

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
FARMACOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS AUTO-ORGANIZADAS DE
QUITOSANA**

Sandra Elisa Haas

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
FARMACOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS AUTO-ORGANIZADAS DE
QUITOSANA**

Tese apresentada por **Sandra Elisa Haas** para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr^a. Teresa Dalla Costa

Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Sílvia Staniçuaski Guterres

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado /Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 04/05/2012 e pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. François Germain Noël
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Nádia Maria Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Haas, Sandra Elisa
Desenvolvimento, caracterização físico-química e
avaliação farmacocinética de nanopartículas auto-
organizadas de quitosana / Sandra Elisa Haas. --
2012.
170 f.

Orientadora: Teresa Dalla Costa.
Coorientadora: Silvia Staniçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2012.

1. Nanovesículas. 2. Clozapina. 3. Ácido
Valpróico. 4. Quitosana. 5. Farmacocinética. I. Dalla
Costa, Teresa, orient. II. Guterres, Silvia
Staniçuaski, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) e Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento do CNPq/MCTI.

Dedico este trabalho ao Giulio, pelo
amor, compreensão e apoio em todos os
instantes

AGRADECIMENTOS

À Profa. Teresa, minha orientadora, agradeço pelo exemplo profissional e de liderança, pelas exigências, pelas oportunidades concedidas, pela paciência. Muito Obrigada!

A Profa. Silvia, obrigada por oportunizar os meus primeiros passos na iniciação científica, pela co-orientação e pelas importantes contribuições no decorrer desse trabalho.

A Cristiane de Andrade agradeço pelo apoio, pela amizade e pelo auxílio na parte prática deste trabalho. O desenvolvimento do mesmo só foi possível devido ao teu comprometimento, determinação, capacidade e responsabilidade. Não poderia ter tido uma companhia melhor para me auxiliar nesta etapa!

Agradeço aos amigos PKs pela companhia, pelas risadas, pelos cafezinhos de todas as horas. Em especial a presença nos momentos pré e pós as viagens, que foram particularmente difíceis. Aos amigos do Cristiane de Andrade, Maiara Pigatto, Bruna Torres, Francine Azeredo, Pedro Sansone, Fernanda Galves, Ticiane Bessegato, João Victor, Felipe Hurtado, Liberato Brum Junior, Flávia Uchoa, Estevam Zimmermann e Ana Xavier desejo muito sucesso! Em especial, agradeço as minhas “socorristas” de todas as horas Maiara, Francine, Bruna e Cris.

A todos os amigos do Laboratório 405, mas em especial a Kelly Condotta, Karina Paese, Ana Luiza Maurer da Silva, Evelise Assumpção, Tatiele Kaetzer, Aline Ourique, Mariana Bianchini, Noé Fonseca, Karine Conradini obrigada pela cordialidade e pelas ajudas no Master/Zeta e Homegeneizador.

Ao Fabiano Barreto e colegas do LANAGRO/MAPA, obrigada pela possibilidade de utilização do CL/EM/EM.

Agradeço a profa. Bibiana pelo incentivo no início da vida PK e por ter despertado em mim o interesse pela pós-graduação. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos seqüestros, pela companhia para um cafezinho e pelos conselhos dados.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação que contribuíram para a minha formação como farmacêutica e pós-graduada.

Aos amigos da UNIPAMPA, em especial a Letícia Colomé e ao Rodrigo Freddo pelo auxílio nos meus momentos de ausência junto às disciplinas e aos meus alunos de pesquisa e extensão.

A minha família, pelo incentivo e confiança constante.

Ao Giulio, pelo respeito e apoio nesta fase da minha vida. Obrigada pela compreensão diante de tantos momentos de ausência, seja pelo trabalho no laboratório em dias ou noites, aos finais ou durante a semana, seja pelas viagens. As tuas palavras sempre foram uma luz, uma alegria nos dias que pareciam não ter mais fim! Agradeço também pelo auxílio com ferramentas de informática, leituras e correções dos trabalhos. Muito obrigada por tudo!

Enfim a todas as pessoas que me ajudaram de forma direta ou indireta, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

Objetivos: Sistemas nanoparticulados são úteis para modular a farmacocinética de substâncias. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento de um sistema nanovesicular (NV) inovador auto-organizado de quitosana e lecitina, contendo miristato de isopropila (IPM) como núcleo oleoso capaz de alterar a farmacocinética da clozapina (CZP) e do ácido valpróico (VPA). **Métodos:** NV foram preparadas através da mistura, utilizando Ultraturrax, de uma solução etanólica contendo Lipoid S45[®] e IPM em uma solução aquosa de quitosana. As concentrações de quitosana (4 ou 8 mg/ml), IPM (10 e 20 mg/mL), Lipoid S45[®] (4 e 8 mg/ml) foram otimizadas através de um fatorial 2³ que avaliou o diâmetro, potencial zeta, pH, viscosidade e análises de retroespalhamento de luz (BS) como respostas. Às nanovesículas do sistema otimizado pela análise fatorial foi incluído a CZP. A caracterização físico-química dessa formulação (NV-CZP) foi conduzida avaliando-se os mesmos parâmetros citados acima. A farmacocinética dessa formulação foi avaliada em ratos Wistar pela via i.v (5 mg/kg, CZP livre) e oral (10 mg/kg, CZP livre e NV-CZP). Para a quantificação da CZP nas amostras de plasma obtidas em tempos pré-determinados após administração das formulações um método analítico por CL-EM/EM foi desenvolvido e validado. O VPA também foi encapsulado nessas nanovesículas, nesse caso em substituição ao IPM, formando NV-VPA que foram caracterizadas físico-quimicamente. Os perfis cinéticos dessa formulação foram avaliados para os seguintes grupos de animais: VPA, ratos anestesiados (G1, 4 mg/kg) e não-anestesiados (G2, 4 mg/kg), VPA-NV (G3, 2 mg/kg), oral 4 mg/kg VPA (G4) e VPA-NV (G5), além da administração intra-traqueal (i.t.) de 4 mg/kg (VPA, G6 e VPA-NV, G7). Avaliação não-compartimental e compartimental dos perfis individuais de concentração plasmática da CZP e VPA foi realizada utilizando Excel[®] 2003 e Scientist[®] 2.0, respectivamente. **Resultados:** Os diâmetros das partículas no planejamento fatorial variaram de 0.348 a 1.5 µm. O diâmetro foi dependente da proporção de quitosana, IPM e lecitina utilizados nas formulações. O potencial zeta positivo (+41.3 a +50 mV) foi influenciado principalmente pela concentração de quitosana. O pH de todas as formulações foi ácido. Os valores de viscosidade sofreram influência das concentrações de quitosana e IPM. A formulação otimizada

(quitosana 4 mg/mL; IPM 10 mg/mL e Lipoid S45[®] 8 mg/mL) foi escolhida para encapsular a CZP. As nanovesículas de CZP (CZP-NV 1 mg/mL) e NV brancas apresentaram, respectivamente, tamanhos médios de 181 ± 3 nm e 470 ± 2 nm, pH ácido, potencial zeta positivo, índice de polidispersão abaixo de 0.3 e doseamento da CZP próximo a 100%. Após a encapsulação da CZP em NV, a biodisponibilidade oral foi 24%, duas vezes superior a biodisponibilidade da CZP livre (9%). Aumento na meia-vida foi observado para a CZP-NV (4.32 ± 1.33 h) em relação à CZP livre (2.28 ± 0.69 h), devido a uma diminuição da depuração plasmática. No estudo com VPA, o tamanho médio, potencial zeta e pH para VPA-NV (5 mg/mL) e NV brancas foram 333 ± 1.5 nm e 131 ± 1 nm; 25.6 ± 0.8 mV e $+13.4 \pm 1.7$ mV; 2.69 ± 0.02 e 2.71 ± 0.08 , respectivamente. Os perfis plasmáticos dos grupos G1, G2, G3 declinaram de forma bi-exponencial. A depuração plasmática e o volume de distribuição no *steady-state* do G5 diminuíram significativamente e na mesma proporção em relação ao G4. A meia-vida não se alterou para o G4 e G5. O pico de concentração plasmática (C_{max}) foi significativamente maior para G7 do que para G6 e o tempo para alcançar o pico (t_{max}) foi menor para o G6. A depuração plasmática e o volume de distribuição no *steady-state* do G7 diminuíram significativamente e na mesma proporção em relação ao grupo G6, não implicando em alteração na meia-vida do fármaco. **Conclusões:** Neste trabalho, um novo nanossistema vesicular foi desenvolvido e biologicamente avaliado. As nanovesículas mostraram-se úteis para melhorar os parâmetros farmacocinéticos do VPA e da CZP, principalmente a biodisponibilidade oral, sendo promissoras para diferentes aplicações biológicas e tecnológicas.

Palavras-chaves: nanovesículas auto-organizadas, clozapina, ácido valpróico, núcleo oleoso, avaliação farmacocinética

ABSTRACT

Development, physico-chemical characterization and pharmacokinetic evaluation of self-assembly chitosan nanoparticules

Objectives: Nanoparticles (NP) are useful to modulate the pharmacokinetics (PK) of drugs. The aim of this study was to develop innovative self-assembly nanovesicles (NV) constituted of chitosan and lecithin with isopropyl myristate (IPM) as oil core, able to modify the PK plasma profile of clozapine (CZP) and valproic acid (VPA).

Methods: The NV were obtained by injecting 4 mL of an ethanolic phase containing Lipoid S45[®] and IPM into 46 ml of a chitosan aqueous solution followed by Ultraturrax homogenization. The concentrations of chitosan (4 and 8 mg/mL), IPM (10 e 20 mg/mL) and Lipoid S45[®] (4 and 8 mg/mL) were optimized using a 2³ factorial design. The responses evaluated were particle size, zeta potential, pH, viscosity and backscattering (BS) analysis. The optimized formulation (F₂) was chosen to encapsulate CZP. The PK in rats was evaluated after i.v. (5 mg/kg, free CZP) and oral (10 mg/kg, free and NV-CZP) administration. A LC-MS/MS method was developed and validated for CZP quantification in rat plasma. VPA was also incorporated into the NV in this case replacing IPM by the drug. The NV-VPA physico-chemical characterization and plasma PK was evaluated. The groups for PK investigation were: VPA unconscious rat (G1, 4 mg/kg) and conscious rat (G2, 4 mg/kg), VPA-NV (G3, 2 mg/kg), oral 4 mg/kg dosing of VPA (G4) and VPA-NV (G5) and intratracheal (i.t.) 4 mg/kg VPA (G6) and VPA-NV (G7) administration. Non-compartmental and compartmental analyses were performed using Excel[®] 2003 and Scientist[®] 2.0, respectively.

Results: The particle size ranged 0.348 to 1.5 μm . This response was dependent on the proportion of chitosan, IPM, and Lipoid S45[®] used. The analysis of laser diffractometry showed only one particle size population for all formulations, mainly below 1 μm . The zeta potential was strongly positive (+41.3 to +50 mV) and it was influenced by chitosan, mainly. The formulations pH was acid. The viscosity was dependent on chitosan and IPM concentration. The F₂ (chitosan 4 mg/mL; IPM 10 mg/mL and Lipoid S45[®] 8 mg/mL) was chosen to incorporate CZP. The CZP-NV (1 mg/mL) and blank-NV (unloaded) presented mean particle sizes of 181 ± 3 nm and 470 ± 2 nm, respectively, acid pH, positive zeta potentials, PDI below 0.3 and drug content close to 100%. CZP oral bioavailability after encapsulation into NV was 24%, twice the oral value observed for CZP in solution (9%). An increase in

half-life was observed for CZP-NV (4.32 ± 1.33 h) in relation to free CZP (2.28 ± 0.68 h), due to the decrease in total clearance ($\alpha = 0.05$). In the study with VPA, the mean diameter, zeta potential and pH of VPA-NV (5 mg/mL) and blank-NV were 333 ± 1.5 nm and 131 ± 1 nm; 25.6 ± 0.8 mV and $+13.4 \pm 1.7$ mV; 2.69 ± 0.02 and 2.71 ± 0.08 , respectively. The plasma profiles of G1, G2, and G3 declined in a bi-exponential fashion. G5 total clearance and volume of distribution at steady state were significantly decreased in relation to G4 ($\alpha = 0.05$) and the half-life was not altered. The peak plasma concentration (C_{max}) was significantly higher in the G7 group than G6, and the peak time (t_{max}) took place earlier after administration of G6. G7 clearance and volume of distribution at steady state were both significantly decreased in the same proportion in relation to G6 ($\alpha = 0.05$), not altering the half-life. **Conclusions:** In this work a new nanovesicular system was developed and biologically evaluated. The system showed to be useful to improve VPA and CZP pharmacokinetics. The nanovesicles have potential for application for different biological and technological uses.

Key-words: Oil core self-organized chitosan nanovesicles, clozapine, valproic acid, and pharmacokinetic evaluation

LISTA DE ABREVIATURAS

$AUC_{0-\infty}$ = area under the curve

BS = backscattering profiles

CL_{tot} = total plasma clearance

C_{max} = peak plasma concentration

CYP = citocrome P450

CZP = clozapine

CZP-NV = clozapine-loaded nanovesicles

F_{abs} = bioavailability

G1 = unconscious rat group, VPA 4 mg/kg, intravenous route

G2 = conscious rat group, VPA 4 mg/kg, intravenous route

G3 = conscious rat group, VPA 2 mg/kg, intravenous route

G4 = conscious rat group, VPA 4 mg/kg, oral route

G5 = conscious rat group, VPA 4 mg/kg, oral route

G6 = unconscious rat group, VPA 4 mg/kg, intratracheal route

G7 = unconscious rat group, VPA 4 mg/kg, intratracheal route

IPM = isopropyl myristate

IS = internal standard

K_e = elimination rate constant

MRT = mean residence time

NV = nanovesicles

NV-VPA = valproic acid-loaded nanovesicles

$T_{1/2}$ = half-life

TEM = transmission electron microscopy

t_{max} = time do reach peak plasma concentration

$V_{d_{ss}}$ = volume of distribution at steady state

VPA = valproic acid

X_1 = chitosan

X_2 = isopropyl myristate

X_3 = Lipoid S45[®]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivos gerais	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1	Quitosana e Nanotecnologia	11
3.2	Modulação da farmacocinética por sistemas contendo quitosana	13
3.3	Modulação da farmacocinética por Fosfolipídios	17
3.4	Clozapina	19
3.5	Ácido Valpróico	21
4	CAPÍTULO 1. Development of innovative oil- core self organized nanovesicles prepared with chitosan and lecithin using a 2 ³ full-factorial design.....	25
5	CAPÍTULO 2. Oil core self-organized nanoparticles: a new system to improve the bioavailability of drugs with high first pass metabolism using clozapine as a model .	57
6	CAPÍTULO 3. A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of clozapine in rat plasma: application to a pre-clinical pharmacokinetic study	79
7	CAPITULO 4. Pharmacokinetic evaluation of valproic acid chitosan-lecithin nanovesicles for pulmonary and oral delivery.....	99
8	DISCUSSÃO GERAL.....	133
9	CONCLUSÕES.....	141
10	REFERÊNCIAS	145

1 INTRODUÇÃO

O advento da nanotecnologia tem tornado possível melhorar a terapia de inúmeras doenças, em muitos casos, pela alteração no perfil farmacocinético. Características dos sistemas como composição, tamanho, núcleo oleoso, carga e modificações na superfície, são capazes de alterar a absorção, biodistribuição e clearance de fármacos veiculados em sistemas nanoparticulados (ALEXIS *et al.*, 2008).

A quitosana é um polímero catiônico natural, biocompatível e biodegradável, características essas atraentes para a sua utilização em sistemas de vetorização de fármacos. Associado a sistemas nanoparticulados, a quitosana tem se mostrado adequada para controlar a liberação de fármacos, produzir sistemas muco/bioadesivos, melhorar a absorção e alterar as características de biodistribuição de fármacos veiculados nesses sistemas (SARMENTO *et al.*, 2007; KADIYALAA *et al.*, 2010).

Dentre os métodos utilizados para a preparação de nanopartículas de quitosana, destaca-se o método de auto-organização, o qual gera nanopartículas a partir da interação eletrostática entre a quitosana (carga positiva) e outra substância com carga negativa (SONVICO *et al.*, 2006; HAFNER *et al.*, 2009). Nesse método, é possível preparar nanopartículas com alto teor de quitosana, de forma rápida e com possibilidade de escalonamento industrial. Entretanto, os sistemas descritos na literatura obtidos a partir deste método são matriciais, não agregando as vantagens de um sistema vesicular, como a melhor encapsulação de fármacos, o controle da liberação e a alteração da interação dos mesmos em meios biológicos (GUTERRES *et al.*, 1995; RAFFIN *et al.*, 2003; CRUZ *et al.*, 2006; CATTANI *et al.*, 2008; HAAS *et al.*, 2009; CATTANI *et al.*, 2010).

A clozapina é um antipsicótico atípico efetivo no tratamento da psicose em pacientes esquizofrênicos que não respondem aos neurolépticos convencionais, ou seja, em casos de esquizofrenia refratária. A sua limitação na prática clínica se deve a seus efeitos adversos, especialmente a agranulocitose, possivelmente causada por metabólitos reativos que atacam células da medula óssea (LIU & UTRECHT, 1995; GASZNER *et al.*, 2002). Além disso, o elevado metabolismo de primeira passagem é a causa da baixa biodisponibilidade do fármaco (abaixo de 50%) e da alta variabilidade interindividual (cerca de 130%) (MASELIS *et al.*, 2000; MAURI *et*

al., 2007; CORRELL, 2010). Nesse sentido, a literatura relata a preparação de sistemas lipídicos com o intuito de elevar a biodisponibilidade e contornar as limitações clínicas desse fármaco (VENKATESWARLU & MANJUNATH, 2004; MANJUNATH & VENKATESWARLU, 2005), mas sistemas contendo quitosana não foram descritos na literatura até o momento.

O ácido valpróico apresenta amplo espectro de ação no tratamento de epilepsia, sendo efetivo contra muitos tipos de crises epiléticas, como crises generalizadas, parciais e de ausência (OWENS & NEMEROFF, 2003; ABEND & DLUGOS, 2008). O seu mecanismo de ação se deve a interferência na neurotransmissão GABAérgica. Além disso, estudos recentes apontam o ácido valpróico como uma nova alternativa no tratamento de tumores sólidos, assim como leucemia mielóide, uma vez que o fármaco é um inibidor de histonas deacetilases, interferindo no mecanismo de transcrição gênica das células tumorais (PEREZ-PLASENCIA & DUENAS-GONZALES, 2006; BATTY, 2009; BLABETA *et al.*, 2009). Limitações na sua utilização devem-se especialmente a sua hepatotoxicidade, que pode ser fatal (NEUMAN *et al.*, 2001; ABEND & DLUGOS, 2008). Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a penetração cerebral de nanocápsulas poliméricas de poli (ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana, através da técnica de microdiálise, e observou concentrações de ácido valpróico significativamente superiores para a formulação contendo o polímero catiônico em relação ao fármaco livre (FREDDO, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho visa o desenvolvimento e caracterização de nanovesículas auto-organizadas de quitosana e lecitina, como veículos para a modulação de características farmacocinéticas de fármacos, sendo escolhidos a clozapina e o ácido valpróico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver formulação nanoparticulada inovadora a base de quitosana, capaz de alterar os parâmetros farmacocinéticos da clozapina e do ácido valpróico.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar, através de um delineamento fatorial, um sistema nanoparticulado com núcleo oleoso inovador, a partir da interação de quitosana e lecitina;
- Incorporar clozapina à formulação otimizada e proceder a caracterização físico-química (distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, retroespalhamento de luz, microscopia eletrônica de transmissão e doseamento);
- Desenvolver e validar um método para quantificação da clozapina em plasma de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (CLAE-EM/EM);
- Avaliar comparativamente a farmacocinética da clozapina livre, administrada pelas vias i.v. (5 mg/kg) e oral (10 mg/kg), com a clozapina nanoencapsulada, administrada pela via oral (10 mg/kg), a ratos Wistar;
- Otimizar uma formulação auto-organizada com ácido valpróico e proceder a caracterização físico-química (distribuição de tamanhos de partícula, SPAM, potencial zeta, pH, retroespalhamento de luz, microscopia eletrônica de transmissão e doseamento);
- Avaliar a farmacocinética plasmática do ácido valpróico após a administração do fármaco livre ou nanoencapsulado por via oral e pulmonar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Quitosana e Nanotecnologia

A quitosana é um polímero catiônico, especificamente um polissacarídeo formado por unidades N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (Figura 1), obtido a partir da desacetilação da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos (ROWE *et al.*, 2000). A quitosana tem despertado a atenção de pesquisadores em função de suas características físico-químicas, biológicas e toxicológicas (NAGPAL *et al.*, 2011; HEJAZI & AMIJI, 2003; KOJIMA *et al.*, 2004).

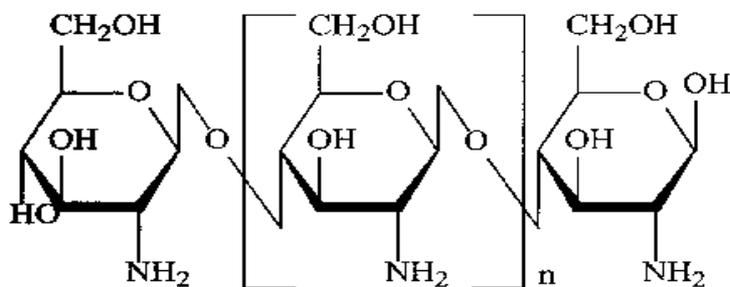


Figura 1. Estrutura da Quitosana

A quitosana tem característica policatiônica em virtude da presença de numerosos grupamentos amino (Figura 1), conferindo um $pK_a = 6,5$ ao polímero. Os grupamentos amino tornam-se positivamente carregados em pH ácido, possibilitando a solubilização do polímero em soluções contendo ácidos fracos (HEJAZI & AMIJI, 2003), mas insolubilidade em solventes orgânicos.

O grau de desacetilação refere-se ao conteúdo de grupamentos amina livres e afeta a solubilidade, hidrofiliidade e as características de atração eletrostática com poliânions (HEJAZI & AMIJI, 2003), assim influenciando nos métodos de preparação de micro e nanopartículas com quitosana. Polímeros com baixo grau de desacetilação estão relacionados à maior toxicidade, enquanto que altos valores de desacetilação (em torno de 85%) conferem menor toxicidade. Em ambas as situações, a quitosana atua como um promotor de permeação. Outra característica importante da quitosana é o peso molecular, o qual influencia diretamente na viscosidade da solução aquosa formada (NAGPAL *et al.*, 2011).

A quitosana é um biopolímero de baixo custo e baixa toxicidade. Em ratos, a DL₅₀ foi superior a 1500 mg/kg pela via oral e 3000 mg/kg após a administração da mesma pela via intraperitoneal. Entretanto, seu uso é restrito a vias não-parenterais (BALDRICK, 2009). Apesar da procedência da quitosana, a partir da fibra de crustáceo, a relação com alergias atribuídas a sua origem não está clara. MUZZARELLI (2010) ressalta que, uma vez que a quitosana passa por um processo de purificação, ela não é mais considerada como um derivado do camarão, pois os procedimentos de obtenção retiram proteínas, lipídios e outros contaminantes da matéria bruta, reduzindo o seu potencial alergênico. Deste modo, o polímero purificado poderia ser classificado como um produto químico, independente de sua origem.

Uma das características que deve ser observada em relação à composição de novas formas farmacêuticas é a biodegradabilidade e biocompatibilidade dos constituintes. A quitosana é biodegradada pela lisozima gerando compostos aminados atóxicos, não-imunogênicos e não carcinogênicos, que são completamente eliminados pelo organismo (BALDRICK, 2009; KEAN & THANOU, 2010). É possível justificar a biocompatibilidade através das inúmeras aplicações da quitosana, tanto no ramo farmacêutico quanto médico, como por exemplo, na preparação de membranas artificiais, implantes ósseos, como curativos em feridas e em oftalmologia (WANG *et al.*, 2011).

Além da sua utilização como excipiente em formulações farmacêuticas, várias propriedades biológicas tem sido atribuídas à quitosana, aumentando o seu espectro de utilização em diferentes áreas do conhecimento. A quitosana tem se mostrado ativa contra diferentes bactérias, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia* (RABEA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2011). Em virtude da capacidade de formação de filmes, tem-se estudado a sua aplicação em curativos para queimaduras (KOJIMA *et al.*, 2004).

Na tecnologia farmacêutica, a quitosana vem sendo associada a sistemas nanoparticulados com os objetivos de controlar a liberação de fármacos, produzir sistemas muco/bioadesivos, melhorar a absorção de fármacos, como peptídeos e proteínas, e alterar as características de biodistribuição de fármacos veiculados

nesses sistemas (SARMENTO *et al.*, 2007; KADIYALAA *et al.*, 2010). As características apresentadas anteriormente tornam a quitosana um polímero interessante e versátil para a preparação de micro e nanopartículas.

Nanocápsulas são nanopartículas específicas, na forma de vesículas recobertas por um polímero, estabilizadas por tensoativos. Esses sistemas têm sido aplicados para a nanonoencapsulação de fármacos com diferentes propósitos, tais como: a proteção contra a inativação no estômago, a proteção da mucosa contra a toxicidade (GUTERRES *et al.*, 1995; RAFFIN *et al.*, 2003), a melhora no índice terapêutico de fármacos (RODRIGUES *et al.*, 1994; DURAND *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 2009), melhora do efeito farmacológico (SCHAFFAZICK *et al.*; 2008; BERNARDI *et al.*, 2009), o controle da liberação (CRUZ *et al.*, 2006) e a redução de efeitos adversos. Fármacos veiculados em sistemas nanoparticulados podem ter seu tempo de meia-vida alterado (LIM *et al.*, 2009), seu perfil de biodisponibilidade aumentado (SONAJE *et al.*, 2010), além de alterações no perfil de distribuição tecidual (HAAS *et al.*, 2009).

Desta forma, a preparação de nanopartículas de quitosana une as características de carga catiônica, de biodegradabilidade, de biocompatibilidade e de mucoadesividade da quitosana com a versatilidade da vetorização tecidual, do aumento da área superficial e do controle de tamanho, característico dos sistemas nanoparticulados, visando modular características físico-químicas dos mesmos que possam interferir nos processos de absorção e disposição de fármacos no organismo.

3.2 Modulação da farmacocinética por sistemas contendo quitosana

A nanotecnologia oferece vantagens em comparação com a administração do fármaco livre, como a melhora do perfil farmacocinético. A partir de diferentes matérias-primas e organização dos sistemas, torna-se possível controlar a absorção e a distribuição tecidual de fármacos deficientes nessas características, tendo como consequência a potencialização dos efeitos terapêuticos e a redução da toxicidade. Dentre as matérias-primas utilizadas com esses propósitos para a preparação de

sistemas nanoparticulados, cujas características que a tornam interessante estão destacadas acima, ressalta-se a quitosana.

FREDDO (2009) avaliou a penetração cerebral, através de microdiálise, de nanocápsulas de poli-(ϵ -caprolactona) revestidas com polietilenoglicol 6000 (NC-PEG) ou quitosana (NC-QTS) para carrear o ácido valpróico. Os sistemas foram preparados pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado e apresentaram diâmetros médios na faixa de 120 a 140 nm. Os perfis plasmáticos obtidos após a administração da dose de 15 mg/kg i.v. *bolus* a ratos revelaram um aumento do *clearance* para o fármaco carregado pela formulação NC-QTS ($0,284 \pm 0,156$ L/h/kg) em comparação com o ácido valpróico livre ($0,117 \pm 0,047$ L/h/kg) e em NC-PEG ($0,109 \pm 0,011$ L/h/kg). A avaliação da fração livre tecidual, entretanto, demonstrou um aumento do fator de penetração cerebral do fármaco para a formulação com maior *clearance* plasmático (fator de penetração cerebral de 0,102), enquanto que o fármaco livre e carregado em NC-PEG obtiveram fatores inferiores (0,019 e 0,033, respectivamente), demonstrando a capacidade do polímero catiônico em alterar a distribuição tecidual do fármaco nanoencapsulado.

Nanopartículas promissoras de quitosana contendo tacrina foram desenvolvidas para o tratamento de Alzheimer por WILSON e colaboradores (2010). Os autores utilizaram o método de emulsificação espontânea para a preparação desses sistemas, os quais foram revestidos ou não com polissorbato 80. O perfil de biodistribuição do fármaco livre e nanoencapsulado foi traçado após a administração da dose de 1 mg/kg i.v. do fármaco. Altas concentrações de tacrina foram obtidas nos tecidos altamente irrigados, como fígado, baço e pulmões após a administração das nanopartículas. O acúmulo do fármaco foi reduzido no fígado e no baço após a administração de nanopartículas revestidas com 1% de polissorbato 80, sustentando a hipótese de diminuição da opsonização após o revestimento, o que aumenta o tempo de residência do fármaco no organismo, e conseqüentemente, maiores concentrações cerebrais, uma vez que a tacrina apresenta boa permeabilidade através da barreira hemato-encefálica.

Nanopartículas de quitosana preparadas por reticulação com tripolifosfato foram desenvolvidas para a encapsulação de catequina e epigallocatequina,

substâncias com baixa absorção, entretanto, alta atividade cardio e neuroprotetora (DUBE *et al.*, 2010). A avaliação do transporte desses flavonóides pela membrana intestinal do jejuno de camundongos foi realizada com auxílio de Câmara de Ussig. A absorção de epigallocatequina foi aumentada após 2 horas de experimento, uma vez que a quantidade acumulada no compartimento receptor foi de $102,7 \pm 12,4$ e $57,9 \pm 7,9$ ng/cm² para o composto nanoencapsulado e livre, respectivamente. Segundo os autores, a justificativa para os resultados obtidos é o aumento do transporte paracelular e transcelular dos flavonóides propiciado pela quitosana, embora, experimentos realizados com manitol marcado com C¹⁴ não evidenciam aumento nesse transporte. Portanto, os resultados poderiam ser atribuídos à bioadesão causada pela quitosana e a estabilização das catequinas após a encapsulação. Para confirmação dessas hipóteses, estudos posteriores devem ser conduzidos.

A insulina é uma proteína com pobre solubilidade em água e fácil degradação no trato gastrointestinal, sendo útil como fármaco modelo para o desenvolvimento de novos sistemas visando um aumento da biodisponibilidade oral. MAKHLOF e colaboradores (2011) buscaram desenvolver nanopartículas de quitosana pH-sensível, característica essa atribuída pelo ftalato de hidroximetilcelulose incorporado na formulação, para a veiculação de insulina. Os sistemas foram desenvolvidos pelo método de complexação com polieletrólitos e apresentaram diâmetro médio de 255 nm e potencial zeta positivo. Após a marcação das partículas com uma substância fluorescente, as mesmas foram administradas a ratos visando avaliar a distribuição intestinal das mesmas. A fluorescência emitida indicou maior intensidade no íleo, comprovando a mucoadesividade da partícula de quitosana, uma vez que este é o segmento intestinal em que há maior espessura de camada de muco para adesão das nanopartículas. Além da adicional proteção em meio ácido proporcionada pelas partículas pH-sensível descritas nesse estudo, a sua administração oral a ratos diabéticos demonstrou uma diminuição persistente dos níveis de glicose em comparação com a administração da solução de insulina, corroborando os estudos de farmacocinética realizados em ratos.

O método de gelatinização ionotrópica foi escolhido por SONAJE e colaboradores (2010) para a encapsulação do complexo insulina-aspartato em

nanopartículas de quitosana e ácido poli(γ -ácido glutâmico). A utilização de cultura de células Caco-2 evidenciou a abertura transitória e reversível das *tight junctions* entre as células devido a presença da quitosana na formulação, o que permitiu o transporte de insulina-aspartato através da membrana. Nesse mesmo estudo, a marcação da quitosana com ^{99m}Tc e da insulina com ^{123}I permitiu visualizar, através de tomografia computadorizada com emissão de fótons, diferenças na distribuição, pois o fármaco foi efetivamente liberado na circulação, enquanto os carreadores permaneceram retidos no lúmen intestinal.

Nanopartículas de policianoacrilatos revestidas com quitosana tiolada, preparadas pelo método de polimerização radicalar, foram desenvolvidas como estratégia para melhorar a absorção oral de docetaxel, um quimioterápico (SAREMI *et al.*, 2011). A utilização de fluoresceína possibilitou a visualização das nanopartículas no interior de células de cultura do tipo Caco-2, 2 horas após a incubação. Utilizando o método de saco intestinal invertido, os autores observaram aumento do transporte do fármaco nanoencapsulado em comparação com o fármaco livre, 2 horas após o início do experimento. Com base nesses resultados, foi possível demonstrar que as nanopartículas de quitosana tiolada foram bioadesivas, proporcionando um aumento do transporte de docetaxel em relação ao fármaco livre, pelo aumento do transporte do fármaco em função da abertura das *tight junctions* e inibição da proteína de efluxo P-gP.

Nanoesferas de quitosana contendo o antineoplásico mitoxantrona foram desenvolvidas com o intuito de aumentar a captação do fármaco pelo sistema linfático. Essas nanopartículas, com diâmetro na ordem de 100 nm, foram quantificadas em diferentes tecidos de ratos após a administração subcutânea. Os resultados demonstraram que as nanoesferas atuam como um reservatório para o fármaco, garantindo a liberação sustentada do mesmo por até 120 horas após a administração de 5 mg/kg. As maiores quantidades de fármaco foram encontradas nos nódulos axilares, em detrimento ao coração, fígado, baço, pulmão e rins (LU *et al.*, 2006).

A mucoadesividade e o caráter poliacatiônico da quitosana permitem uma forte interação eletrostática com resíduos negativos das células, como mucinas e

ácido siálico, por exemplo, garantindo que sistemas nanoparticulados contendo quitosana funcionem como um reservatório, liberando o fármaco gradativamente através da membrana celular ou barreira biológica (NAGPAL *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011). Outro mecanismo responsável pelas alterações farmacocinéticas produzidas em sistemas que contem quitosana é a abertura das *tigh junctions* entre as células, aumentando a permeabilidade de fármacos polares como peptídeos e proteínas (DODANE *et al.*, 1999). No trato gastrintestinal, as nanopartículas são capturadas pelas placas de Peyer, que são agregados de tecido linfático. A captação dos sistemas nanométricos por este caminho exerce um papel importante no aumento da biodisponibilidade de diversos fármacos, especialmente aqueles que sofrem elevado metabolismo pré-sistêmico (BORGES *et al.*, 2006).

3.3 Modulação da farmacocinética por Fosfolipídios

Os fosfolipídios são moléculas anfífilas que tendem a se organizar em camadas quando em contato com a água. Esta propriedade confere a essas substâncias a possibilidade de aplicação em diferentes sistemas, como micelas, lipossomas, sistemas auto-emulsificantes (SEDDS), nanopartículas lipídicas sólidas, micro-nanoemulsão, suspensões e emulsões (FRICKER *et al.*, 2010). Em formulações farmacêuticas, os lipídios conferem algumas vantagens, tais como o aumento de biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis ou pouco permeáveis, proteção contra degradação de substâncias lábeis no TGI bem como mascaramento organoléptico (TREVASKIS *et al.*, 2008; FRICKER *et al.*, 2010). Os fosfolipídios mais utilizados em aplicações farmacêuticas são as lecitinas. As lecitinas são misturas complexas de fosfatídeos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, além de triglicerídeos, ácidos graxos, e carboidratos. A composição varia dependendo da fonte de lecitina (animal ou vegetal) e do grau de purificação (KIBBE, 2000).

A maioria dos fármacos administrados pela via oral chega à circulação sistêmica por absorção direta para o sangue portal. Fármacos pouco solúveis, pouco permeáveis e em especial com alto metabolismo pré-sistêmico tendem a apresentar

baixa biodisponibilidade (TREVASKIS *et al.*, 2008). As formulações baseadas em lipídios podem contornar essa limitação, pois possibilitam o aumento da biodisponibilidade pela via linfática através de três mecanismos. Os lipídios podem aumentar a solubilização do fármaco no ambiente intestinal, através da formação de vesículas, micelas ou micelas mistas. O segundo mecanismo é através de alteração na interação do fármaco com o enterócito, gerada pelos lipídios. O aumento do transporte linfático, em especial triglicerídeos de cadeia média, ocorre após a sua lipólise, cujos produtos são reesterificados dentro do enterócito e então formam o núcleo de quilomicrons, os quais facilmente acessam o sistema linfático pela lâmina própria intestinal. Por último, os lipídios podem alterar a via de absorção do fármaco através de uma diminuição da captação portal e aumento da captação do fármaco pela veia mesentérica (PORTER *et al.*, 2007)

Inúmeros artigos na literatura exploram a capacidade da lecitina em facilitar o transporte linfático. A título de ilustração, alguns serão citados a seguir. A absorção linfática da halofantrina, fármaco antimalárico, foi estudada por KARPF e colaboradores (2004). Nesse estudo, foram avaliadas a halofantrina associada uma solução triglicéridica, a uma emulsão o/a contendo 2% de lecitina (Lipoid S75®) ou ao Cremophor®, ambos tensoativos. A coleta da linfa foi realizada pela veia mesentérica abdominal. As concentrações portais de fármaco foram similares entre as três formulações. Diferenças foram observadas na dose acumulada após 30 h no sistema linfático, sendo superiores para os sistemas emulsionados (22.8 ± 2.8 e 20.2 ± 2.5 % para emulsão preparada com lecitina e Cremophor®, respectivamente) em relação à solução de halofantrina em óleo de soja ($7.9 \pm 1.1\%$). Segundo os autores, a presença de tensoativo acelera a lipólise intestinal, antecipando a absorção no fármaco no TGI.

Uma estratégia utilizada para aumentar a biodisponibilidade de fármacos é a conjugação do mesmo a fosfolipídios formando pró-fármacos lipídicos. O ácido valpróico foi conjugado a fosfatidilcolina formando um conjugado cuja absorção foi avaliada para o conjugado isolado e misturado a triglicerídeos de cadeia média (TCM) ou longa (TCL) (Dahan *et al.*, 2008). Observou-se maior área sob a curva plasmática e C_{max} para a mistura com TCL, resultando em uma $f_{(%)}$ de 8.8 e 2.6 para o conjugado em TCL e TCM, respectivamente. Esses resultados podem ser

atribuídos ao fato de que TCL, em vez de lipídios de cadeia curta, estimulam a rotatividade de lipídios no enterócito e também aumentam a síntese de quilomícrons assim aumentando a captação das moléculas pelo sistema linfático. Além disso, os resultados apresentados suportam a hipótese dos autores de que o conjugado fosfolipídico tem a via linfática como principal rota de absorção. Essa hipótese foi corroborada por pela avaliação das concentrações do fosfolipídio-AV na linfa de ratos que tiveram a veia mesentérica canulada, demonstrando que 60% da dose absorvida encontrou-se no sistema linfático após a utilização do conjugado associado à TCL.

PALIWAL e colaboradores (2009) desenvolveram uma “emulsoma”, uma formulação constituída por núcleo lipídico (Compritol ATO[®]) estabilizado por altas concentrações de lecitina de soja (5-10%), possuindo uma estrutura similar a quilomícrons, então permitindo a encapsulação tanto de fármacos lipo quanto hidrofílicos. Nesse estudo, o metotrexato, um antitumoral utilizado para o tratamento de tumores linfáticos, foi encapsulado e a sua farmacocinética foi avaliada. A formulação preparada com uma proporção molar de 1:1,5 (Compritol ATO[®]/Fosfatidilcolina de soja) gerou partículas com diâmetro de 452 nm e proporcionou maiores concentrações linfáticas do antitumoral e conseqüente biodisponibilidade ($ASC_{0-\infty}$: 7.67 vs 39.92 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ para metotrexato livre e na formulação desenvolvida, respectivamente).

3.4 Clozapina

A clozapina (Figura 2) é um derivado dibenzodiazepínico e seus efeitos terapêuticos são provavelmente mediados pela atividade dopaminérgica e serotoninérgica. O fármaco é considerado o protótipo dos antipsicóticos atípicos, sendo o primeiro a apresentar efeitos extrapiramidais insignificantes, bem como o agente mais efetivo no tratamento da psicose em pacientes esquizofrênicos que não respondem aos neurolépticos convencionais, ou seja, em casos de esquizofrenia refratária (KANE & CORRELL, 2010).

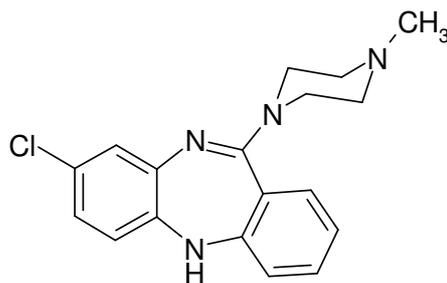


Figura 2: Estrutura química da clozapina.

A utilização clínica da clozapina é limitada pela gravidade dos seus efeitos adversos. A agranulocitose caracteriza-se pela redução acentuada do número de neutrófilos, tornando o paciente susceptível a infecções graves (GASZNER *et al.*, 2002). Os mecanismos do aparecimento da agranulocitose não foram elucidados até então, mas uma das hipóteses está relacionada a uma interação direta do fármaco com a medula óssea, ou ainda, a hipótese de que os metabólitos gerados pela biotransformação hepática da clozapina sejam tóxicos para a medula óssea (LIU & UTRECHT, 1995). A clozapina é metabolizada por oxidação no fígado, predominantemente, a dois metabólitos, a desmetilclozapina e a clozapina-N óxido, que apresentam atividade farmacológica muito inferior a da clozapina (BUUR-RASMUSSEN & BROSEN, 1999). Outro efeito adverso relacionado aos metabólicos da clozapina é hepatotoxicidade, em que cerca de 40 % dos pacientes tratados com o fármaco apresentam resultado alterado nas transaminases, quando estas são dosadas no soro (LU *et al.*, 2008). De fato, tanto a agranulocitose como hepatotoxicidade podem estar relacionadas ao acúmulo de metabólitos reativos de clozapina.

Segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutico, a clozapina é um fármaco de Classe II (baixa solubilidade, alta permeabilidade) (JAIN *et al.*, 2011). A sua biodisponibilidade é baixa, inferior a 50% (MASELIS *et al.*, 2000; MAURI *et al.*, 2007), justificada pelo extenso metabolismo de primeira passagem que o fármaco sofre. Aproximadamente 99% da dose administrada é metabolizada, sendo menos de 1% eliminado na sua forma inalterada pela urina. As principais enzimas metabolizadoras do fármaco são as isoformas do CYP450 hepáticas, como a CYP1A2 (30%), CYP2C19 (24%), CYP3A4 (22%), CYP2C9 (12%) e CYP2D6 (6%) (CORRELL, 2010). Além de colaborar para a baixa biodisponibilidade do fármaco, a

metabolização hepática é responsável pela alta variabilidade interindividual observada nas concentrações plasmáticas do fármaco, que podem ser na ordem de 130% (HIEMKE *et al.*, 2004; WENZIE *et al.*, 2009). Como consequência, a meia-vida do fármaco, em média 12 h, pode variar de 6 a 33 h (BUUR-RASMUSSEN & BROSEN, 1999).

A literatura apresentada dois artigos a respeito do desenvolvimento de sistemas nanométricos contendo clozapina. Esses estudos utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas visando à redução do efeito de primeira passagem da CZP e, conseqüentemente, aumentando sua biodisponibilidade quando por administração oral (VENKATESWARLU & MANJUNATH, 2004; MANJUNATH & VENKATESWARLU, 2005).

3.5 Ácido Valpróico

O ácido valpróico (ácido 2-propilpentanóico) (AV) (Figura 3) é um agente quimicamente relacionado com ácidos graxos e que apresenta amplo espectro de ação no tratamento de epilepsia, sendo efetivo contra muitos tipos de crises epiléticas, como crises generalizadas, parciais e de ausência (OWENS & NEMEROFF, 2003; ABEND & DLUGOS, 2008). O fármaco é efetivo em 78 a 100% dos casos de epilepsia refratária em crianças (ABEND & DLUGOS, 2008). Atualmente, é aprovado pelo FDA para a prevenção de enxaqueca e tratamento transtorno bipolar de humor (TRINKA, 2007; BAUER, 2008).

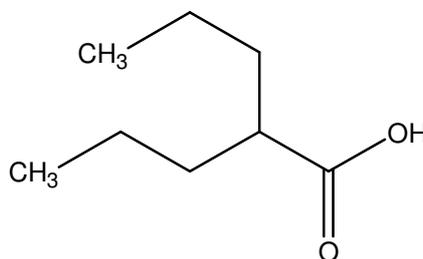


Figura 3. Estrutura química do ácido valpróico.

O ácido valpróico não apresenta seu mecanismo de ação totalmente elucidado (PERUCCA, 2002). Há evidências de que o AV aumenta a síntese e liberação de GABA, potencializando a transmissão gabaérgica em regiões específicas no cérebro. O ácido valpróico também pode estar relacionado com a diminuição dos níveis do ácido γ -hidroxibutírico, um aminoácido excitatório, atenuando a excitação neuronal mediada pela ativação dos receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Em adição a esses efeitos, o ácido valpróico exerce ações diretas na excitação das membranas, incluindo o bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (LOSCHER, 1999).

Além dos mecanismos descritos, os quais estão relacionados à sua ação antiepiléptica, o ácido valpróico atua como um inibidor de enzimas chamadas de histonas deacetilases, sendo a essa ação atribuído o potencial antineoplásico do fármaco (BATTY, 2009). Estudos clínicos utilizando o ácido valpróico como agente quimioterápico, em monoterapia ou como co-adjuvante, estão sendo realizados desde 1999 (BLABETA *et al.*, 2009). Leucemias mielóides agudas e outras doenças hematológicas vem sendo extensivamente estudadas, tendo em vista que podem ser originadas de falhas na transcrição gênica, onde estudos utilizando técnicas de biologia molecular demonstraram a presença de histonas fortemente acetiladas no núcleo do DNA. Tumores sólidos, como glioblastomas, melanomas, câncer de próstata, câncer de mama, e muitos outros, da mesma forma, estão sendo estudados (PEREZ-PLASENCIA & DUENAS-GONZALES, 2006).

Embora os efeitos adversos freqüentes sejam benignos, a ocorrência de efeitos menos comuns, pode restringir a utilização do ácido valpróico, como a hepatotoxicidade, as desordens de coagulação, a pancreatite e a teratogenicidade (NEUMAN *et al.*, 2001, OWENS & NEMEROFF, 2003; BAUER, 2008). A hepatotoxicidade é grave em crianças, podendo levar a morte. Estima-se que 1 a cada 500 crianças com menos de 2 anos sofra desse efeito adverso (ABEND & DLUGOS, 2008). A hepatotoxicidade geralmente situa-se entre dois extremos: de um lado, a elevação assintomática dos níveis séricos de enzimas hepáticas que ocorre em 15 a 30% dos pacientes nos meses iniciais de tratamento; do outro, a hepatite fulminante, rara e quase sempre fatal que ocorre por produção de um metabólito tóxico aberrante. A lesão hepática mostra alterações semelhantes à

síndrome de Reye e o exame patológico revela vários graus de esteatose micronodular. Excetuando-se as situações mais graves, a maioria dos casos é revertida com a suspensão do fármaco. O mecanismo pelo qual o ácido valpróico induz a hepatotoxicidade, que pode ser fatal, é frequentemente atribuído à produção de metabólitos reativos, como o 2-propil-4-ene valproato, e subsequente esteatose microvesicular, necrose hepatocelular juntamente com elevados níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (NEUMAN *et al.*, 2001).

O ácido valpróico é interessante sob o ponto de vista farmacocinético por várias razões. Há interações com inúmeros fármacos, como fenitoína, fenobarbital e carbamazepina. Em concentrações terapêuticas, pode haver saturação da ligação as proteínas plasmáticas, a qual é alta (90-95%). As concentrações terapêuticas situam-se na faixa de 50 a 100 mg/L e acima dessas concentrações reações de baixa gravidade como, náuseas, vômitos e diarreia podem acontecer, até casos mais graves como sedação, alopecia, trombocitopenia e hepatotoxicidade. Por essas razões, o tratamento clínico com ácido valpróico deve ser monitorado periodicamente, em relação às concentrações plasmáticas do fármaco bem como indicadores de toxicidade (WINTE, 1996). Em humanos, a biodisponibilidade do ácido é próxima a 100%, o volume de distribuição de 0,14 (0,1-0,5) L/kg, e o *clearance* e a meia-vida para adultos é de 8 mL/kg/h e 10-12 h, respectivamente.

A apresentação do ácido valpróico na forma de um óleo o torna interessante para a aplicação em sistemas nanoparticulados. Estudos de formulação para a o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AV foram descritos na literatura (VARSHOSAZ *et al.*, 2010) levaram a obtenção de um sistema otimizado contendo 400 mg de lipídio e 400 mg de ácido valpróico. Posteriormente a relação entre as concentrações plasmáticas e cerebrais foram avaliadas em ratos, após a administração nasal do fármaco nanoestruturado e livre (ESKANDARI *et al.*, 2011). Os estudos *in vivo* evidenciaram um aumento da relação concentração no cérebro/plasma para o fármaco nanoencapsulado ($8,40 \pm 0,32$) em relação ao fármaco livre ($6,77 \pm 0,73$).

DARIUS e colaboradores (2001) prepararam nanopartículas de ácido valpróico visando avaliar a penetração cerebral e a influência da nanoencapsulação

no metabolismo do fármaco. A partir dos resultados obtidos, os autores concluem que a nanoencapsulação previne o metabolismo oxidativo do fármaco, que leva a geração dos metabolitos tóxicos, diminuindo, portanto, a possibilidade de hepatotoxicidade.

Em estudo de nosso grupo de pesquisa, FREDDO (2009) desenvolveu diferentes sistemas nanoparticulados poliméricos a fim de avaliar a influência da nanoencapsulação do ácido valpróico na partição plasma/tecido cerebral do fármaco. Nesse estudo, foram desenvolvidas nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) revestidas com quitosana (NC-QTS) ou PEG 6000 (NC-PEG). A farmacocinética plasmática, avaliada em ratos após dose iv de 15 mg/kg, demonstrou uma maior velocidade de eliminação para o fármaco quando nanoencapsulado, entretanto, a avaliação da fração livre tecidual, demonstrou um aumento do fator de penetração cerebral do fármaco para a formulação com maior depuração plasmática (fator de penetração cerebral de 0,102), enquanto que o fármaco livre e carregado em NC-PEG obtiveram fatores inferiores (0,019 e 0,033, respectivamente), demonstrando a capacidade do polímero catiônico em alterar a distribuição tecidual do fármaco nanoencapsulado.

Diante do exposto, o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana com núcleo oleoso pode ser uma forma de alterar a disposição plasmática e tecidual de fármacos. Desse modo, este trabalho objetiva o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados com núcleo oleoso a base de quitosana e fosfolipídios que possam melhorar a biodisponibilidade e perfil plasmático de fármacos. Para demonstrar essas alterações, foram escolhidos fármacos com características farmacocinéticas e estados físicos diferentes. A clozapina apresenta-se na forma de um pó e com baixa biodisponibilidade em humanos, e o ácido valpróico, um líquido oleoso com amplo perfil de utilização terapêutica.

**4 CAPÍTULO 1. DEVELOPMENT OF INNOVATIVE OIL-CORE-SELF
ORGANIZED NANOVESICLES PREPARED WITH CHITOSAN AND
LECITHIN USING A 2³ FULL-FACTORIAL DESIGN**

Abstract

The aim of this study was to develop innovative nanosystems with isopropyl myristate as the oil core of self-assembly nanovesicles constituted of chitosan and lecithin using a 2^3 factorial design. The factors analyzed were chitosan (X_1 , levels 4 and 8 mg/ml), oil (X_2 , levels 10 and 20 mg/ml) and lecithin (X_3 , levels 4 and 8 mg/ml). The responses evaluated were the particle size, zeta potential, pH, viscosity, and physical stability evaluated by means of backscattering (BS) analysis. The particle size ranged from 0.348 to 1.5 μm for $F_2(X_1, 4; X_2, 10; X_3, 8 \text{ mg/ml})$ and $F_7(X_1, 8; X_2, 20; X_3, 4 \text{ mg/ml})$, respectively. Laser diffractometry analysis revealed only one particle size population for all formulations, predominantly below 1 μm . The zeta potential was strongly positive (from +41.3 to +50 mV), being influenced by the X_1 concentration and the association X_2/X_3 . The pH was acid presenting values between 3.5 and 3.97. The viscosity values were dependent on the X_1 and X_2 concentrations used. According to the BS analysis, $F_2(X_1, 4; X_2, 10; X_3, 8 \text{ mg/ml})$ appears to be the most stable nanosuspension, and no alterations in the middle of the BS profiles were observed, indicating an absence of flocculation or coalescence. A structure proposed for the nanosystem consists of chitosan forming the hydrophilic shell layer that protects the core comprised of lecithin and the hydrophobic groups of isopropyl myristate. Thus, in this study a new nanosystem was developed which could potentially be used for different biological and technological applications.

Keywords: Nanovesicles, chitosan, lecithin, isopropyl myristate, factorial design

**5 CAPÍTULO 2. OIL CORE SELF-ORGANIZED NANOPARTICLES: A NEW
SYSTEM TO IMPROVE THE AVAILABILITY OF DRUGS WITH HIGH
FIRST PASS METABOLISM USING CLOZAPINE AS A MODEL**

Abstract

We propose the development of innovative oily core self-organized nanovesicles (NV) prepared by the interaction between chitosan and lecithin, to allow the encapsulation of different drugs. To develop this innovative systems, clozapine (CZP), an antipsychotic agent that presents low bioavailability due to its high pre-systemic metabolism, was used as a drug model. Nanovesicles suspensions were obtained by injecting 4 mL of an ethanolic phase containing 8 mg/mL of Lipoid S45[®] in ethanol, 10 mg/mL of isopropyl myristate solution and CZP (1 mg/mL) into 46 ml of a chitosan aqueous solution (4 mg/mL), followed by mechanically stirring through ultraturrax. The particle size, PDI and zeta potential were determined by Malvern Zetasizer[®]. Nanovesicles drug content was determined by LC-MS/MS. Stability evaluation was performed using optical analyzer Turbiscan[®] Lab. Transmission electron microscopy (TEM) was performed after the fixation of nanosuspensions with uranyl acetate. Pharmacokinetic studies were conducted in Wistar rats after intravenous (5 mg/kg) and oral (10 mg/kg) dosing of CZP free or nanoencapsulated (CZP-NV) (n= 6/group). The CZP-NV and blank nanovesicles (unloaded-NV) presented mean sizes of 181 ± 3 nm and 470 ± 2 nm, respectively, acid pH values (between 3.67–4.75), positive zeta potentials (between +41 and +50 mV) as well as PDI below 0.3 and drug content close to 100%. The TEM microphotographs revealed nanometric spherical (unloaded-NV) and oval (CZP-NV) nanovesicles. After CZP encapsulation into NV, the drug bioavailability increased 2.6 times (24%) in comparison with the bioavailability of free CZP oral dosing (9%). A significant increase in the absorption rate constant was also observed after the nanoencapsulation (from 0.94 ± 0.53 h⁻¹ to 6.7 ± 0.94 h⁻¹). An increase in the $t_{1/2}$ was observed to CZP-NV (4.02 ± 0.71 h) in relation to free CZP (2.28 ± 0.69 h) due to the decrease in the CL_{tot} (3.72 ± 0.59 and 5.81 ± 1.75 L/h/kg to CZP-NV and free CZP, respectively) and increase in the $V_{d_{ss}}$ (21.61 ± 3.58 and 10.7 ± 6.5 L/kg to CZP-NV and free CZP, respectively). The results demonstrated the applicability of this new self-organized nanovesiculated system, prepared with chitosan and lecithin, to improve the oral bioavailability of drugs which undergo high first-pass effect and also prolong their half-life in the body.

Key-words: Oil core self-organized chitosan nanovesicles, clozapine, and oral bioavailability.

**6 CAPÍTULO 3. A HIGHLY SENSITIVE LC-MS/MS METHOD FOR THE
DETERMINATION OF CLOZAPINE IN RAT PLASMA: APPLICATION TO
A PRE-CLINICAL PHARMACOKINETIC STUDY,**

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2012, DOI

10.1080/10826076.2011.639118

Abstract

A highly sensitive, rapid assay method has been developed and validated for the quantification of clozapine in rat plasma using LC-MS/MS. The extraction process involved plasma protein precipitation with acetonitrile and elution with a mobile phase constituted by acetonitrile and acidic water (80/20), at 0.8 mL/min flow rate (split 1:3). Chromatographic separation was performed by C18 Symmetry column (4.6 x 75 mm, 3.5 μ m). The lower limit of quantification was 1 ng/mL and the linearity was observed between 1-1000 ng/mL with a determination coefficient >0.9810. The intra and inter-day precisions were less or equal to 8.38 and 4.36%, respectively. The method showed sensitivity, linearity, precision, accuracy and specific necessary to quantification of plasma clozapine in pre-clinical pharmacokinetics studies.

Keywords: clozapine; LC-MS/MS; rat plasma; pharmacokinetics

**7 CAPITULO 4. PHARMACOKINETIC EVALUATION OF VALPROIC ACID
CHITOSAN-LECITHIN NANOVESICLES FOR PULMONARY AND ORAL
DELIVERY**

ABSTRACT

Aim: The aim of this work was to development of nanovesicles (NV) of chitosan and phospholipids with valproic acid (VPA) as the oil core to modify the plasma pharmacokinetic of VPA, aiming a new formulation for oral and pulmonary delivery.

Methods: VPA-NV suspensions were obtained by injecting 4 ml of lecithin (8 mg/ml Lipoid S45[®]) and VPA (5 mg/ml) in ethanol solution through a funnel into 46 ml of a chitosan aqueous solution (4 mg/ml) mechanically stirred using Ultraturrax (5 min, 13 000 rpm). The formulation were evaluated by particle size, zeta potential, pH, and backscattering analysis. VPA pharmacokinetics was investigated in unconscious (G1, 4 mg/kg) and conscious rats (G2, 4 mg/kg) after free drug administration as solution and VPA-NV (G3, 2 mg/kg) by i.v. bolus route, oral 4 mg/kg dosing of VPA (G4) and VPA-NV (G5) and intratracheal (i.t.) dosing of 4 mg/kg of VPA solution (G6) and VPA-NV (G7). For the i.t. administration a MicroSprayer[®] Aerosolizer device was used on unconscious rats. Non-compartmental and compartmental analyses were performed using Excel and Scientist[®], respectively.

Results: The mean diameter, zeta potential and pH were 333 ± 1.5 and 131 ± 1 nm; 25.6 ± 0.8 and $+13.4 \pm 1.7$ mV; 2.69 ± 0.02 and 2.71 ± 0.08 to VPA-NV and blank-NV. The plasma profiles of G1, G2, G3 declined in a bi-exponential fashion. VPA total clearance (CL_{tot}) was significantly reduced ($p < 0.05$) for G3 (0.7 ± 0.7 L/h/kg) in comparison to G1 (5.3 ± 2.4 mL/h/kg) and G2 (3.7 ± 2.8 mL/h/kg). The mean residence time and the volume of distribution (Vd_{ss}) did not show statistically significant difference after the intravenous administration comparing all groups. After oral dosing, peak plasma concentration (C_{max}) was significantly increased in G5 (7.1 ± 1.7 μ g/mL) in comparison to G4 (1.4 ± 0.4 μ g/mL), as well as the $AUC_{0-\infty}$ (5.1 ± 1.7 μ g·h/mL and 19.7 ± 8.2 μ g·h/mL for G4 and G5, respectively). The CL_{tot} decrease significantly in G5 (0.4 ± 0.2 mL/h/kg) in relation to G4 (2.3 ± 0.8 mL/h/kg). The Vd_{ss} show the same behavior (G5 = 1.0 ± 0.2 and G4 = 7.0 ± 3.1 mL/kg). As a result, the half-life was not altered. The C_{max} was significantly higher after i.t. NV dosing (G7 = 9.2 ± 4.6 μ g/mL) than after administration of VPA solution (G6 = 3.8 ± 0.6 μ g/mL). The time to C_{max} (t_{max}) was achieved earlier after the administration of G6 due to a slower rate of absorption determined for G7 ($k_a = 3.5 \pm 1.1$ h⁻¹) in comparison to G6 (11 ± 8 h⁻¹) ($p < 0.05$). The encapsulation of VPA markedly the drug pharmacokinetics after

pulmonary absorption resulting in a significant increase in $t_{1/2}$ from the lungs (G7 = 4.55 ± 0.67 h and G6 = 2.8 ± 0.76 h) due to a reduction in CL_{tot} (2.4 ± 0.6 and 0.46 ± 0.3 L/h/kg for the G6 and G7, respectively). **Conclusions:** The described system may offer an alternative approach for intravenous, oral and pulmonary delivery of VPA viewing different clinical uses.

8 DISCUSSÃO GERAL

10 REFERÊNCIAS

- ABEND, N.S.; DLUGOS, D.J. Treatment of Refractory Status Epilepticus: Literature Review and a Proposed Protocol. **Pediatr Neurol**, v. 38, p. 377-390, 2008.
- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L.K.; FAROKHZAD, O.C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, **Mol Pharm**, v. 5, p. 505–515, 2008.
- BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regul Topical Pharmacol**, v. 56, p. 290–299, 2010.
- BATTY, N.; MALOUF, G.G.; ISSA, J.P.J. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. **Cancer Lett**, v. 280, p. 192-200, 2009.
- BAUER, L.A. Applied Clinical Pharmacokinetics, 2^a Ed., The McGraw-Hill Companies, New York, NY, 2008.
- BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JAGER, E.; FIGUEIRO, F.; EDELWEISS, M, I.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A.M. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Lett**, v. 281, p. 53-63, 2009.
- BLABETA, R.A.; MICHAELIS, M.; DRIEVER, P.H.; JUNIOR, C.J. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. **Med Resh Rev**, v. 25, n. 4, p.383-397, 2005.
- BORGES, O.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; ROMEIJN, S.G.; AMIDI, M.; SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. **J Control Release**, v. 114, p. 348–358, 2006.
- BUUR-RASMUSSEN, B.; BROSEN, K. Cytochrome P450 and therapeutic drug monitoring with respect to clozapine. **Eur Neuropsychopharm**, v. 9, p. 453–459, 1999.
- CORRELL, C.U. From receptor pharmacology to improved outcomes: individualising the selection, dosing, and switching of antipsychotics. **Eur Psychiatry**, v. 25, p. S12-S21, 2010.
- CRUZ, L.; SOARES, L.U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **Int J Pharm**, v. 313, p. 198–205, 2006.
- DAHAN, A.; DUVDEVANI, R.; SHAPIRO, I.; ELMANN, A.; FINKELSTEIN, E.; HOFFMAN, A. The oral absorption of phospholipid prodrugs: In vivo and in vitro mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration, **J Control Release**, v. 126, p.1–9, 2008.
- DODANE, V.; AMIN, K.M.; MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **Int J Pharm**, v. 182, p. 21-32, 1999.
- DUBE, A.; NICOLAZZO, J.A.; LARSON, I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (–)-epigallocatechin gallate, **Eur J Pharm Sci**, v. 41, p. 219–225, 2010.

DURAND, R.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; HOUIN, R.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. **Int J Parasitol**, v. 27, p. 1361–7, 1997.

ESKANDARI, S.; VARSHOSAZ, J.; MINAIYAN, M.; TABBAKHIAN, M. Brain delivery of valproic acid via intranasal administration of nanostructured lipid carriers: in vivo pharmacodynamic studies using rat electroshock model, **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 363–371, 2011.

FREDDO, R.J. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, J.; SETZER, C.; QUINKERT, R.; MARTIN, F.; MULLER-GOYMANN, C. Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery, **Pharm Res**, 27(8), 1469-86 (2010).

GASZNER, P.; MAKKOS, Z.; KOSZA, P.; Agranulocytosis during clozapine therapy. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, p. 603– 607, 2002.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVIGASSET, J.P. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharm Res**, v. 12, p. 1–3, 1995.

HAAS, S.E.; BETTONI, C.C.; OLIVEIRA, L.K.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 34, p. 156-161, 2009.

HAFNER, A.; LOVRIC, L.; VOINOVICH, D.; FILIPOVICGRIC, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **Int J Pharm**, v. 381, p. 205-213, 2009.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J Control Release**, v. 89, p. 151–165, 2003.

HIEMKE, C.; DRAFICEVIC, A.; GRUNDER, G.; HATTER, S.; SACHSE, J.; VERNALEKEN, I.; MULLER, M.J. Therapeutic Monitoring of New Antipsychotic Drugs. **Ther Drug Monitor**, v. 26, p. 156–160, 2004.

JAIN, H.; GEDIYA, S.; SUTARIYA, V.; SHAH, H. Biopharmaceutical Classification System: A Review. **IJPI's J Pharm Cosmet**, v. 1, p. 3, 2011.

JOHN, M.; KANE, M.D.; CORRELL, C.U. Past and Present Progress in the Pharmacologic Treatment of Schizophrenia, **J Clin Psychiatry**, v. 71, p. 1115–1124, 2010.

KADIYALAA, I.; LOOA, Y.; ROYA, K.; RICEA, J.; LEONGB, K.W. Transport of chitosan–DNA nanoparticles in human intestinal M-cell model versus normal intestinal enterocytes, **Eur J Pharm Sci**, v. 39, p. 103–109, 2010.

KARFP, D.M.; HOLM, R.; KRISTENSEN, H.G.; MULLERTZ, A. Influence of the Type of Surfactant and the Degree of Dispersion on the Lymphatic Transport of Halofantrine in Conscious Rats, **Pharm Res**, v. 21, n. 8, 1413-1418, 2004

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 3–11, 2010

KIBBE, H. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3^a ed., Washington, DC: American Pharmaceutical Association; London, UK: Pharmaceutical Press. 2000, p.665.p.265

KOJIMA, K.; OKAMOTO, Y.; KOJIMA, K.; MIYATAKE, K.; FUJISE, H.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. **J Vet Med Sci**, v. 12, p. 1595-8, 2004.

LIM, S.M.; KIM, T.H.; JIANG, H.H.; PARK, C.W.; LEE, S.; CHEN, X.; LEE, X.C. Improved biological half-life and anti-tumor activity of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) using PEG-exposed nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 3538-3546, 2011.

LIU, Z.C.; UETRECHT, J.P. Clozapine is Oxidized by Activated Human Neutrophils to a Reactive Nitrenium Ion that Irreversibly Binds to the Cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 275, p. 1476-1483, 1995.

LÖSCHER W, Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. **Prog Neurobiol**, v. 58, p. 31-59, 1999.

LU, B.; XIONG, S.B.; YANG, H.; YIN, X.D.; ZHAO, R.B. Mitoxantrone-loaded BSA nanospheres and chitosan nanospheres for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. I: Formulation and in vitro characterization. **Int J Pharm**, v. 13; p. 168-74, 2006.

LU, Y.; MENG, Q.; ZHANG, G.; BEI, X. Clozapine-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes by gel entrapment and monolayer culture, **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1754–1760, 2008.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **Eur J Pharm Sci**, v. 42, p. 445-51, 2011.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **J Control Release**, v. 107, p. 215–228, 2005.

MASELLIS, M.; BASILE, V.S.; OZDEMIR, V.; MELTZER, H.Y.; MACCIARDI, F.M.; KENNEDY, J.L. Pharmacogenetics of Antipsychotic Treatment: Lessons Learned from Clozapine. **Biol Psychiatry**, v. 47, p. 252–266, 2000.

MAURI, M.C.; VOLONTERI, L.S.; COLASANTI, A.; FIORENTINI, A.; GASPARI, A.F.; BAREGGI, S.R. Clinical Pharmacokinetics of Atypical Antipsychotics A Critical Review of the Relationship Between Plasma Concentrations and Clinical Response. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 46, p. 359-388, 2007.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers, **Mar Drugs**, v. 8, p. 292-312, 2010.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. **Chem Pharm Bull**, v. 58, p. 1423-1430, 2010.

NEUMAN, N.G.; SHEARA, N.H.; JACOBSON-BROWNA, P.M. *et al.* CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity. **Clin Biochem**, v. 34, p. 211-218, 2001.

OWEIS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Pharmacology of Valproate. **Psychopharmacol Bull**, v. 37, p. 17-24, 2003.

PALIWAL,R.; PALIWAL, S.R.; MISHRA, N.; MEHTA, A.; VYAS, S.P. Engineered chylomicron mimicking carrier emulsome for lymph targeted oral delivery of methotrexate, **Int J Pharm**, v. 380, p. 181–188, 2009.

PEREZ-PLASENCIA, C.; DUENAS-GONZALEZ, S. Can the state of câncer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? **Mol Cancer**, v. 5, p. 27, 2006.

PERUCCA E, Pharmacological and therapeutic properties of valproate. **CNS Drugs**, v. 16, p. 695-714, 2002.

PORTER, C.J.H.; TREVASKIS, N.L., CHARMAN, W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, **Nature Reviews**, v.6, 231-248, 2007.

RABEA,E.I.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, **Biomacromol**, v. 4, p. 1457-65, 2003.

RAFFIN, R.P. OBACH, E.S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, p. 163-72, 2003.

RODRIGUES, J.R.; CROFT, S.L.; FESSI, H.; BORIES, C.; DEVISSAGUET, J.P. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in Leishmania donovani infected mice. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 45, p. 223–8, 1994.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3^{ed}. U.S.A. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2000.

SAREMI, S.; ATYABI, F.; AKHLANGHI, S.P.; OSTAD, S.N.; DINARVAND, R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 119-28, 2011.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharm Res**, v. 24, p. 2198-206, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; SIQUEIRA,I.R.; BADEJO, A.S.; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; NETTO, C.A.; GUTERRES, S.S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **Eur JPharm Biopharm**, v. 69, p. 64-71, 2008.

SLÜTTER, B.; PLAPIED, L.; FIEVEZ, V.; SANDE, M.A.; DES RIEUX, A.; SCHNEIDER, Y.J.; VAN RIET, E.; JISKOOT, W.; PRÉAT, V. Mechanistic study of

the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. **J Control Release**, v. 38, p. 113-21, 2009.

SONAJE, K.; LIN, K.J.; WEY, S.P.; LIN, C.K.; YEH, T.H.; NGUYEN, H.N.; HSU, C.W.; YEN, T.C.; JUANG, J.H.; SUNG, H.W. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. **Biomaterials**, v. 31, p. 6849-58, 2010.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; DI BARI, M.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M.J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **Int J Pharm**, v. 324, p. 67–73, 2006.

TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, W.N.; PORTER, C.J.H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, p. 702–716, 2008.

TRINKA, E. The use of valproate and new antiepileptic drugs in status epilepticus. **Epilepsia**, v. 48, p. 49–51, 2007.

VENKATESWARLU, V.; MANJUNATH, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. **J Control Release**, v. 95, p. 627–638, 2004

WANG, J.J.; ZENG, Z.W.;XIAO, R.Z.; XIE, T.; ZHOU, Z.L.; ZHAN, X.R.; WANG, S.L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers, **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 765–774, 2011.

WENZIE, N.; UCHIDA, H.; ISMAIL, Z.; MAMO, D.C.; RAJJI, T.K.; REMINGTON, G.; SPROULE, B.; POLLOCK, B.G.; MULSANT, B.H.; BIES, R.R. Clozapine Exposure and the Impact of Smoking and Gender: A Population Pharmacokinetic Study. **Ther Drug Monitor**, v. 31, p. 360–366, 2009.

WILSON, B.; SAMANTA, M.K.; SANTHI, K.; KUMAR, K.P.S.; RAMASAMY, M.; SURESH, B. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomedicine**, v. 6, p. 144–152, 2010.

WINTER, M.. Basic Clinical Pharmacokinetics, 4th Edition. Philadelphia, PA. Lippincott, 2004.

