6	"Free radicals"	<b>182292</b>
#7	"Oxidative stress"	<b>249573</b>
#8	#7 OR #6 OR #5	<b>574747</b>
#9	"irritable bowel syndrome"	<b>14402</b>
#10	"Mucous colitis"	<b>52</b>
#11	"Irritable colon"	<b>16377</b>
#12	"crohn disease"	<b>69576</b>
#13	"Crohn's enteritis"	<b>26</b>
#14	"Granulomatous Colitis"	<b>503</b>
#15	"Colitis"	<b>99844</b>
#16	#15 OR #14 OR #13 OR #12 OR #11 OR #10 OR #9	<b>154640</b>
#17	#16 AND #8 AND #4	<b>18</b>

## Capítulo 2

### **Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria Uv-Vis para quantificação do ácido alfa-lipoico**

Grasielly Rocha Souza<sup>1</sup>, Antônia de Sousa Leal<sup>2</sup>, Bárbara Verônica Cardoso de Souza<sup>3</sup>, Louise Cristina Freitas Saraiva<sup>1</sup>, Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho<sup>4</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>5</sup>, Lívio César Cunha Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Grajau-MA

<sup>3</sup> Renorbio – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife-PE

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, Petrolina-PE

#### **RESUMO**

O ácido alfa-lipoico (AAL) está presente em células procarióticas e eucarióticas, apresentando um papel central no metabolismo energético. Vários estudos já foram realizados com a finalidade de verificar o potencial terapêutico desse composto, uma vez que possui uma excelente atividade antioxidante. Entretanto, não há monografia presente na Farmacopeia Brasileira, logo esse estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria UV-Vis para quantificar o AAL. Para isso, avaliou-se a solubilidade do AAL frente a diferentes solventes, além de realizar uma varredura espectrofotométrica para determinar o comprimento de onda máximo de absorção. Para validação, foram verificados os parâmetros exigidos pela RDC nº 166 de 2017: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. O composto apresentou alta solubilidade em solventes de polaridade intermediária, como diclorometano e etanol, e o comprimento de onda de absorção máximo foi de 334 nm. O método foi seletivo, uma vez que não houve absorção dos demais componentes da formulação no comprimento de onda selecionado; linear com  $r^2 > 0,99$ ; preciso, visto que apresentou valores de precisão intermediária e repetitividade estatisticamente significativos; além de ter sido exato e robusto.

**Palavras-chave:** Método analítico; validação; ácido alfa-lipoico.

## ABSTRACT

Alpha-lipoic acid (ALA) is present in prokaryotic and eukaryotic cells, playing a central role in energy metabolism. Several studies have already been carried out to verify the therapeutic potential of this compound, since it has an excellent antioxidant activity. However, there is no monograph present in the Brazilian Pharmacopoeia, so this study was carried out with the objective of developing and validating an analytical method by UV-Vis spectrophotometry to quantify ALA. For this, the ALA solubility was evaluated against different solvents, besides performing a spectrophotometric scan to determine the maximum wavelength of absorption. For validation, the parameters required by RDC n°. 166 of 2017 were verified: selectivity, linearity, limits of detection (LD) and quantification (LQ), precision, accuracy and robustness. The compound showed high solubility in solvents of intermediate polarity, such as dichloromethane and ethanol, and the maximum absorption wavelength was 334 nm. The method was selective, since there was no absorption of the other components of the formulation at the selected wavelength; linear with  $r^2 > 0.99$ ; accurate, since it presented values of intermediate precision and statistically significant repeatability; besides being accurate and robust.

**Keywords:** Analytical method; validation; Alpha lipoic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido alfa-lipoico (AAL), também denominado de ácido tióctico ou ácido 1,2-ditiotolano-3-pentanoico ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ), está presente na maioria das células eucarióticas e procarióticas, desempenhando um papel central no metabolismo energético, uma vez que compõe o complexo piruvato desidrogenase, atuando na descarboxilação oxidativa do piruvato, processo essencial para a conversão do piruvato em acetil-CoA, etapa subsequente à glicólise no processo de respiração celular (NAVARI-IZZO et al., 2002). Foi isolado pela primeira vez por Reed e colaboradores, a partir de fígado bovino, em 1951 (GORACA et al., 2011). Entretanto, a sua existência já era conhecida desde 1930, quando foi descoberto que um “fator de crescimento da batata” era necessário para o crescimento de algumas bactérias (NAVARI-IZZO et al., 2002).

Já está bem descrito na literatura que as formas reduzida e oxidada do AAL (AAL/ácido dihidrolipoico ADHL) possui um potencial redox de -0,32 V e a capacidade de atuar nos meios

hidrofílico e lipofílico, o que o caracteriza como antioxidante universal (MOURA et al., 2015). Por conta dessa propriedade, o AAL tem sido amplamente estudado para avaliar um possível efeito terapêutico no tratamento do diabetes e suas complicações associadas. Sabe-se que o diabetes está aumentando a um ritmo alarmante em todo o mundo. Os mecanismos exatos subjacentes à doença são desconhecidos; no entanto, há evidências crescentes de que a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) associadas à hiperglicemia, causa estresse oxidativo em vários tecidos. Doenças como hipertensão, aterosclerose, hiperlipidemia e diabetes estão associadas à disfunção endotelial, provavelmente mediada pela geração de EROs pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (ROCHETTE et al., 2013).

Além disso, as doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e retocolite ulcerativa, são desordens inflamatórias crônicas, recidivantes, multifatoriais e que possuem o estresse oxidativo como possível agente agravante do quadro clínico, uma vez que a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são capazes de estimular a produção de citocinas que agravam o processo inflamatório (ZHU & LI, 2012).

Apesar da sua extensa utilização no Brasil, no compêndio oficial brasileiro, a Farmacopeia Brasileira, em sua última edição, não traz a monografia do AAL (BRASIL, 2010). A Farmacopeia Americana (USP, 2007) possui dados referentes a esse composto, mas a validação do método analítico para quantificação é por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), um método bastante caro e muitas vezes inacessível.

De acordo com a RDC nº 166 de 2017, “validar é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos”, sendo de extrema importância para a demonstração da qualidade dos dados obtidos numa medição química (BRASIL, 2017).

Em decorrência disso, associado a necessidade de quantificação do composto, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de validar uma metodologia analítica por espectrofotometria UV-Vis para quantificação do ácido alfa lipoico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Utilizado**

Ácido alfa lipoico (AAL) padrão analítico USP

Ácido alfa lipoico matéria-prima – Via Farma®

Ácido clorídrico 0,2 M

Acetato de Etila  
Acetona  
Acetonitrila  
Água  
Diclorometano  
Etanol  
Éter etílico  
Hexano  
Hidróxido de sódio 0,2 M  
Metanol  
Espectrofotômetro UV-mini  
Cubetas de quartzo de 10mm de caminho óptico  
Vidrarias analíticas

## **2.2 Desenvolvimento do método analítico**

Inicialmente, verificou-se a solubilidade do AAL em diferentes solventes, a fim de selecionar aquele em que houvesse uma completa solubilidade, com a menor toxicidade e o melhor custo benefício. Para isso, adicionou-se 100 mg de AAL e a quantidade de solvente suficiente até a solubilização completa. Foram utilizados os seguintes solventes: acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido clorídrico 0,2 M, água, álcool metílico, álcool etílico, diclorometano, éter etílico, hidróxido de sódio 0,2 M, hexano e peróxido de hidrogênio 3%. Logo após, verificou-se a solubilidade em misturas binárias do solvente em água nas proporções de (8:2), (7:3), (6:4) e (5:5). Vale ressaltar que todos os solventes utilizados estavam em temperatura ambiente.

Logo após a seleção do solvente, foram preparadas soluções nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280 µg/mL e foram realizadas varreduras em espectrofotômetro UV-Vis no intervalo de 200 a 600 nm, afim de verificar o comprimento de onda que houvesse a máxima absorção e para definição da concentração de trabalho.

### **2.2.1 Solução-padrão de AAL**

Uma solução-padrão foi preparada a partir de 250 mg do AAL padrão analítico USP, que foi solubilizado em 25 mL de etanol absoluto, obtendo-se uma concentração final de 10



mg/mL. Não houve necessidade de outras técnicas para a solubilização da amostra. As diluições foram realizadas com a mistura de solventes etanol: água (8:2) para obtenção das concentrações de 800, 900, 1000, 1100 e 1200 µg/mL para a realização do estudo de validação.

### **2.3 Validação do método analítico**

O método foi validado conforme a RDC n° 166 de 2017, sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

#### **2.3.1 Seletividade**

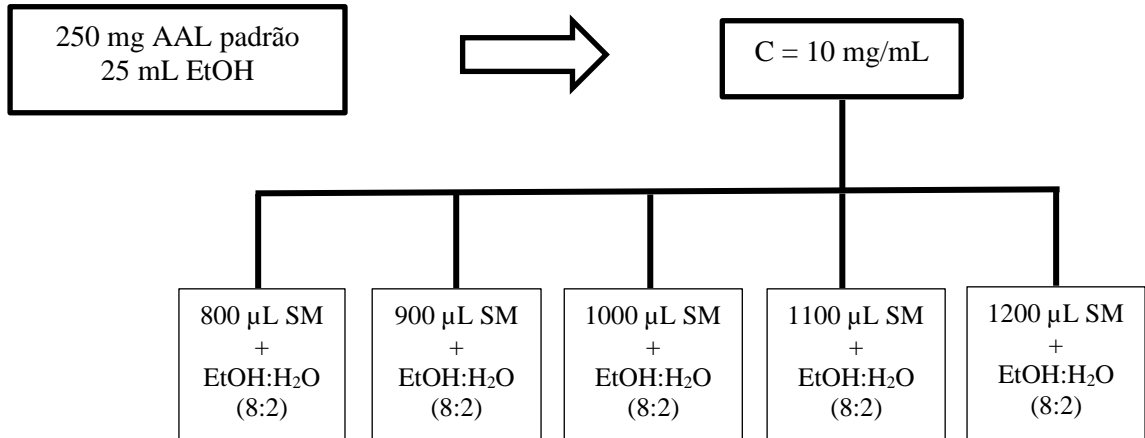
Para verificar se o método era seletivo, realizou-se uma varredura em espectrofotômetro, com soluções na concentração de 1000 µg/mL de todos os componentes da formulação, os espectros de absorção foram sobrepostos com a finalidade de observar se havia alguma sobreposição na banda de absorção do AAL. Dessa forma, foram preparadas soluções de AAL padrão analítico, mesocarpo de babaçu, HPMC e CMC.

#### **2.3.2 Linearidade**

Esse parâmetro foi avaliado através da construção de três curvas de calibração do AAL padrão analítico, utilizando cinco concentrações distintas, obedecendo a faixa de trabalho de 80-120%, como exige a RDC n° 166 de 2017.

Assim, inicialmente preparou-se uma solução-padrão na concentração de 10 mg/mL, da qual foram retiradas alíquotas para obtenção das soluções de trabalho nas concentrações de 800, 900, 1000, 1100 e 1200 µg/mL, conforme figura 1. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 334 nm.

Figura 1. Esquema ilustrando a preparação da solução mãe e as respectivas diluições para construção da curva de calibração.



Fonte: Autoria Própria.

Os resultados da linearidade foram avaliados através da análise de regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. Além disso, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) *One-Way*, com a finalidade de avaliar a qualidade do ajuste do modelo, os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

### 2.3.3 Limites de Detecção e de Quantificação

Esses parâmetros foram obtidos a partir dos dados das três curvas analíticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes ao LD e LQ, baseia-se no desvio padrão do intercepto com o eixo y e no desvio padrão residual da linha de regressão, utilizando as relações presentes na figura 2.

Figura 2. Relações para a determinação dos limites de detecção e de quantificação.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

Fonte: BRASIL, 2017

#### 2.3.4 Precisão

A precisão foi obtida através da repetitividade, onde foram realizadas 6 diluições para obtenção da concentração de 1000 µg/mL, pelo mesmo analista e no mesmo dia. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 334 nm. Além disso, avaliou-se a precisão intermediária, onde as 6 diluições foram preparadas por dois analistas distintos, em dois dias diferentes.

Os resultados foram avaliados através do coeficiente de variação e as médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste t de *Student* (teste bilateral,  $p \leq 0,05$ ).

#### 2.3.5 Exatidão

A RDC nº 166 de 2017 preconiza que esse parâmetro deve ser avaliado através de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três replicatas. Dessa forma, foram preparadas amostras do padrão analítico nas concentrações de 800, 1000 e 1200 µg/mL.

Assim, a exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, de acordo com a fórmula abaixo (figura 3).

Figura 3. Fórmula para obtenção da exatidão do método.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Fonte: BRASIL, 2017.

#### 2.3.6 Robustez

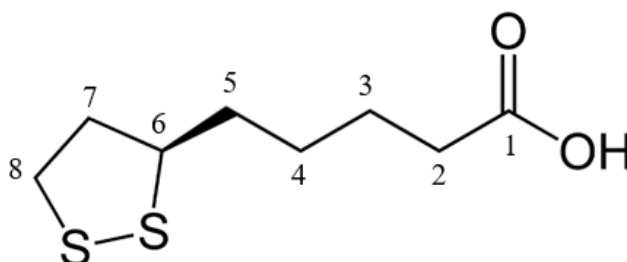
A robustez do método foi avaliada verificando-se a variação do comprimento de onda de detecção (330 e 334 nm) e o tempo de preparo das amostras (tempos 0 e 24h). As amostras foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL em triplicata para cada ensaio. Os resultados foram avaliados pelo coeficiente de variação e através do teste t de *Student* (teste bilateral,  $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desenvolvimento do método analítico

A análise da solubilidade foi realizada previamente em decorrência da baixa solubilidade do AAL em solventes polares como a água, cujo coeficiente de solubilidade é de 0,224 mg/mL (MOURA et al., 2015). Refletindo a sua afinidade pelos solventes com polaridade intermediária, tem-se o coeficiente de partição óleo/água (log P), sendo 2,1. Isso pode ser justificado pela análise da molécula (figura 4), uma vez que possui uma cadeia com sete átomos de carbono, com três destes formando um anel ditiolano com dois átomos de enxofre, que lhe confere solubilidade em solventes de menor polaridade e um grupo ácido carboxílico, que contribui para a solubilidade em solventes mais polares (SMITH et al., 2004).

Figura 4. Molécula de AAL



Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, foram avaliados diversos solventes de polaridades distintas para verificar qual seria a melhor opção para a solubilização do AAL. Em decorrência da característica físico-química da molécula, esperava-se que os solventes orgânicos de polaridade intermediária fossem as melhores opções, o que acabou sendo confirmado pelos dados experimentais, os resultados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da solubilidade do AAL em diferentes solventes.

Solvente	Volume do solvente para completa solubilização (mL)	Classificação
Acetato de etila	1,5	Facilmente solúvel
Acetona	1	Facilmente solúvel
Acetonitrila	2	Facilmente solúvel
Ácido clorídrico 0,2M	-	Insolúvel
Água	-	Insolúvel
Álcool etílico	3	Facilmente solúvel
Álcool metílico	2	Facilmente solúvel
Diclorometano	1,5	Facilmente solúvel
Éter etílico	2	Facilmente solúvel
Hidróxido de sódio 0,2M	10	Solúvel
Hexano	-	Insolúvel

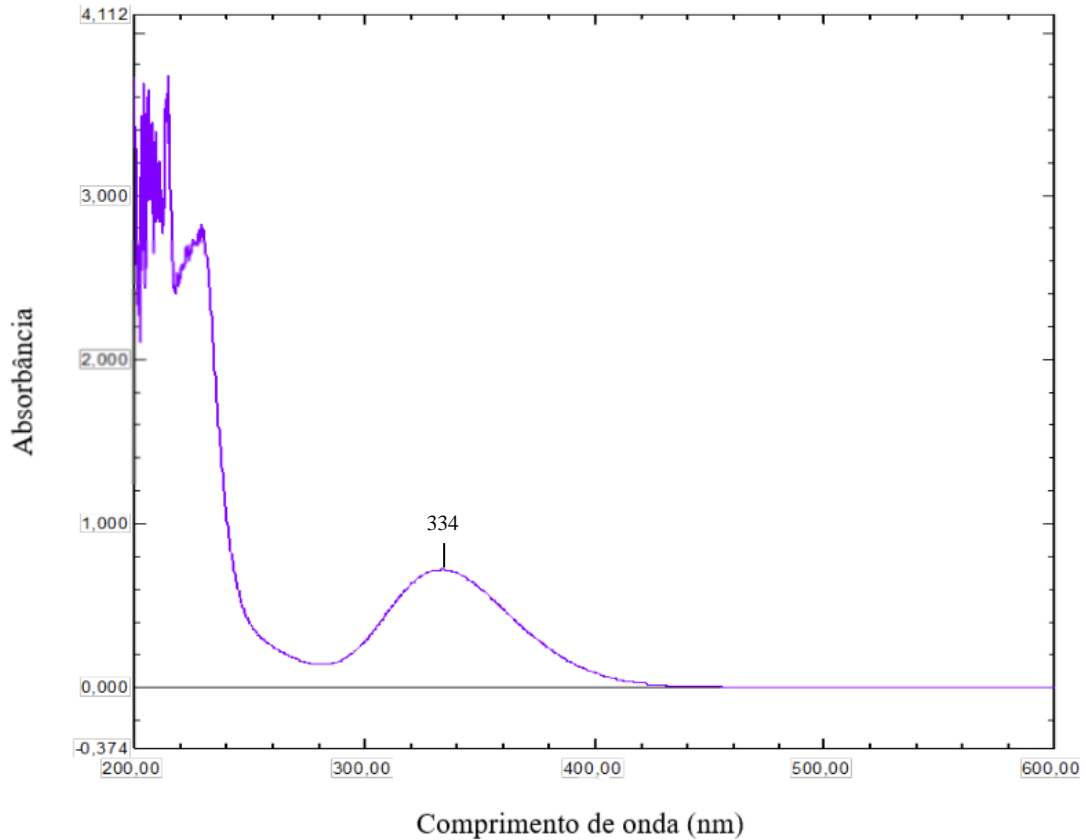
Fonte: Autoria própria.

Em todas as análises foram utilizados 100 mg do AAL, logo o solvente que melhor solubilizou o composto foi a acetona, sendo necessário apenas 1 mL para solubilizar completamente o composto. Contudo, este solvente possui elevada toxicidade, além de maior custo. Sendo assim, optou-se pela utilização do etanol, que também mostrou alta eficiência na solubilização, além de possuir menor custo e toxicidade consideravelmente menor.

Logo após a seleção desse solvente, foram realizadas análises para verificar a solubilidade em misturas binárias com água, com a finalidade de reduzir a utilização de solvente orgânico, entretanto, a única mistura que permaneceu com a capacidade de máxima solubilização foi a de etanol:água (8:2), sendo esta utilizada nas diluições das amostras.

As amostras de AAL nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280  $\mu\text{g/mL}$  avaliadas em espectrofotômetro apresentaram 334 nm como comprimento de onda máximo de absorção (figura 5), além disso, foi possível verificar que as soluções de até 320  $\mu\text{g/mL}$  apresentavam valores de absorbância abaixo de 0,2; logo, optou-se por utilizar como concentrações de trabalho as soluções de 800-1200  $\mu\text{g/mL}$ , tendo em vista que os valores confiáveis de absorção no espectrofotômetro estão na faixa entre 0,2 e 0,8 (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Figura 5. Espectro de varredura do AAL em espectrofotômetro para determinação do comprimento de onda máximo de absorção.



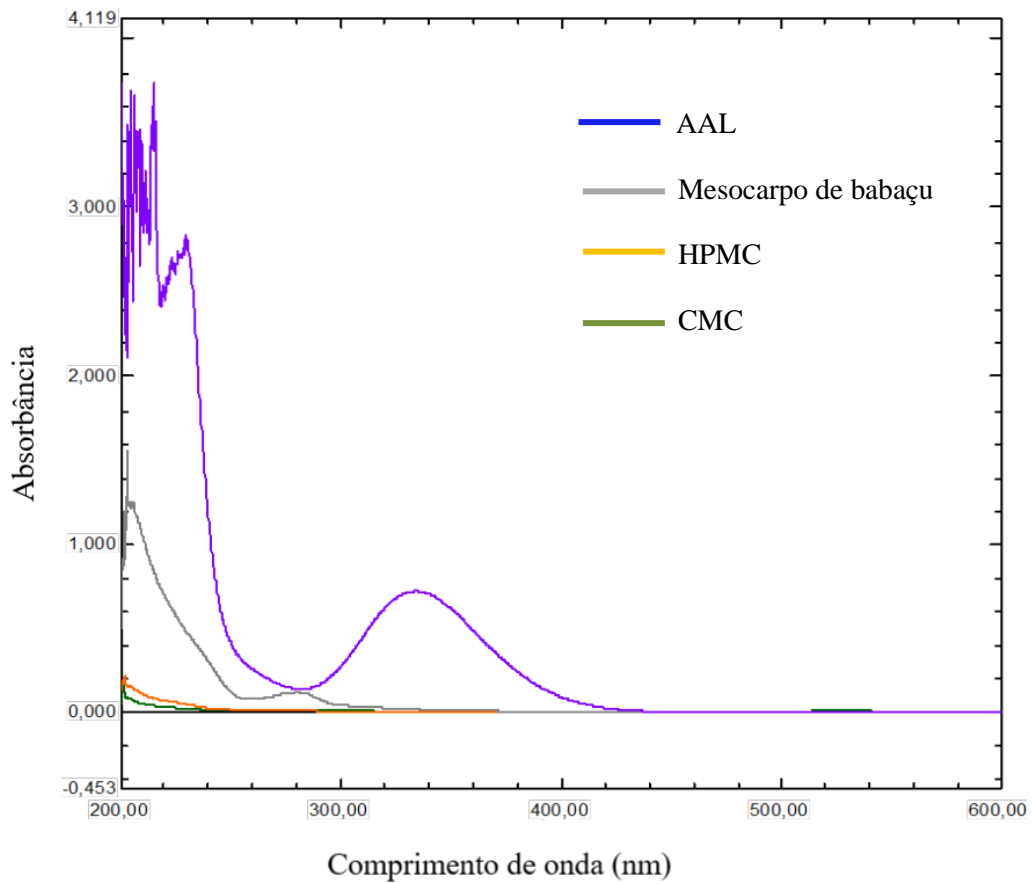
### 3.2 Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo a legislação vigente, RDC nº 166 de 2017 (BRASIL, 2017).

#### 3.2.1 Seletividade do método

O método apresentou-se seletivo, tendo em vista que nenhum composto apresentou absorção no mesmo comprimento de onda do AAL, como demonstrado na figura 6. Logo, pode ser utilizado com segurança para análise do AAL numa matriz complexa.

Figura 6. Sobreposição dos espectros de absorção do AAL, mesocarpo de babaçu, HPMC e CMC.

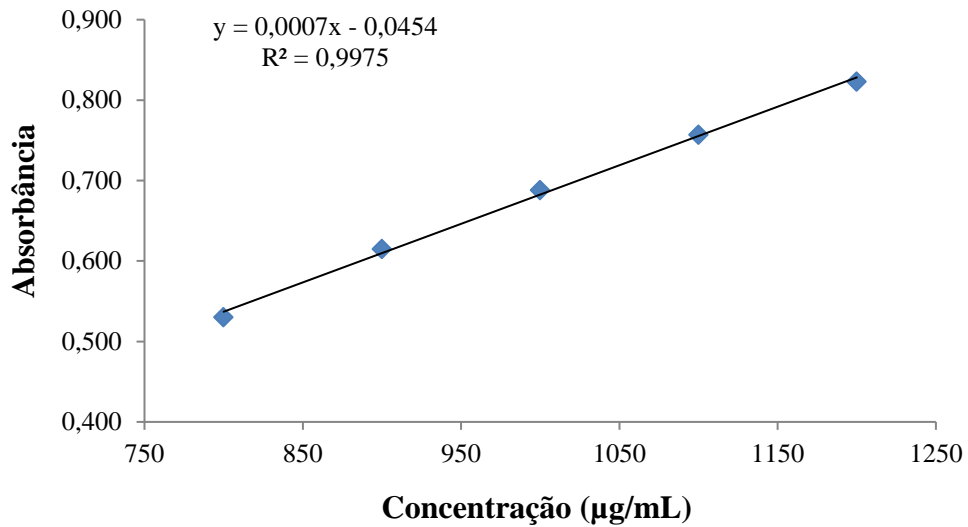


Espectro obtido em espectrofotômetro UV-Vis demonstrando que não houve sobreposição das bandas de absorção do AAL e dos excipientes utilizados.

### 3.2.2 Linearidade

A linearidade consiste na capacidade do método em obter respostas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017). Assim, a construção da curva analítica foi realizada com a média das três curvas de calibração com cinco concentrações, sendo obtido um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) > 0,99, como exige a legislação brasileira (figura 7).

Figura 7. Curva de calibração do AAL.



Fonte: Autoria própria.

O teste unilateral de análise de variância (ANOVA) foi realizado com o objetivo de verificar a qualidade do ajuste do modelo linear. Os dados obtidos demonstraram que a regressão foi significativa, uma vez que o valor de F calculado foi menor que o valor de F crítico no nível de 95% de confiança (tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para linearidade do método de doseamento de ácido alfa-lipoico por espectrofotometria UV-Vis.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valores de F	
				F calculado	F crítico
Entre os grupos	0,00010	2	$5,24667E^{-05}$	0,00376	3,8853
Dentro dos grupos	0,16757	12	0,013964		
Total	0,16768	14			

### 3.2.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção é a menor concentração do analito presente na amostra capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação é



a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2017).

Esses dados foram obtidos a partir das curvas de calibração, sendo o limite de detecção 90 µg/mL e o limite de quantificação 280 µg/mL. Logo, a faixa de trabalho utilizada neste estudo está dentro do limite de quantificação, sendo as medidas realizadas de forma precisa e exata.

### 3.2.4 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método a ser validado (BRASIL, 2017). Foi avaliada através da repetibilidade, que consiste na obtenção de seis medidas realizadas pelo mesmo analista, no mesmo dia e no mesmo laboratório, cujo coeficiente de variação foi de 0,33%, estando de acordo com o exigido pela legislação. Os resultados estão expressos na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da repetibilidade do método para quantificação do ácido alfa lipoico em espectrofotometria UV-Vis.

	Absorbância (334 nm)	Concentração (µg/mL)
	0,693	1054,85
	0,690	1050,57
	0,687	1046,28
	0,690	1050,57
	0,686	1044,85
	0,689	1049,14
Média	0,689	1049,37
D.P.	0,002	3,54
C.V. (%)	0,36	0,33

\*D.P. desvio padrão; C.V. coeficiente de variação

Além disso, avaliou-se a precisão intermediária, sendo obtida através da análise de seis medidas, por dois analistas, e em dois dias distintos, as médias dos resultados foram comparadas pelo teste *t* de Student e os resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4. Resultados da precisão intermediária

Valores de t				t crítico
t calculado				
Inter-dia		Intra-dia		
Dia 1	Dia 2	Analista 1	Analista 2	
0,605	0,134	0,855	0,2121	2,228*

\* Valor tabelado de t (teste bilateral,  $p < 0,05$ )

O teste *t* de *student* foi realizado para verificar a existência de uma possível diferença entre as médias obtidas. Os resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas realizadas, pois os valores de *t* calculados foram sempre menores que os valores de *t* crítico.

### 3.2.5 Exatidão

A exatidão corresponde ao grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017). Foram preparadas nove soluções em três níveis de concentração e o valor experimental foi calculado, sendo encontrados valores de coeficiente de variação abaixo de 5%, estando em conformidade com o exigido pela legislação. Os dados estão expressos na tabela 5.

Tabela 5. Resultados da exatidão para três níveis da concentração do ácido alfa-lipoico.

Concentração de AAL				
Teórica	Experimental	Média	D.P.	C.V. (%)
800	860	107,54	0,89	0,83
	867,7			
	853,4			
1000	1087,7	108,17	0,84	0,78
	1086,28			
	1072			
1200	1247,7	104,4	0,41	0,399
	1253,42			
	1257,71			

\*D.P. desvio-padrão; C.V. coeficiente de variação.

### 3.2.6 Robustez

A robustez do método consiste na sua capacidade em resistir a pequenas variações das condições analíticas. Foram avaliadas variações no tempo de preparo da amostra e no comprimento de onda de absorção. Pode-se observar que as duas condições não influenciaram de maneira significativa o espectro de absorção do AAL, os resultados estão plotados na tabela 6, em que a análise pelo teste t de *Student* revelou que os valores de t calculados forem menores que o valor de t tabelado, logo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias, demonstrando que o método é robusto.

Tabela 6. Resultados da robustez após análise pelo teste t de *Student*.

Valores de t				
		t calculado		t crítico
Tempo de análise		Comprimento de onda (nm)		
0 h	24 h	330	334	
0,64		0,0012		2,77*

\*Valor de t calculado (teste bilateral,  $p < 0,05$ )

## 4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido foi adequadamente validado, apresentando-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto, uma vez que todos os parâmetros avaliados atenderam aos critérios estabelecidos na legislação brasileira. Além disso, tem-se um método de fácil execução e com baixo custo. Essa etapa de validação torna-se primordial, uma vez que outras partes do desenvolvimento desse estudo necessitam da utilização desses dados.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, DF, 2010, 5 ed.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

GORACA, A.; HUK-KOLEGA, H.; PIECHOTA, A.; KLENIEWSKA, P.; CIEJKA, E.; SKIBSKA, B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. **Pharmacological Reports**. 2011, 63, 849-858.

MOURA, F. A.; ANDRADE, K. Q.; SANTOS, J. C. F.; GOULART, M. O. F. Lipoic acid: Its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 2015, 15, 458-483.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M. F.; SGHERRI, C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. **Plant Physiol. Biochem** 2002, 40:463-470.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova** 2004, 27(5):807-812.

ROCHETTE, L.; GHIBUS, S.; RICHARD, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Direct and indirect antioxidante properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential. **Mol. Nutr. Food Res**. 2013, 57:114-125.

SMITH, A. R.; SHENVI, S. V.; WIDLANSKY, M.; SUH, J. H.; HAGEN, T. M. Lipoic Acid as a Potential Therapy for Chronic Diseases Associated with Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry** 2004, 11:1135-1146.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. Dietary Supplements: Alpha lipoic acid. 2007; 27(6):3338.

ZHU, H.; LI, R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine** 2012, 237:474-480.

## Capítulo 3

### Estudo de pré-formulação do antioxidante ácido alfa-lipoico

Grasielly Rocha Souza<sup>1</sup>, Antônia de Sousa Leal<sup>2</sup>, Bárbara Verônica Cardoso de Souza<sup>3</sup>, Louise Cristina Freitas Saraiva<sup>1</sup>, Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho<sup>4</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>5</sup>, Lívio César Cunha Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Grajau-MA

<sup>3</sup> Renorbio – Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife-PE

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, Petrolina-PE

#### RESUMO

Os estudos de pré-formulação são de fundamental importância para o delineamento de novas formas farmacêuticas, fazendo-se necessário caracterizar a matéria-prima utilizada por meio de técnicas físicas, físico-químicas e biológicas. Sabendo-se da importância do ácido alfa-lipoico (AAL) para as funções endógenas, assim como o seu potencial terapêutico, por suas propriedades antioxidantes, realizou-se esse estudo a fim de caracterizar esse material como etapa preliminar para a obtenção de uma forma farmacêutica inovadora. Para isso, realizou-se a determinação da descrição, tamanho de partícula e análise morfológica do AAL; análise das propriedades de fluxo e avaliação físico-química por espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e por ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmar a identidade da matéria-prima, através da comparação com um padrão analítico farmacopeico. Assim, os dados obtidos apontaram para a necessidade de utilização de excipientes específicos para melhorar as propriedades de fluxo do material, assim como as análises por IV e por RMN demonstraram a autenticidade da matéria-prima, etapa primordial para o seguimento dos estudos com segurança.

**Palavras-chave:** Pré-formulação, ácido alfa-lipoico, propriedades físico-químicas.

## ABSTRACT

Preformulation studies are of fundamental importance for the design of new pharmaceutical forms, making it necessary to characterize the raw material used by means of physical, chemical and biological techniques. Knowing the importance of alpha-lipoic acid (AAL) for endogenous functions, as well as its therapeutic potential, for its antioxidant properties, this study was carried out in order to characterize this material as a preliminary step to obtain a form innovative pharmaceutical. For this, the determination of the description, particle size and morphological analysis of AAL was carried out; analysis of flow properties and physico-chemical evaluation by infrared (IR) absorption spectroscopy and by nuclear magnetic resonance (NMR) to confirm the identity of the raw material by comparison with a pharmacopoeial analytical standard. Thus, the data obtained pointed to the need to use specific excipients to improve the flow properties of the material, as well as the IR and NMR analyzes showed that the authenticity of the raw material, a primordial step for the safety follow-up studies.

**Keywords:** Pre-formulation, alpha-lipoic acid, physico-chemical properties.

## 1 INTRODUÇÃO

Para o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica é necessário realizar uma grande diversidade de estudos, de modo que sejam garantidas a sua eficácia, segurança e qualidade. Nesse contexto, os estudos de pré-formulação compõem a primeira fase desse processo, e consistem na coleta de dados sobre a caracterização física, físico-química e biológica do fármaco e dos excipientes utilizados para a obtenção do produto final (ROLIM, 2012). Para isso, deve-se analisar as propriedades do fármaco e dos excipientes no estado sólido, como: a cristalinidade e a morfologia; solubilidade e dissolução; ponto de fusão; densidade; higroscopicidade; processabilidade; estabilidade; compatibilidade e propriedades compressionais (MATOS, 2014).

O ácido alfa-lipoico (AAL) é uma biomolécula essencial que está presente nos organismos procariontes e eucariontes. Trata-se de um ácido graxo de cadeia linear com oito átomos de carbono e dois átomos de enxofre ligados a C1 e C3, essa configuração permite que ele forme uma ligação dissulfeto intramolecular, formando um anel ditiolano na sua forma oxidada (BILLGREN et al., 2010). Vale ressaltar que o anel ditiolano também é responsável

pela coloração amarelada do pó, além de absorver no espectro ultravioleta (UV) em 334 nm (BLEWENGA et al., 1997).

Outra característica do composto que pode ser atribuída ao anel ditiolano é a sua reatividade química. Sabe-se que os átomos de enxofre podem estar na sua forma oxidada, constituindo o AAL, ou reduzida, constituindo o ácido dihidrolipoico (ADHL), formando um par redox bastante potente. Alguns estudos já demonstraram que o potencial redox do par AAL/ADHL é de -320 mV, enquanto que o do par GSH/glutationa oxidada é de -240 mV (MOINI et al., 2002). Isso indica que o ADHL é mais efetivo na proteção contra os danos oxidativos quando comparado ao GSH, por isso, a dupla AAL/ADHL tem sido denominada de “antioxidante universal”. Vale ressaltar que esse par redox também possui a capacidade de regenerar outros antioxidantes sem ser destruído no processo (ROCHETTE. et al., 2013).

Foi utilizado como agente terapêutico pela primeira vez no final de 1960, por um médico alemão, em pacientes que apresentavam cirrose hepática, envenenamento por cogumelos, intoxicação por metais pesados e polineuropatia diabética, ele observou que todos apresentavam níveis baixos de AAL (BIEWENGA, 1997). Além disso, já existem relatos da sua utilização em doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer (MACZUREK et al., 2008) e epilepsia (FREITAS, 2009) e nas doenças inflamatórias intestinais (CARTER et al., 2004). Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia dessas doenças, logo, a atividade antioxidante do AAL é a principal responsável pela sua eficácia (BILLGREN et al., 2010).

Durante o desenvolvimento racional de um novo medicamento deve-se ter conhecimento das propriedades químicas e físicas do princípio ativo e dos excipientes, logo a caracterização do princípio ativo deve ser a primeira etapa no delineamento do novo medicamento. Dentre as técnicas utilizadas para a caracterização do princípio ativo, tem-se: análise térmica; determinações de tamanho, forma, porosidade e área superficial das partículas; propriedades de fluxo, atrito e deformação; técnicas espectrofotométricas (UV e infravermelho); avaliação da dissolução intrínseca, entre outros (ROLIM, 2012).

O conhecimento acerca dessas características é de fundamental importância para o desenvolvimento racional de uma nova forma farmacêutica. Dessa forma, esse estudo foi realizado com o objetivo de conhecer as características físicas e físico-químicas do AAL.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Descrição, tamanho de partícula e análise morfológica

A primeira análise da matéria-prima foi uma avaliação macroscópica, em que foram visualizados o aspecto e a cor do AAL a olho nu. Além disso, amostras da matéria-prima foram enviadas para análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um microscópio Shimadzu SSX-550 Superscan<sup>®</sup>, para isso, as amostras foram fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec<sup>®</sup> SCD 050), com a finalidade de tornar o material eletricamente condutor. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma atmosfera de plasma com os gases N<sub>2</sub> – H<sub>2</sub> com fluxos definidos e o controle da temperatura em torno de 300 °C por 1 hora. As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15kV.

A determinação da granulometria do pó foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), através da técnica de tamisação, por meio da utilização de tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poros (20, 40, 60, 80 e 120 mesh), montados sobre uma base com vibração magnética (Tamizador Bertel<sup>®</sup>). Vale ressaltar que esse dispositivo reproduz os movimentos horizontais e verticais da operação manual, através da ação mecânica uniforme. Adicionou-se uma amostra de 25 g no tamis superior e o conjunto foi submetido a tamisação por 15 minutos em amplitude 8. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 2.2 Propriedades de Fluxo

A determinação da densidade foi realizada utilizando-se 20 g da amostra em um compactador automático (Densímetro Copley IV 2000<sup>®</sup>) contendo uma proveta, em triplicata. O volume inicial ocupado pela amostra foi medido. Em seguida, o equipamento realizou 500, 750 e 1250 compactações. O procedimento foi realizado até a obtenção de um volume de pó sem variação entre as leituras. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades aparente (dap) e compactada (dcp). A avaliação da compactação do pó foi realizada através do índice de Hausner (IH) e índice de Carr (IC), utilizando as equações abaixo (Figura 1).

Figura 1: Equações utilizadas para determinação do índice de Hausner e do índice de Carr.

$$IH = \frac{\textit{densidade compactada}}{\textit{densidade aparente}}$$

$$IC(\%) = \frac{(dcp - dap)}{dcp} \times 100$$

Fonte: BRASIL, 2010.

O ângulo de repouso foi obtido por meio da medida do cone de pó formado através do escoamento de 30 g amostra através de um funil de 200 mL medindo 25 cm de altura, 8 mm de largura e com 9 cm de diâmetro, em triplicata. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo necessário para o escoamento do pó através do funil utilizando-se um cronômetro digital.

### 2.3 Difração de raios-X (DR-X)

O difratograma do AAL foi obtido em difratômetro Shimadzu®, modelo XRD6000, equipado com ânodo de cobre, usando voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo  $2\theta$  de  $5 - 75^\circ$  a uma velocidade de digitalização de  $2^\circ/\text{min}$ . Utilizaram-se suportes de vidro com fina camada de material em pó sem solvente.

### 2.4 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR)

O espectro de infravermelho foi obtido no equipamento Spectrum 400 da PerkinElmer® com dispositivo de refletância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. A resolução utilizada foi de  $4 \text{ cm}^{-1}$  na faixa de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , pela técnica de pastilhas de KBr.

### 2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Bruker Ascend® 400, operando a 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram solubilizadas em clorofórmio

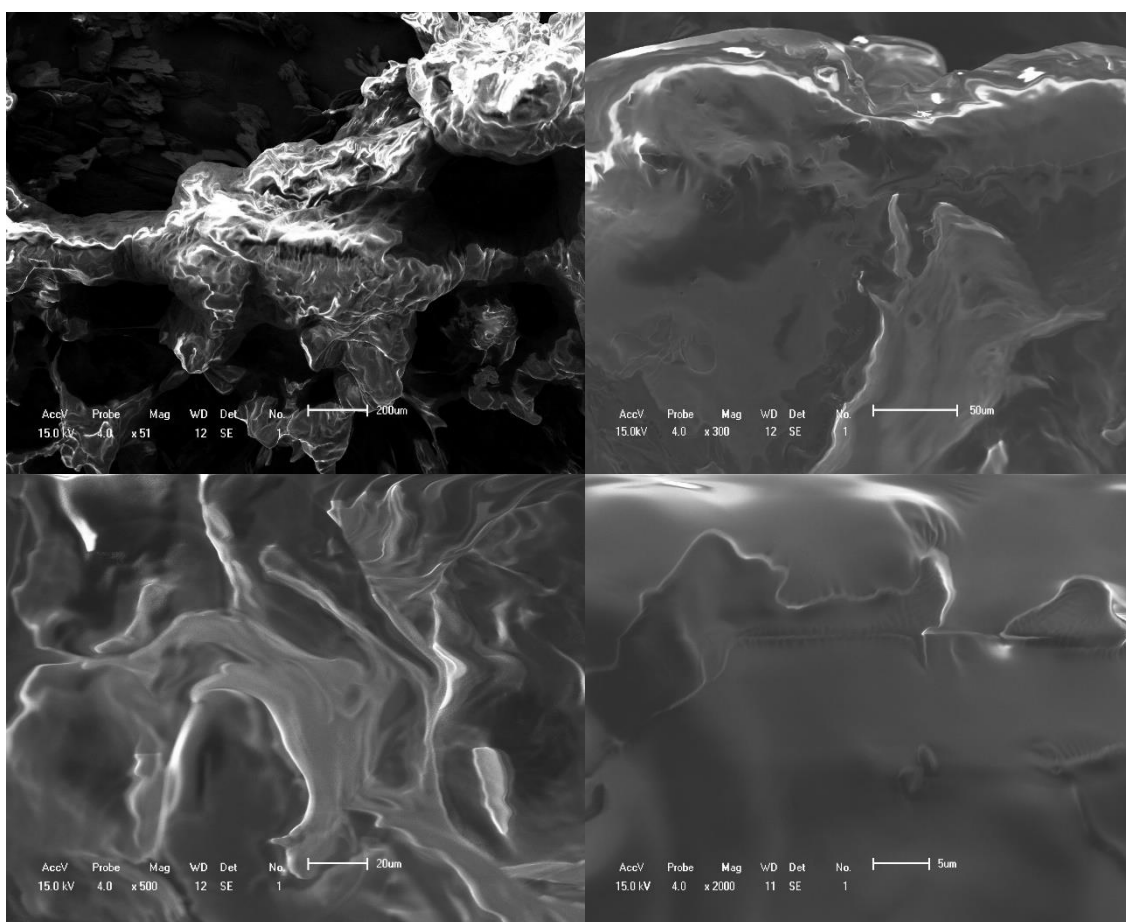
(CDCl<sub>3</sub>) (Tedia®, Brasil). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, em relação ao sinal do TMSP-d<sub>4</sub> em 0,00 ppm.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Descrição, tamanho da partícula e análise morfológica

O AAL apresenta-se como pó amarelo e leve, com tendência a formar aglomerados, atendendo as especificações do laudo obtido do fornecedor. As imagens obtidas do AAL matéria-prima estão dispostas na figura 2 e confirmam sua natureza amorfa, uma vez que não há estrutura e nem forma definidas.

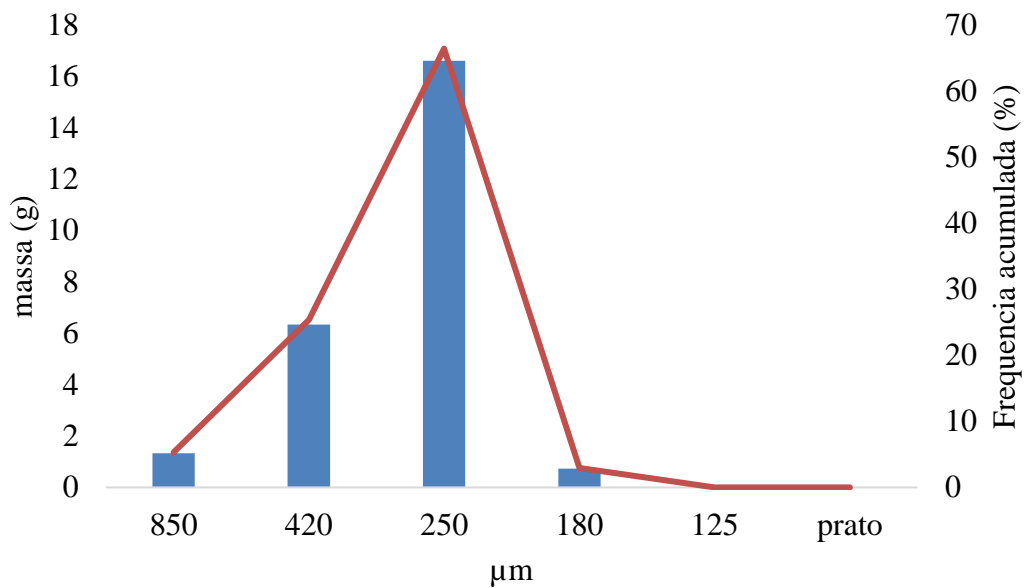
Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do ácido alfa-lipoico



O estudo de distribuição granulométrica foi realizado pela técnica de tamisação e os resultados demonstraram que a matéria-prima possui um tamanho médio de partícula de 250

$\mu\text{m}$ , representando 66,4% da massa total (Figura 3), sendo classificado como pó fino pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Contudo, vale destacar a tendência que esse material possui em formar aglomerados, o que pode justificar a maior resistência das partículas em atravessar os tamises de menor abertura de malha.

Figura 3. Repartição granulométrica



### 3.2 Propriedades de fluxo

Para que o processo de fabricação de formas farmacêuticas ocorra de maneira adequada, é extremamente importante o estudo das propriedades de fluxo dos materiais, visto que possui uma influência direta na alimentação mecânica das máquinas, assim como nas propriedades físicas e mecânicas dos comprimidos (ROLIM, 2012).

A caracterização do fluxo de pós pode ser realizada por métodos diretos, quando são dinâmicos, e por métodos indiretos, quando as medições são realizadas em leitos estáticos (AULTON, 2004). Para isso, avaliou-se a razão de Hausner e o índice de Carl, que são medidas indiretas da densidade do pó, além do ângulo de repouso, medida indireta, e do tempo de escoamento, medida direta, das propriedades coesivas/adesivas do pó (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros avaliados para determinação das propriedades de fluxo do AAL.

<b>Propriedades de fluxo</b>	<b>Média</b>
Densidade aparente	0,27 g/mL
Densidade compactada	0,41 g/mL
Razão de Hausner	1,51
Índice de Carr (%)	34,1%
Ângulo de repouso	Infinito
Tempo de escoamento	Infinito

A densidade de um pó depende de muitas características, dentre elas, do empacotamento das partículas, podendo sofrer modificações à medida que se torna compacto. A compactação do pó o torna mais resistente à formação de arcos e ao fluxo, existindo duas medidas que podem prever a facilidade com que se torna consolidado, a razão de Hausner e o índice de Carr (AULTON, 2004).

A razão de Hausner relaciona a densidade compactada com a densidade aparente do pó e está diretamente relacionada ao atrito entre as partículas. Dessa forma, valores menores que 1,2 possuem baixo atrito entre as partículas, exibindo um melhor fluxo, enquanto que razões maiores que 1,5 são característicos de pós mais coesivos e menos livres. O índice de Carr é uma medida direta da resistência potencial dos arcos ou das pontes de um pó (PRISTA et al., 2011).

O AAL apresentou valores de razão de Hausner de 1,51 e índice de Carr de 34,1%, logo apresenta uma força de atrito elevada e um fluxo muito fraco. O que foi confirmado quando avaliado o ângulo de repouso e o tempo de escoamento. A medida do ângulo de repouso foi infinita, bem como o tempo de escoamento, uma vez que a massa adicionada do pó ficou totalmente retida no funil.

Apesar da simplicidade da medida do ângulo de repouso, ele representa uma característica importante do fluxo de pós. O início do deslizamento de uma partícula ocorrerá quando o ângulo de inclinação superar as forças de atrito, ao mesmo tempo que o fluxo cessará quando o ângulo de inclinação estiver abaixo do valor necessário para vencer a adesão/coesão (PRISTA et al., 2011).

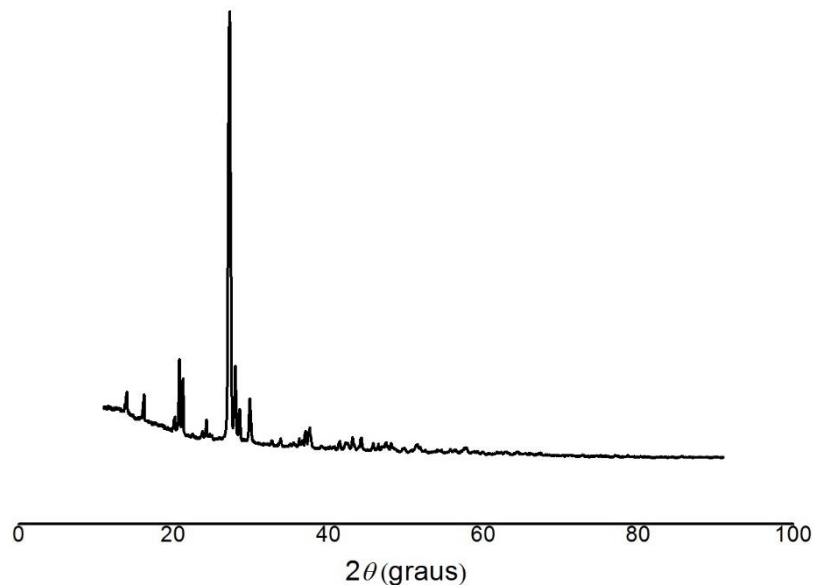
Vale ressaltar que o fluxo dos pós depende de vários fatores como morfologia, tamanho e distribuição das partículas, densidade, área e forças de superfície, umidade, presença de ativadores de fluxo, processo produtivo e composição química (GARCIA et al., 2012).

Tendo em vista que as características de fluxo do AAL são ruins, deve-se recorrer a excipientes que melhorem esse parâmetro no momento da formulação dos comprimidos.

### 3.3 Difração de raios-X

A difração de raios-X é uma técnica de caracterização de materiais que determina a presença das fases cristalinas presentes na amostra. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X (ALBERS et al., 2002). O difratograma do AAL está na figura 4. Pode-se observar a presença de um pico de maior intensidade, característico da amostra, próximo a  $30^\circ$  e picos secundários, menos intensos próximos a  $20^\circ$ .

Figura 4. Difratograma do AAL



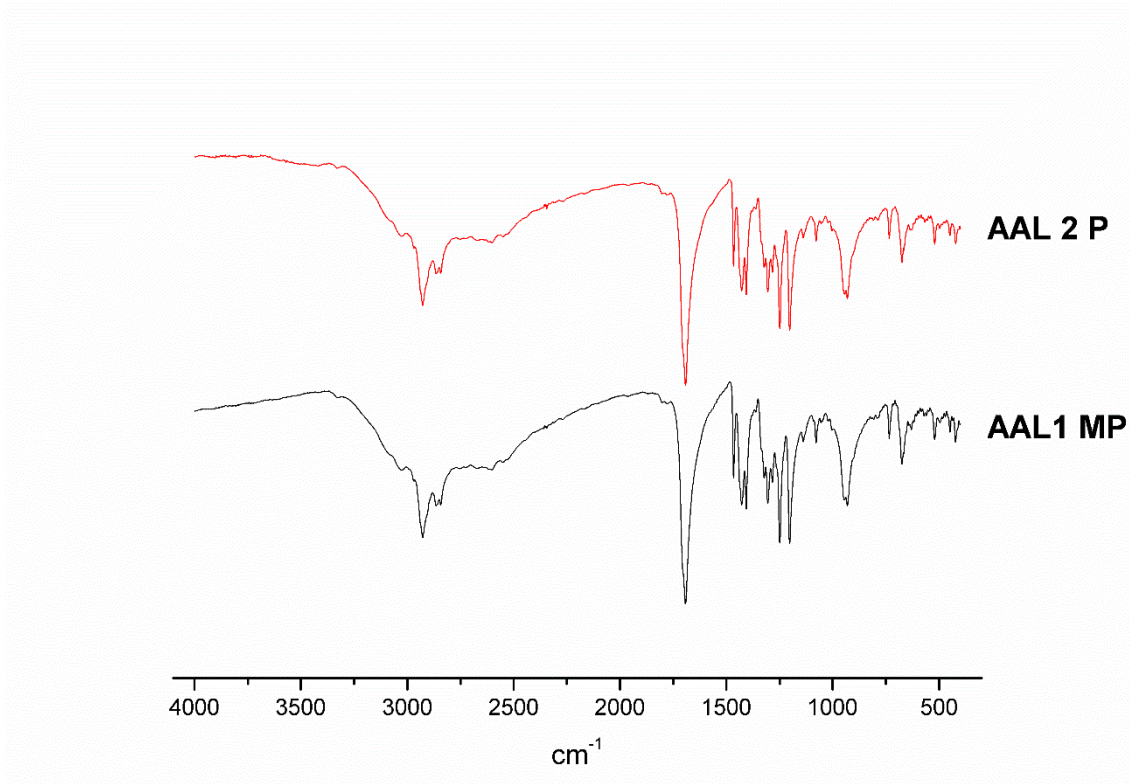
### 3.4 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

A espectroscopia do infravermelho estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria para determinar os níveis de energia de átomos ou moléculas e, assim, fornecer informações sobre a estrutura desta (MARIN, 2013).

Nesse estudo, foram obtidos dois espectros de absorção no infravermelho, um com a matéria-prima (1) e outro com o padrão USP (2) (figura 5), com a finalidade de comparar as

bandas de absorção e confirmar a identidade da matéria-prima utilizada nesse estudo. A análise dos dois espectros revelou a pureza da matéria-prima, tendo em vista que eles apresentaram as mesmas bandas de absorção.

Figura 5. Espectros de absorção na região do infravermelho do AAL



Dessa forma, é possível observar que, próximo a 3000 cm<sup>-1</sup>, tem-se o alongamento das ligações (CH<sub>2</sub>), próximo a 1600 cm<sup>-1</sup> tem-se a banda correspondente ao estiramento da carbonila (C=O), na faixa de 1400 cm<sup>-1</sup> pode-se observar um estiramento corresponde as ligações (CH), próximo a 1000 cm<sup>-1</sup> tem-se a deformação axial do grupo hidroxila (OH) do ácido carboxílico e em torno de 600 cm<sup>-1</sup> estão as vibrações da ligação (C-S).

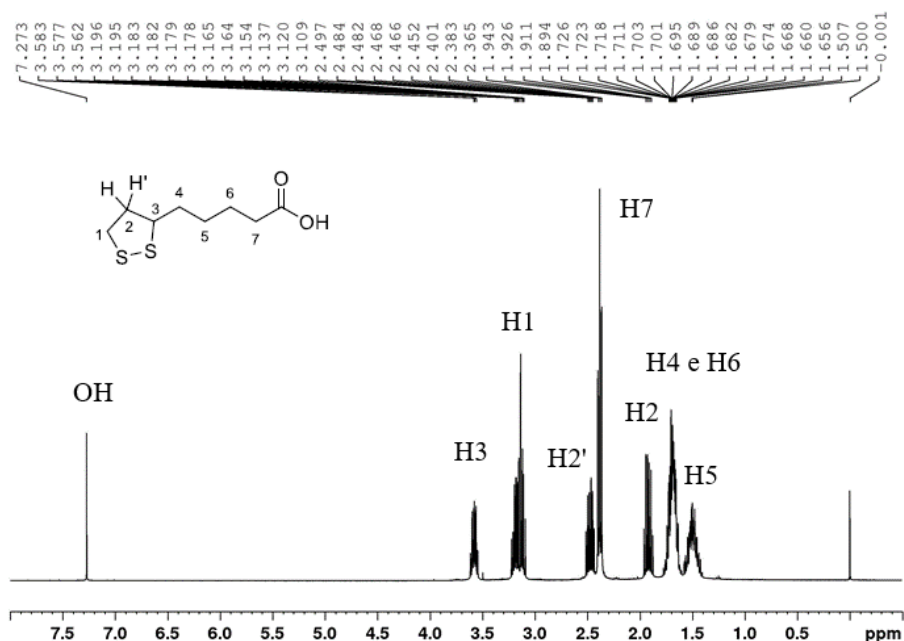
Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Ikuta e colaboradores (2014) onde verificaram as seguintes bandas para o AAL: 2933 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>), 1717 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1466 cm<sup>-1</sup> (CH) e 936 cm<sup>-1</sup> (OH), assim como em estudo realizado por Silva (2014), em que verificou os seguintes resultados: 2980 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>), 1690 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1250 cm<sup>-1</sup> (OH) e 675 cm<sup>-1</sup> (C-S).

### 3.5 RMN

O ensaio de RMN foi realizado para confirmar a autenticidade da matéria-prima utilizada neste estudo, tendo em vista que esta é uma das ferramentas mais importantes para a elucidação estrutural de uma molécula (TELES et al., 2015). Dessa forma, os espectros de RMN de  $H^1$  e de  $C^{13}$  do padrão analítico e da matéria-prima foram avaliados e comparados, sendo obtidos deslocamentos químicos praticamente idênticos.

No espectro de RMN  $H^1$  do AAL padrão (figuras 6) é possível observar os seguintes sinais: AAL padrão,  $\delta$  (ppm) – multipletto em torno de 1,497 referente ao H5; multipletto em torno de 1,689 referente ao H4 e H6; octeto em torno de 1,926 referente ao H2; triplo em torno de 2,383 referente ao H7; multipletto em 2,468 que corresponde ao H2'; multipletto em torno de 3,179 correspondente ao H1; octeto em 3,577 referente ao H3 e um singletto em 7, 273 do H da OH.

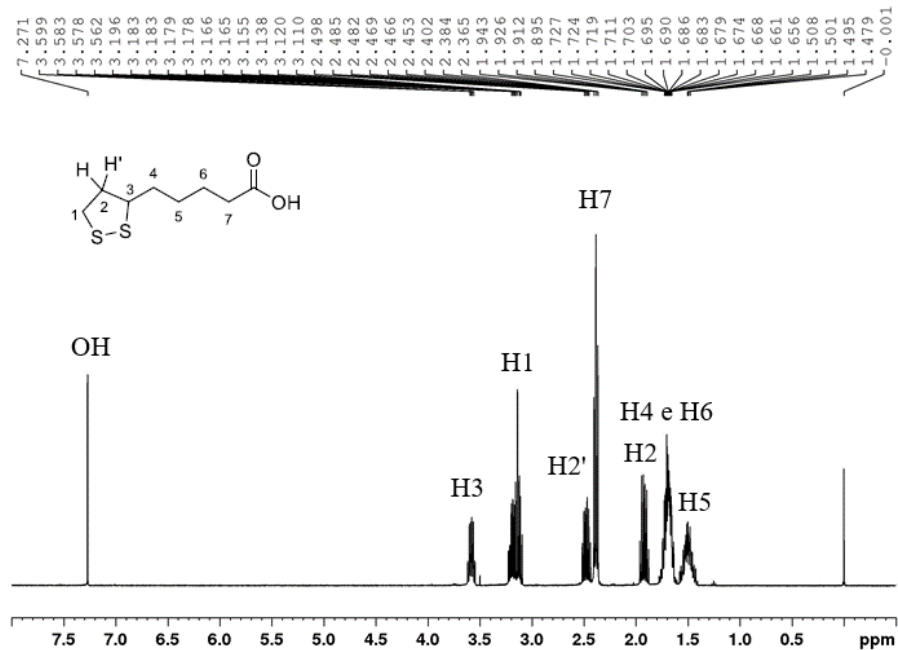
Figura 6. Espectro de RMN  $H^1$  do AAL padrão USP em clorofórmio deuterado, 400 MHz.



O espectro de RMN  $H^1$  do AAL matéria-prima (figura 7) apresenta os seguintes sinais:  $\delta$  (ppm) - multipletto em torno de 1,498 referente ao H5; multipletto em torno de 1,686 referente ao H4 e H6; octeto em torno de 1,926 referente ao H2; triplo em torno de 2,384 referente ao H7; multipletto em 2,482 que corresponde ao H2'; multipletto em torno de 3,179 correspondente ao H1; octeto em 3,578 referente ao H3 e um singletto em 7, 271 do H da OH.

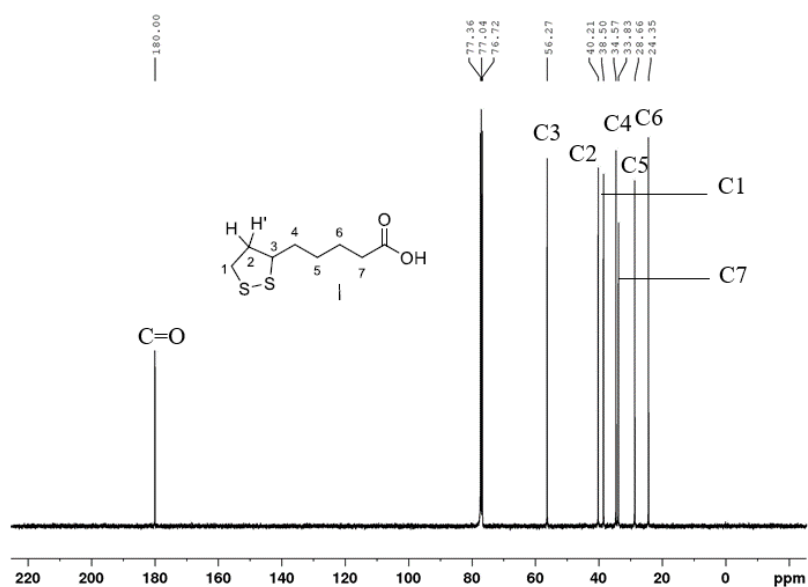


Figura 7. Espectro de RMN  $H^1$  do AAL matéria-prima em clorofórmio deuterado, 400 MHz.



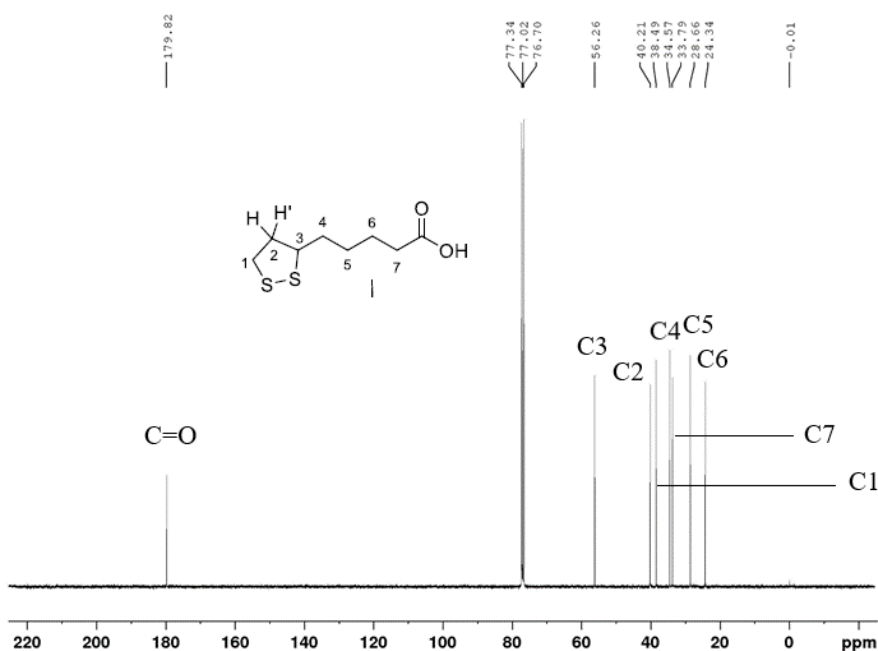
Com relação ao espectro de RMN  $C^{13}$  do AAL padrão analítico (figura 8) em clorofórmio deuterado (100 MHz) foram observados os seguintes sinais: 24,35 ppm (C6); 28,66 ppm (C5); 33,83 ppm (C7); 34,57 ppm (C4); 38,5 ppm (C1); 40,21 ppm (C2); 56,27 ppm (C3) e 180 ppm para a carbonila.

Figura 8. Espectro de RMN  $C^{13}$  do AAL padrão USP em clorofórmio deuterado, 100 MHz.



O espectro de RMN  $C^{13}$  para o AAL matéria-prima (figura 9) apresenta os sinais dos deslocamentos químicos bastante semelhantes aos do padrão analítico, diferindo apenas em algumas casas decimais, confirmando a autenticidade do material utilizado.

Figura 9. Espectro de RMN  $C^{13}$  do AAL matéria-prima em clorofórmio deuterado, 100 MHz.



#### 4 CONCLUSÃO

Os estudos de pré-formulação farmacêutica são extremamente importantes para a obtenção de dados sobre o material que será utilizado para o delineamento da forma farmacêutica. Assim, os dados obtidos sobre o tamanho das partículas e as características de fluxo foram cruciais para o planejamento da formulação dos comprimidos de AAL. Além disso, a caracterização da matéria-prima por técnicas analíticas demonstrou que se trata efetivamente do AAL através da comparação com os dados obtidos com o padrão analítico, aumentando a segurança do estudo.

#### REFERÊNCIAS

AULTON, M.; TAYLOR, K. M. G. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

BILLGREN, E. S.; CICHILLO, R. M.; NESBITT, N. M. BOOKER, S. J. Lipoic acid biosynthesis and enzymology. In book: *Comprehensive Natural Products Chemistry II. Chemistry and Biology. Edition II.* Elsevier, 2010: 181-212.

BLEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. An Overview of Lipoate Chemistry. In book: *Lipoic acid in health and disease.* Marcel Dekker, 1997.

CARTER, M.; LOBO, A.; TRAVIS, S. Guidelines for the management of inflammatory bowel diseases in adults. *Gut*. 2004, 11:1135-146.

FREITAS, R. M. Estudos farmacológicos do ácido lipoico nas alterações comportamentais e na atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após convulsão induzidas por pilocarpina. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2009, 6(1):65-72.

IKUTA, N.; TANAKA, A.; OTSUBO, A.; OGAWA, N.; YAMAMOTO, M.; MIZUKAMI, T.; ARAI, S.; OKUNO, M.; TERAOKA, K.; MATSUGO, S. Spectroscopic Studies of R(+)- $\alpha$ -Lipoic Acid-Cyclodextrin Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15:20469-20485.

MACZUREK, A.; HAGER, K.; KENKLIES, M.; SHARMAN, M.; MARTINS, R.; ENGEL, J.; CARLSON, D. A.; MÜNCH, G. Lipoic acid as na anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60: 1463-1470.

MATOS, A. P. S. **Dissertação.** Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata contendo diazepam. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2014.

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. E. L. Antioxidant and Prooxidant Activities of  $\alpha$ -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 2002, 182:84-90.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. Tecnologia Farmacêutica. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2011.

ROCHETTE, L.; GHIBU, S.; RICHARD, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y. Direct and indirect antioxidante properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57:114-125.

ROLIM, L. A. **Tese.** Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da filariose linfática e estudos de estabilidade forçada dos fármacos. Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), Recife, 2012.

SILVA, P. C. D. **Dissertação.** Estudo termoanalítico de compatibilidade fármaco-excipientes e de estabilidade entre ácido alfa lipoico e adjuvantes tecnológicos. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, 2014.

TELES, R. R.; FRANÇA, J. A. A.; VÁSQUEZ-NAVARRO, A.; HALLWASS, F. Atribuição da estereoquímica da  $\alpha$ -santonina através das medidas do acoplamento dipolar residual. *Quím. Nova* 2015, 38(10):1345-1350.

## Capítulo 4

### Obtenção Tecnológica de Comprimidos de Liberação Modificada de ácido alfa-lipoico

Grasielly Rocha Souza<sup>1</sup>, Louise Cristina Freitas Saraiva<sup>1</sup>, Mírian Lima dos Santos<sup>1</sup>, Antônia de Sousa Leal<sup>2</sup>, Ana Cristina Sousa Gramoza Vilarinho<sup>3</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>4</sup>, Lívio César Cunha Nunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI

<sup>2</sup> Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Grajaú-MA

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife-PE

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, Petrolina-PE

### RESUMO

O ácido alfa-lipoico (AAL) é um composto sintetizado de forma endógena por células procarióticas e eucarióticas, desempenhando um papel central no metabolismo energético celular. Possui uma excelente atividade antioxidante e diversos estudos já demonstraram o seu potencial terapêutico, inclusive nas doenças inflamatórias intestinais (DII). Entretanto, estudos farmacocinéticos demonstraram que a sua meia-vida é curta, logo esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter comprimidos com liberação modificada, sendo o AAL liberado no íleo terminal ou cólon proximal. Para isso, foram utilizados AAL como ativo, os polímeros hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose (CMC), mesocarpo de babaçu e estearato de magnésio como excipientes e Eudragit® S como revestimento. Os comprimidos foram obtidos por meio de compressão direta e o controle de qualidade físico-químico foi realizado conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira, sendo avaliados o peso médio, dureza, friabilidade, doseamento e dissolução *in vitro*. Apenas as formulações dos lotes 2 e 4 resultaram em comprimidos aprovados no controle de qualidade, apresentando peso médio de 1001,5 mg e 1009,3 mg, respectivamente. Com relação a dureza, o lote 2 apresentou uma média de 12,11 Kgf e 0,5% de friabilidade, esses testes não se aplicam ao lote 4, pois possuem revestimento. O doseamento demonstrou um valor de 97 e 98% do valor teórico de AAL para os lotes 2 e 4 e pela dissolução *in vitro* pode-se observar que os comprimidos do lote 2 apresentaram uma liberação imediata tanto em pH 1,2 como em pH 7,4, uma vez que em 30 minutos mais de 90% do composto havia sido liberado, enquanto que os comprimidos do lote 4 apresentaram uma liberação modificada, uma vez que no pH 1,2 menos de 20% do conteúdo

foi liberado e no pH 7,4 houve solubilização do revestimento com liberação do ativo em aproximadamente 30 minutos. Dessa forma, foram obtidos comprimidos revestidos com liberação modificada, ideais para utilização por pacientes com DII.

**Palavras-chave:** Ácido tióctico; Comprimidos Revestidos; Doenças Inflamatórias Intestinais; Sistema de liberação modificado.

## **ABSTRACT**

Alpha-lipoic acid (AAL) is a compound endogenously synthesized by prokaryotic and eukaryotic cells, playing a central role in cellular energy metabolism. It has excellent antioxidant activity and several studies have already demonstrated its therapeutic potential, including inflammatory bowel diseases (IBD). However, pharmacokinetic studies have shown that their half-life is short, so this work was developed with the objective of obtaining modified-release tablets, with AAL released in the terminal ileum or proximal colon. For this, AAL were used as active, the polymers hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and carboxymethylcellulose (CMC), babassu mesocarp and magnesium stearate as excipients and Eudragit® S as coating. The tablets were obtained by direct compression and the physical-chemical quality control was performed as recommended by the Brazilian Pharmacopoeia, being evaluated the average weight, hardness, friability, dosage and dissolution in vitro. Only batch 2 and formulation 4 resulted in quality control approved tablets, with an average weight of 1001.5 mg and 1009.3 mg, respectively. Concerning hardness, lot 2 presented an average of 12.11 Kgf and 0.5% of friability, these tests do not apply to lot 4, since they have coating. The assay showed a value of 97 and 98% of the theoretical AAL value for batches 2 and 4 and upon in vitro dissolution it was observed that the batch 2 tablets showed immediate release at both pH 1.2 and pH 7.4, since within 30 minutes more than 90% of the compound had been released, while the lot 4 tablets showed a modified release, since at pH 1.2 less than 20% of the content was released and at pH 7.4 there was solubilization of the active release coating in approximately 30 minutes. Thus, modified release coated tablets were obtained, ideal for use by IBD patients.

**Keywords:** Thiocctic acid; Coated Tablets; Inflammatory Bowel Diseases; Modified Release System.

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido alfa lipoico (AAL), também denominado de ácido tioctico, é derivado do ácido octanoico, assim, possui oito átomos de carbono em sua cadeia e um anel ditiolano (BILLIGREN et al., 2010). Esse composto é sintetizado de forma endógena tanto em células procarióticas quanto nas eucarióticas, atuando de forma central no metabolismo energético celular (SMITH et al., 2004). Estudos preliminares demonstraram a sua ação como antioxidante (BIEWENGA et al., 1997), sendo encontradas outras evidências da sua ação em muitas outras patologias, como nas doenças inflamatórias intestinais (DII) (SUN et al., 2015).

As DII são representadas por duas patologias principais, a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. A doença de Crohn é caracterizada por uma inflamação transmural ao longo de todo o trato digestivo, particularmente no íleo terminal e no cólon proximal, enquanto a retocolite ulcerativa é causada por uma inflamação persistente em algumas partes do trato digestivo, principalmente no cólon e no reto (KANGAWA et al., 2016). Acredita-se que o início e a progressão das doenças ocorrem de modo multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e imunológicos (MALOY; POWRIE, 2011).

O processo inflamatório na mucosa é resultado direto da ativação das células do sistema imune, ao mesmo tempo que há uma superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN), agravando a inflamação, num processo de retroalimentação positiva. Nesse sentido, acredita-se que a administração de compostos antioxidantes seja eficaz na remissão dos sintomas (ZHU; LI, 2012).

Diversos estudos pré-clínicos já demonstraram os efeitos benéficos do AAL em modelos de colite e/ou ileíte induzidas por agentes químicos em murinos. Em El-Gowelli e colaboradores (2015), os resultados demonstraram excelentes atividades antioxidante e anti-inflamatória do composto. Em Sun e colaboradores (2015) houve melhora significativa dos sinais clínicos da doença no grupo tratado com AAL. Esses resultados foram confirmados por outros trabalhos, como Trivedi & Jena (2013), Sehirli e colaboradores (2008), dentre outros.

Contudo, estudos farmacocinéticos demonstraram que a absorção do AAL ocorre de forma bastante rápida, no trabalho realizado por Breithaupt-Grogler e colaboradores (1999), foi possível observar que as concentrações plasmáticas máximas eram evidentes entre 30 e 60 minutos após uma dose oral. Além disso, a eliminação do composto ocorre de maneira igualmente rápida.

Nesse contexto, as formas farmacêuticas com liberação modificada são primordiais para contornar esses problemas, uma vez que podem retardar ou prolongar a dissolução do ativo.

Dessa forma, podem ser delineadas com o objetivo de tornar a forma farmacêutica gastrorresistente, prolongar o efeito terapêutico, liberar o fármaco em um local específico do trato gastrointestinal ou após um período definido de tempo (PEZZINI et al., 2007).

Atualmente, os sistemas que liberam fármacos no cólon são uma realidade, contrapondo-se a ideia de alguns anos atrás, quando esse segmento do trato gastrointestinal era considerado apenas como um local de reabsorção de água e fermentação de carboidratos (FREIRE et al., 2006). O interesse principal nesse tipo de liberação é a possibilidade de melhorar o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes acometidos com as DII, tendo em vista que pode haver aumento da eficácia e redução dos efeitos colaterais (REN et al., 2016).

Sabe-se que um sistema ideal para liberar um fármaco no cólon deve resistir às variações de pH ao longo do trato gastrointestinal. Nesse sentido, diversas estratégias estão sendo investigadas para esse fim, como a utilização de pró-fármacos, sistemas ativados pela microflora, dependentes do tempo e do pH. Os sistemas dependentes do pH consistem em materiais poliméricos insolúveis em meio ácido e solúveis em pH mais próximo a neutro, utilizados no revestimento de comprimidos, cápsulas, pellets, dentre outros. Esses polímeros devem ser capazes de prevenir a liberação do composto no estômago e intestino delgado proximal e promover-lo no íleo terminal ou cólon proximal (FREIRE et al., 2006).

Dessa forma, tendo em vista o potencial antioxidante do AAL, podendo auxiliar no tratamento das DII, e as suas características farmacocinéticas, que consiste num tempo de meia-vida extremamente curto e uma rápida metabolização, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter comprimidos revestidos com um polímero insolúvel em pH ácido, o Eudragit® S, de modo a promover uma liberação modificada do AAL, diretamente no alvo terapêutico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Desenvolvimento dos comprimidos de AAL**

Para a obtenção da forma farmacêutica foram utilizados os seguintes materiais: AAL (lote: 1706051; China) e os excipientes carboximetilcelulose (CMC) (lote: 16E93; China), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (lote: 13189/16; México) e estearato de magnésio (lote: sem número; México) foram adquiridos através da empresa Viafarma®. O mesocarpo de babaçu foi adquirido em uma farmácia de manipulação de Teresina, Piauí. O revestimento utilizado para proporcionar uma liberação colônica foi o Eudragit® S fornecido pela Colorcon®.

A composição das formulações está descrita na Tabela 1. Vale ressaltar que a quantidade de cada excipiente foi determinada por meio de estudos preliminares, sendo realizados testes em compressora rotativa, marca Lawes<sup>®</sup>, modelo W-216 com 16 punções de 9 mm. Os constituintes de cada lote tiveram as partículas calibradas em tamis de malha 60 Mesh, foram misturados grosseiramente, armazenados e enviados para a empresa Colorcon do Brasil Ltda (Cotia, SP), para a obtenção dos comprimidos pelo método de compressão direta.

Tabela 1. Composição dos comprimidos de liberação modificada de AAL utilizados nesse estudo.

	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8
AAL	300	300	300	300	300	300	300	300
HPMC	300	450	300	450	-	-	-	-
CMC	-	-	-	-	300	450	300	450
MB	390	240	390	240	390	240	390	240
Estearato de magnésio	10	10	10	10	10	10	10	10
Eudragit S500 <sup>®</sup>	-	-	10	10	-	-	10	10
Peso (mg)	1000	1000	1010	1010	1000	1000	1010	1010

AAL ácido alfa-lipoico; HPMC hidroxipropilmetilcelulose; CMC carboximetilcelulose; MB mesocarpo de babaçu.

## 2.2 Controle de qualidade físico-químico das formas farmacêuticas

O controle de qualidade foi realizado conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> edição (BRASIL, 2010), sendo avaliados o peso médio, a dureza, a friabilidade, o doseamento de AAL e a dissolução *in vitro*.

### 2.2.1 Peso Médio

Para a determinação do peso médio, foram pesados individualmente 20 comprimidos, retirados de forma aleatória, em balança analítica, sendo obtida a média aritmética das medidas. De acordo com a Farmacopeia (BRASIL, 2010), podem ser toleradas apenas duas unidades fora do limite de variação de  $1000 \text{ mg} \pm 5,0\%$ , contudo, nenhuma pode estar acima ou abaixo do dobro da porcentagem indicada.



### 2.2.2 Dureza

A avaliação da dureza de um comprimido possibilita a determinação da resistência ao esmagamento ou a ruptura quando submetido a uma pressão radial, sendo diretamente proporcional a força de compressão e inversamente proporcional à porosidade (BRASIL, 2010).

Para isso, foram retirados 10 comprimidos, de forma aleatória, e a análise desse parâmetro foi realizada em durômetro Pharmatron<sup>®</sup>, os resultados estão expressos como a média dos resultados.

### 2.2.3 Friabilidade

O teste de friabilidade de um comprimido consiste na medida da sua resistência à abrasão, sendo indicado apenas para comprimidos não revestidos (BRASIL, 2010). Para isso, 10 comprimidos foram avaliados em friabilômetro Electrolab<sup>®</sup>, sendo submetidos a 100 rotações.

O valor da friabilidade é obtido pela diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos, sendo calculado o percentual da perda de pó. A Farmacopeia Brasileira permite uma perda de até 1,5% do seu peso (BRASIL, 2010).

### 2.2.4 Desintegração

A avaliação da desintegração é realizada com a finalidade de verificar se os comprimidos desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote são submetidas à ação de aparelhagem específica sob condições experimentais pré-determinadas (BRASIL, 2010).

Dessa forma, foram utilizados 6 comprimidos de cada lote nos meios ácido (pH 1,2) e básico (pH 7,4) e o tempo necessário para os comprimidos desintegrarem foi cronometrado.

### 2.2.5 Doseamento de AAL nas formulações

Para o doseamento do AAL foram utilizados 20 comprimidos de cada lote, os quais foram triturados em gral até a obtenção de um pó. Foram pesados 300 mg do pó, sendo transferidos para balões volumétricos de 25 mL e solubilizados em etanol. Posteriormente, uma

alíquota de 830  $\mu\text{L}$  foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com HCl 0,1 M (pH 1,2) ou com tampão fosfato (pH 7,4). Vale ressaltar que todas as análises foram realizadas em triplicata.

As amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro UV-Vis em 334 nm e as médias das absorvâncias obtidas foram convertidas para quantidade de AAL, através da interpolação com uma curva de calibração preparada com um padrão AAL de 1000 mg/mL para cada meio.

### 2.2.6 Dissolução *in vitro*

O ensaio de dissolução foi realizado com a finalidade de verificar a quantidade de AAL dissolvido nos meios ácido (pH 1,2) e básico (pH 7,4), utilizando o método de pás. Para isso, utilizou-se 450 mL de cada meio de dissolução e uma velocidade de agitação de 50 rpm, vale ressaltar que o sistema foi mantido em  $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ . Foram avaliados 6 comprimidos de AAL para cada meio de dissolução, sendo a seleção realizada de forma aleatória. A liberação do ativo foi monitorada nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, sendo as amostras filtradas e as absorvâncias foram verificadas em espectrofotômetro UV-Vis para determinação da concentração. Os dados foram representados graficamente como percentual cumulativo de liberação do AAL (calculada a partir da quantidade total de AAL em cada formulação) versus tempo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Desenvolvimento dos comprimidos de AAL

Os comprimidos de AAL foram planejados com o objetivo de auxiliar no tratamento das DII, logo a liberação do composto no íleo terminal e no cólon seria o ideal, para isso, realizou-se o revestimento com o polímero insolúvel em meio ácido, Eudragit S100. Além disso, também era desejável que houvesse uma liberação prolongada, uma vez que os pacientes possuem um trânsito intestinal acelerado (MALOY; POWRIE, 2011). Por conta disso, foram utilizados os polímeros hidrofílicos hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose (CMC) a fim de constituir sistemas monolíticos.

Os estudos sobre as propriedades de fluxo demonstraram que o AAL possui essa característica bastante deficiente, havendo necessidade de adicionar excipientes que

melhorassem esse parâmetro, para isso, foram utilizados o estearato de magnésio como lubrificante e o mesocarpo de babaçu (MB) como deslizante. Vale ressaltar que estudos demonstraram a degradação do composto na presença da luz, caracterizada por uma mudança física no composto (KOUFARI, 2014), logo o MB também foi utilizado com a função de antioxidante da formulação, protegendo o ativo de sofrer degradação.

Os comprimidos podem ser obtidos através da compressão direta da mistura do fármaco com os excipientes ou através da compressão do material previamente granulado. Esse processo de granulação pode ser realizado por via seca ou úmida, no primeiro caso, o granulado será obtido por meio de diversas operações de compressão e fragmentação, enquanto no segundo é adicionado à mistura de pós um agente aglutinante, obtendo-se uma massa plástica que pode se transformar facilmente em grânulos, sendo comprimidos em seguida (PRISTA et al., 2011).

O processo de granulação apresenta algumas vantagens, como maior homogeneidade da mistura, maior densidade, melhor fluidez, melhor compressibilidade, entre outras. Contudo, o processo é bastante complexo, necessitando de várias etapas para obtenção do granulado, elevando o custo do processo. Dessa forma, a compressão direta da mistura dos pós tem sido o método mais utilizado nos últimos anos (SOARES; PETROVICK, 1999). Sabendo-se que o AAL apresenta instabilidade em meio aquoso e possui ponto de fusão em torno de 60 °C, o método de compressão direta torna-se a melhor opção para obtenção dos comprimidos.

Os comprimidos foram obtidos em escala industrial, sendo utilizada compressora Sanchez - Junior Press<sup>®</sup> com punção oblongo 18 mm x 9,5 mm. Entretanto, apenas os lotes 2 e 4 tiveram a dureza e a friabilidade necessárias para assegurar a qualidade final do produto. Como os demais lotes não tiveram os resultados esperados durante o processo de produção, os comprimidos não foram obtidos.

## **2.2 Controle de qualidade físico-químico**

O controle de qualidade físico-químico foi realizado apenas com os comprimidos dos lotes 2 e 4 e os resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do controle de qualidade físico-químico

Parâmetros	Especificações (BRASIL, 2010)	Lote 2	Lote 4
Peso médio (mg)	1000 mg±5%	1001,5	1009,3
Dureza (Kgf)	Informativo	12,11	-
Friabilidade (%)	< 1,5	0,5	-
Teor (%)	Entre 90-110	97	98
Desintegração (min)		7''	35''

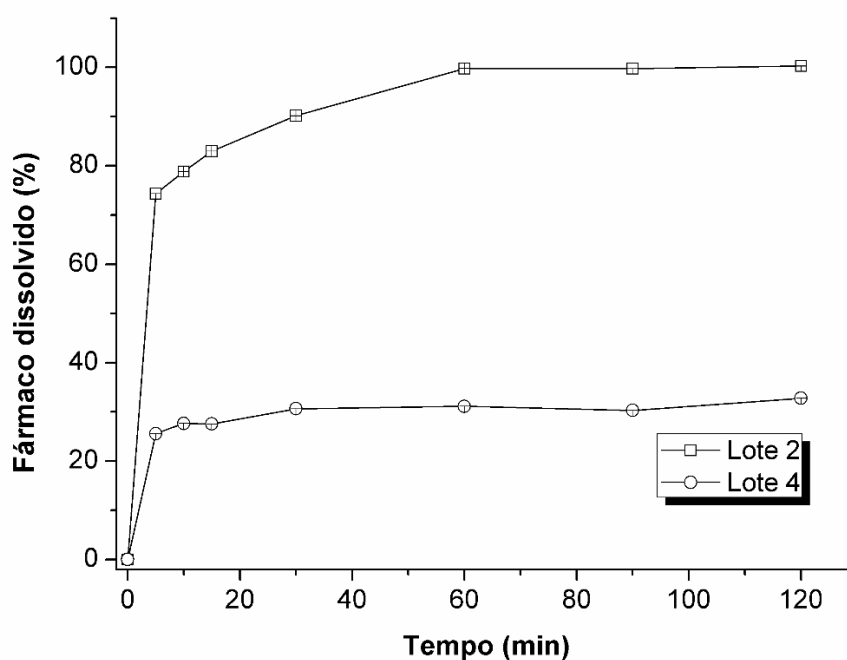
Os comprimidos do lote 2 apresentaram valores de dureza e friabilidade que garantem a qualidade do produto. Embora não haja uma especificação da Farmacopeia Brasileira para a dureza, um valor mínimo de 4 Kgf é considerado suficiente para se obter comprimidos fisicamente estáveis que não são propensos a quebrar durante o manuseio de rotina. A friabilidade de todos os comprimidos foi inferior a 1%, indicando que os comprimidos teriam estabilidade física suficiente durante a embalagem, transporte e manuseio (GUERRA-PONCE et al., 2016).

Vale ressaltar que os comprimidos do lote 4 possuem revestimento com Eudragit®S500, logo não há necessidade de realizar os testes de dureza e friabilidade. Além disso, não foi possível realizar otimizações nas outras formulações, uma vez que o processo de compressão foi realizado na indústria farmacêutica Colorcon.

Com relação ao teor, os comprimidos dos dois lotes estavam dentro das especificações exigidos pela Farmacopeia Brasileira, com 97 e 98% do valor declarado e o teste de desintegração apresentou resultados satisfatórios, com o lote sem revestimento desintegrando completamente em 7 minutos e o lote com revestimento em 35 minutos.

Por fim, realizou-se o ensaio de dissolução *in vitro* para verificar o comportamento dos comprimidos não revestidos (lote 2) e revestidos (lote 4). Inicialmente foi utilizado um meio ácido, com pH 1,2, a fim de mimetizar o suco gástrico. Os resultados estão na Figura 2.

Figura 2. Perfil de dissolução dos comprimidos de AAL em pH 1,2.



É possível observar que os comprimidos sem revestimento tiveram 90% do AAL liberado após 30 minutos do teste, mesmo com a utilização de uma concentração elevada do polímero HPMC, este não foi capaz de prolongar a liberação do ativo. Contudo, o revestimento com Eudragit® S preveniu a liberação do composto nesse meio de dissolução, havendo aproximadamente 20% de liberação.

Quando se deseja prolongar a liberação de um fármaco numa formulação farmacêutica, utiliza-se, na maioria das vezes, algum derivado da celulose, sendo a HPMC uma das mais utilizadas para as formas orais. Nesse sentido, a sua capacidade de intumescimento/relaxamento possui ação direta na cinética de liberação. Além disso, a sua natureza não tóxica e não iônica, aliados a sua capacidade de incorporar quantidades elevadas de substâncias ativas, a simplicidade, a rapidez e a economia da tecnologia associada à sua preparação e à possibilidade de fabricação de comprimidos matriciais por compressão direta, também contribuem diretamente para a sua escolha (LOPES et al., 2005).

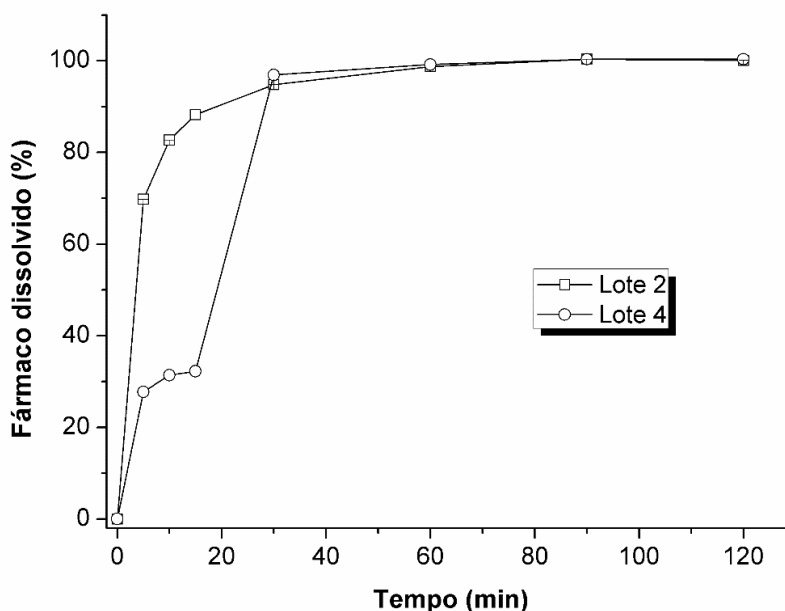
Estudos já demonstraram que a liberação do fármaco nos sistemas desenvolvidos com HPMC é dependente da velocidade de penetração da água no sistema. Assim, quando utilizado em concentrações elevadas, as cadeias lineares de HPMC formam um emaranhado, resultando numa camada gelatinosa bastante resistente. Isso não é observado quando uma menor concentração do polímero é utilizada, pois obtém-se uma menor viscosidade, o que possibilita

uma liberação quase imediata dos fármacos (COLOMBO et al., 2000). Dessa forma, apesar de ter sido utilizada uma alta concentração nas formulações desenvolvidas, a HPMC apresentava uma viscosidade de 5,9 mPa, logo essa característica pode ter contribuído para o resultado obtido nesse estudo.

Ademais, o mesocarpo de babaçu foi utilizado nas formulações como agente deslizante pelo seu alto teor de amido (68,3%) e antioxidante, contudo, estudos já demonstraram a sua ação como agente desintegrante (NONATO et al., 2013). Dessa forma, a quantidade utilizada nos comprimidos pode ter favorecido essa característica, acelerando a penetração da água no sistema, tornando-o de liberação imediata.

Ao observar o perfil de dissolução em pH 7,4 (Figura 3), cuja intenção foi simular o meio entérico, pode-se verificar que os comprimidos sem revestimento também tiveram o seu conteúdo totalmente liberado em aproximadamente 30 minutos. Assim, da mesma forma que o ensaio anterior, não houve modulação da liberação pelo HPMC.

Figura 3. Perfil de dissolução dos comprimidos de AAL em pH 7,4



Com relação aos comprimidos com revestimento, aproximadamente em 30 minutos houve a solubilização do polímero Eudragit<sup>®</sup> S, sendo possível visualizar a sua saída dos comprimidos, em seguida, todo o conteúdo de AAL foi liberado, entretanto, também não houve modulação da liberação pelo HPMC.

Mesmo que todo o AAL tenha sido liberado em 30 minutos no pH 7,4, a presença do revestimento protegeu a sua liberação no meio ácido. Portanto, os comprimidos revestidos devem liberar o seu conteúdo apenas ao chegar no intestino, cujo pH está mais próximo a neutro. Dessa forma, esse trabalho possibilitou o desenvolvimento de uma forma farmacêutica com liberação modificada com potencial para ser utilizado em pacientes com DII.

#### 4 CONCLUSÃO

Os comprimidos de AAL obtidos apresentaram as características físico-químicas de acordo com o exigido pela Farmacopeia Brasileira. Com relação ao perfil de dissolução, os comprimidos sem revestimento liberaram o seu conteúdo após 30 minutos nos dois meios de dissolução utilizados, enquanto que os revestidos com Eudragit<sup>®</sup> S500 foram gastrorresistentes e liberaram o seu conteúdo apenas no pH entérico, logo possuem potencial para ser utilizados por pacientes acometidos pelas DII.

#### REFERÊNCIAS

BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. **Gen. Pharmac.** 1997, 29(3):315-331.

BREITHAUPT-GROGLER, K.; NIEBCH, G.; SCHNEIDER, E.; ERB, K.; HERMANN, R.; BLUME, H. H.; SCHUG, B. S.; BELZ, G. G. Dose-proportionality of oral thioctic acid – coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 1999, 8(1):57-65.

BILLIGREN, E. S.; CICCHILLO, R. M.; NESBIT, N. M.; BOOKER, S. J. Lipoic acid biosynthesis and enzymology. In book: *Comprehensive Natural Products Chemistry II: Chemistry and Biology.* Elsevier. Edition II. 2010.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, DF, 2010, 5 ed.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **PSTT.** 200; 3(6):198-204.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II-Tipos de sistemas utilizados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 2006, 42(3):337-355.

GUERRA-PONCE, W. L.; GRACIA-VÁSQUEZ, S. L.; GONZÁLEZ-BARRANCO, P.; CAMACHO-MORA, I. A.; GARCIA-VÁSQUEZ, Y. A.; OROZCO-BELTRÁN, E.; FELTON, L. A. In vitro evaluation of sustained release matrix tablets containing ibuprofen: a

model poorly water-soluble drug. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2016, 52(4):751-759.

KANGAWA, Y.; YOSHIDA, T.; MARUYAMA, K.; OKAMOTO, M.; KIHARA, T.; NAKAMURA, M.; OCHIAI, M.; YOSHITAKA, H.; HAYASHI, S.; SHIBUTANI, M. Cilostazol and enzymatically modified isoquercitrin attenuate experimental colitis and colon cancer in mice by inhibiting cell proliferation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology** 2016, 100, 103-114.

KOUFAKI, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patente review (2011-2014). **Expert Opin. Ther. Patents**. 2014, 24(9):993-1005.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2005, 41(2):198-204.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**. 2011, 474.

NONATO, R. C.; FERREIRA, P. R. B.; SÁ, L. L. F.; OLIVEIRA, F. A.; NUNES, L. C. C.; ALBUQUERQUE, W. F. Composição centesimal e fitoquímica do mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*) de regiões do Piauí e Maranhão. **Biofar**. 2013, 9(2):130-138.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e mutiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2007, 43(4):491-502.

REN, Y.; JIANG, L.; YANG, S.; GAO, S.; YU, H.; HU, J.; HU, D.; MAO, W.; PENG, H.; ZHOU, Y. Design and preparation of a novel colon-targeted tablet of hydrocortisone. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2016, 52(2):239-250.

SMITH, A. R.; SHENVI, S. V.; WIDLANSKY, M.; SUH, J. H.; HAGEN, T. M. Lipoic acid as a Potential Therapy for Chronic Diseases Associated with Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**. 2004, 11:1135-1146.

SEHIRLI, A. O.; TATLIDEDE, E.; YÜKSEL, M.; CETINEL, S.; ERZIK, C.; YEGEN, B.; SENER, G. Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid Against Oxidative Injury in TNBS-induced Colitis. **Erciyes Týp Dergisi (Erciyes Medical Journal)** 2009;31(1):015-026.

SOARES, L. A. L.; PETROVICK, P. R. Física da compressão. **Caderno de Farmácia**. 1999, 15(2):65-79.

SUN, J.; ZHANG, H.; GUAN, L.; ZHOU, H.; SUN, M. Alpha-lipoic acid attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. **Int. J. Clin Exp Med**. 2015, 8(1):358-367.

TRIVEDI, P. P.; JENA, G. B. Role of a-lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. **Food and Chemical Toxicology** 2013; 59, 339–355.



ZHU, H.; LI, R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine** 2012, 237:474-480.

## **4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

---

## CONCLUSÕES

- I. Os dados obtidos através da prospecção científica e tecnológica demonstraram o potencial do AAL como antioxidante e anti-inflamatório, podendo ser utilizado como adjuvante no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII).
- II. A prospecção tecnológica revelou uma carência de produtos contendo AAL destinados ao tratamento das DII, sendo uma área disponível para investigação.
- III. Foi desenvolvido um método para quantificação do AAL por espectrofotometria UV-Vis, com baixo custo e grande facilidade de execução. Este foi validado segundo a legislação vigente, RDC nº 166 de 2017, obtendo-se um método linear, preciso, exato e robusto.
- IV. No estudo de pré-formulação do AAL foi possível verificar que o pó apresenta uma coloração amarela, com tendência a formar aglomerados. O MEV mostrou partículas com estrutura cristalina, confirmados pelo difratograma. Além disso, as propriedades de fluxo do material foram ruins, havendo a necessidade de utilizar excipientes que melhorem essa característica.
- V. O AAL utilizado como matéria-prima para obtenção dos comprimidos foi caracterizado através de comparação com padrão analítico USP pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN), as quais confirmaram a identidade do material.
- VI. Foram obtidos comprimidos contendo AAL, HPMC, mesocarpo de babaçu e estearato de magnésio, os quais foram submetidos a análise físico-química, sendo aprovados conforme os critérios exigidos pela Farmacopeia Brasileira. O ensaio de dissolução *in vitro* mostrou que se trata de comprimidos de liberação imediata, uma vez que todo o conteúdo foi liberado em até 30 minutos nos dois meios de dissolução avaliados.
- VII. Além disso, foram obtidos comprimidos com a mesma composição do anterior, mas revestidos com o polímero Eudragit® S, que modulou a liberação do conteúdo, pois em pH 1,2 não houve liberação do composto, sendo totalmente liberado no meio de dissolução com pH 7,4.
- VIII. Os comprimidos com revestimento apresentam uma liberação modificada, podendo ser utilizados por pacientes com DII.

## **PERSPECTIVAS**

- Vinculação a um programa de doutorado para continuidade do estudo
- Realizar os estudos pré-clínicos em modelos animais de DII
- Realizar os estudos de estabilidade de curto prazo e de longo prazo das formulações desenvolvidas
- Desenvolver artigos científicos e depositar pedido de patente do produto desenvolvido

# REFERÊNCIAS

---

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** 2010, 23(4):629-643.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo. **Quim. Nova** 2006, 29 (1):113-123.

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet** 2007, 369: 1627-40.

BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. **Gen. Pharmac.** 1997, 29(3):315-331.

BREITHAUPT-GROGLER, K.; NIEBCH, G.; SCHNEIDER, E.; ERB, K.; HERMANN, R.; BLUME, H. H.; SCHUG, B. S.; BELZ, G. G. Dose-proportionality of oral thioctic acid – coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 1999, 8(1):57-65.

COLLETTI, T. IBD—recognition, diagnosis, and therapeutics. **JAAPA.** 2004; 7:16–24.

CREMER, D. R.; RABELER, R.; ROBERTS, A.; LYNCH, B. Safety evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006, 46:29-41.

EL-GOWELLI, H. M.; SAAD, E. I.; ABDEL-GALIL, A. A.; IBRAHIM, E. R. Co-administration of  $\alpha$ -lipoic acid and cyclosporine aggravates colon ulceration of acetic acid-induced ulcerative colitis via facilitation of NO/COX-2/miR-210 cascade. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 2015.

FIOCCHI, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **Gastroenterology** 1998, 115:182-205.

GHEZZI, P.; FLORIDI, L.; BORASCHI, D.; CUADRADO, A.; MANDA, G.; LEVIC, S.; D'ACQUISTO, F.; HAMILTON, A.; ATHERSUCH, T. T.; SELLEY, L. Oxidative stress and inflammation induced by environmental and psychological stressors: a biomarker perspective. **Antioxidants & Redox Signaling** 2018, 28 (9).

GORACA, A.; HUK-KOLEGA, H.; PIECHOTA, A.; KLENIEWSKA, P.; CIEJKA, E.; SKIBSKA, B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. **Pharmacological Reports.** 2011, 63, 849-858.

HANAUER, S. B. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. **Inflamm Bowel Dis** 2006, 12: S3-S9.

HENDRICKSON, B.A.; GOKHALE, R.; CHO, J.H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clin Microbiol Rev.** 2002; 15:79–94.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature** 2011, 474:307-317.

LOFTUS, E. V. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. **Gastroenterology** 2004, 126: 1504-1517.

MOURA, F. A.; ANDRADE, K. Q.; SANTOS, J. C. F.; GOULART, M. O. F. Lipoic acid: Its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015, 15, 458-483.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M. F.; SGHERRI, C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. **Plant Physiol. Biochem** 2002, 40:463-470.

NGUYEN, G.C.; TORRES, E.A.; REGUEIRO, M. et al. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. **Am J Gastroenterol** 2006, 101: 1012–23.

ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; AYGUN, H.; HALICI, M.; ATALAY, F.; CAKIR, A.; CADIRCI, E.; BAYIR, Y.; SULEYMAN, H.  $\alpha$ -lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carragenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. **British Journal of Nutrition** 2011, 105 31-43.

REZAIIE, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? **Dig Dis Sci** 2007, 52:2015-2021.

SATSANGI, J.; MORECROFT, J.; SHAN, N. B. et al. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2003, 17: 3-18.

SCHENK, M.; BOUCHON, A.; BIRRER, S. et al. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. **J Immunol**. 2005, 174:517–524

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature** 2007, 448:427-434.

ZIEGLER, D.; HANEFELD, M.; RUHNAU, K. J.; MEISSNER, H. P.; LOBISCH, M.; SCHUTTE, K.; GRIES, F. A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN study). **Diabetologia** 1995, 38:1425-1433.

ZIEGLER, D.; HANEFELD, M.; RUHNAU, K. J.; HASCHE, H.; LOBISCH, M.; SCHUTTE, K.; KERUM, G.; MALESSA, R. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7 month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III study). ALADIN III Study Group. Alpha-lipoic acid in Diabetic Neuropathy. **Diabetes Care** 1999, 22:1296-1301.

ZHU, H.; LI, R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Experimental Biology and Medicine** 2012, 237:474-480.