



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE MICROPARTÍCULAS
CONTENDO TRIANCINOLONA NO MODELO DE COLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL

CAMILLA CARLA DO NASCIMENTO DANTAS CARDOSO

NATAL/RN
2016

CAMILLA CARLA DO NASCIMENTO DANTAS CARDOSO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE MICROPARTÍCULAS
CONTENDO TRIANCINOLONA NO MODELO DE COLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologias da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Estrutural e Funcional.

Área de concentração: Morfologia

Subárea: Anatomia patológica e patologia clínica

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Christina da Silva Camillo
Coorientador(a): Prof^ª Dr^ª Waldenice de Alencar Moraes

NATAL/RN

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Sistema de Bibliotecas – SISBI
Catalogação da Publicação na Fonte - Biblioteca Central Zila Mamede

Cardoso, Camilla Carla do Nascimento Dantas.

Avaliação do potencial anti-inflamatório de micropartículas contendo triancinolona no modelo de colite ulcerativa experimental / Camilla Carla do Nascimento Dantas Cardoso. - 2016.

52 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional. Natal, RN, 2016.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christina da Silva Camillo.

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Waldenice de Alencar Moraes.

1. Histopatologia - Dissertação. 2. Micropartículas - Dissertação. 3. Colite ulcerativa - Dissertação. 4. Triancinolona - Dissertação. I. Camillo, Christina da Silva. II. Moraes, Waldenice de Alencar. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 616-091.8

CAMILLA CARLA DO NASCIMENTO DANTAS CARDOSO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE MICROPARTÍCULAS
CONTENDO TRIANCINOLONA NO MODELO DE COLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Estrutural e Funcional

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

Instituição: UFRN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

Instituição: UFPE

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. LOURENA MAFRA VERISSIMO

Instituição: UFRN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha família, por ter me dado base e apoio para alcançar meus objetivos acadêmicos; a minha orientadora, professora e amiga Christina Camillo, que esteve ao meu lado desde os meus primeiros passos na graduação, e posterior pós-graduação, sempre se fazendo presente me aconselhando, preocupando-se com meus questionamentos na vida acadêmica, e me acolheu com todo amor depositando votos de confiança, dando-me todo apoio para que eu chegasse até o fim de mais uma jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus criador da vida, por este amor imensurável que ele tem por todos nós, pela sabedoria nos dada para a escolha dos nossos caminhos, que nos faz continuar na jornada mesmo diante das dificuldades, estando sempre orientando-nos e dando forças para continuar lutando pelos nossos sonhos.

Agradeço ao meu pai, Augusto Cardoso, que me deu suporte em todos os momentos da minha vida desde o meu nascimento, onde ele sempre esteve ao meu lado me orientando, corrigindo, mostrando-me como lidar com a vida e sempre disposto a me apoiar nas minhas escolhas do esporte ao curso de pós-graduação. Com ele ao meu lado eu sei que poderei vencer os obstáculos.

Agradeço as minhas mães, Marta Bernardo e Maria Lúcia, por todo o apoio dado, pela preocupação de mãe, carinho, amor, por estarem pertinho de mim, o nosso amor sempre será maior.

Agradeço a minha avó paterna, Marlene Cardoso, pelo exemplo de vida que é estando sempre mostrando que somos muito mais do que achamos que podemos ser, por nos fazer lutar pela vida em todos os momentos, sejam eles difíceis ou não; agradeço a Deus pelo dom que ela tem de transmitir alegria, e por ser à base da família.

Agradeço aos meus tios e tias, irmã e irmão, primos, enfim, a toda família por sempre me aconchegar com esse amor inexplicável, e estar na torcida pelo meu crescimento como ser humano, cidadã e profissional.

Agradeço a minha orientadora pela inspiração diária que é, por ser esse exemplo de professora, amiga e, principalmente, pelo exemplo de ser humano estando sempre disposta a ajudar o próximo, demonstrando-se sempre preocupada com as pessoas que estão ao seu redor.

Agradeço ao grupo de pesquisa, Socorro, Everlandja, Victor, e professora Christina, pela união que foi consolidada entre nós, pela disposição que cada um teve para construirmos este trabalho, pelo nosso acreditar em estarmos desenvolvendo algo para contribuição no âmbito científico.

Agradeço as meninas do laboratório de histotécnica, por toda ajuda fornecida durante a execução deste trabalho em prol do aprendizado mútuo.

Agradeço aos amigos mais próximos, que sempre se dispuseram a entender minha ausência devido à correria de ser uma pesquisadora, assim como, agradeço também aos amigos mais distantes, que sempre estiveram próximos de alguma forma transmitindo boas energias para que eu pudesse continuar sonhando com meus objetivos.

Agradeço a todos os professores pelo conhecimento transmitido durante toda minha vida acadêmica da graduação a pós-graduação, em especial, aos que estiveram presentes com maior proximidade – professores Christina Camillo, Sérgio Moura, Waldenice Morais, Maria Nazaré Cardozo, Lourena Veríssimo, Daliana Caldas, Manuela Carvalho, Joselice Silva (In memoriam) - que me proporcionaram em algum momento durante a vida acadêmica experiências na pesquisa, docência, e também como cidadã.

Agradeço aos Professores Lourena Veríssimo e Jeymesson Raphael por aceitarem gentilmente o convite para participar da banca avaliadora deste trabalho, contribuindo para meu crescimento científico e humano.

EPÍGRAFE

*“Não sei quantas almas tenho.
Cada momento mudei.
Continuamente me estranho.
Nunca me vi nem achei.
De tanto ser, só tenho alma.
Quem tem alma não tem calma.
Quem vê é só o que vê,
Quem sente não é quem é,*

*Atento ao que sou e vejo,
Torno-me eles e não eu.
Cada meu sonho ou desejo
É do que nasce e não meu.
Sou minha própria paisagem;
Assisto à minha passagem,
Diverso, móbil e só,
Não sei sentir-me onde estou.*

*Por isso, alheio, vou lendo
Como páginas, meu ser.
O que segue não prevendo,
O que passou a esquecer.
Noto à margem do que li
O que julguei que senti.
Releio e digo: "Fui eu?"
Deus sabe, porque o escreveu. ”*

Fernando Pessoa

RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) engloba um espectro de distúrbios inflamatórios crônicos e é classificada em dois subtipos principais: Colite Ulcerativa (UC) e Doença de Chron (DC). O tratamento da UC baseia-se no uso de anti-inflamatórios, mas estes medicamentos na sua forma convencional geram inúmeros efeitos adversos, o que estimula o desenvolvimento de pesquisas focadas na busca por novas terapias e tecnologias aplicadas aos fármacos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de micropartículas revestidas por Biopolímeros de quitosana e goma guar contendo como princípio ativo a triancinolona, no intuito de observar a resposta anti-inflamatória nos parâmetros macro e microscópicos da mucosa intestinal. Foram utilizados 56 ratos Wistar, divididos em 08 grupos de 7 animais, sendo G1: Controle negativo (ausência de colite), G2: Colite, G3: Sulfassalazina (SSZ 500mg/Kg/dia), G4: Triancinolona (TR) livre 5mg/Kg/dia, G5: TR livre 10mg/Kg/dia, G6: TR livre 15mg/Kg/dia, G7: Micropartícula de TR (15mg/Kg/dia fármaco encapsulado) e o grupo G8: Biopolímeros. Os resultados obtidos quanto ao parâmetro de avaliação macroscópica mostraram que o menor grau de lesão, com exceção do grupo Controle negativo, foi encontrado no grupo dos Biopolímeros e SSZ quando comparado aos demais grupos: Colite, TR 5mg, TR 10mg, TR 15mg e Micropartícula TR. Na análise estatística desse parâmetro os grupos SSZ 500mg/Kg/dia, TR 15mg/kg/dia, Micropartícula TR 15mg/Kg/dia e Biopolímeros diferiram estatisticamente quando comparadas ao grupo Colite ($p < 0,05$), sendo esta diferença mais significativa no grupo dos Biopolímeros ($p < 0,01$). Na análise da perda de peso, o grupo Micropartícula TR reduziu entre 8 a 12% esse parâmetro quando comparado aos grupos da Triancinolona livre, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$), evidenciando que a tecnologia empregada foi satisfatória quanto a redução desse efeito adverso. Na avaliação histopatológica o grupo TR 15mg/kg/dia obteve o menor dano tissular, evidenciando o potencial anti-inflamatório do fármaco livre. Diante dos resultados sugere-se que a nanotecnologia com o uso das micropartículas foi capaz de reduzir efeitos adversos, como a perda de peso e, além disso, obteve resultados com potencial efeito anti-inflamatório, apesar da liberação de apenas 69% dos 15mg da triancinolona encapsulada em 24 horas. Assim, os estudos voltados para aplicação da nanotecnologia e novos ativos devem crescer e ampliar com intuito de buscar novas terapias e elucidar mecanismos de ação ainda não descobertos.

Palavras-chave: Triancinolona. Micropartículas. Colite Ulcerativa. Histopatologia.

ABSTRACT

The inflammatory bowel disease (IBD) encompasses a spectrum of chronic inflammatory disorders and is classified into two main subtypes: Ulcerative Colitis (UC) and Chron's Disease (CD). The treatment of UC is based on the use of anti-inflammatories, but these drugs in their conventional form generate numerous adverse effects, which stimulates the development of research focused on the search for new therapies and technologies applied to the drugs. The objective of this study was to evaluate the activity of microparticles coated by chitosan and guar gum biopolymers containing as active principle triamcinolone in intention to observe the anti-inflammatory response in the macroscopic and microscopic parameters of the intestinal mucosa. In total, 56 Wistar rats divided into 8 groups in 7 animals, being G1: Negative control (absence of colitis), G2: Colitis, G3: Sulfasalazine (SSZ 500mg/Kg/day), G4: Free triamcinolone (TR) 5mg/Kg/day, G5: Free TR 10mg/Kg/day, G6: Free TR 15mg/Kg/day, G7: Triamcinolone microparticle (15mg/Kg/day), G8: Biopolymers. The results obtained for the macroscopic evaluation showed that the lowest lesion degree, except for the negative control group, was found in the Biopolymer group and SSZ group when compared to the other groups: Colitis, TR 5mg, TR 10mg, TR 15mg and TR microparticle. In the statistical analysis of this parameter, the groups treated with SSZ 500mg/kg/day, TR 15mg/kg/day, TR microparticle 15mg/Kg/day and Biopolymers differed statistically when compared to the Colitis group ($p < 0.05$), this difference being more significant in the Biopolymer group ($p < 0.01$). In the analysis of weight loss, the TR microparticle reduced this parameter between 8 and 12% when compared to the free Triamcinolone groups, differing statistically ($p < 0.05$), suggesting that the technology employed was satisfactory in terms of the reduction of this adverse effect. In the histopathological evaluation, the TR group 15mg/kg/day obtained the lowest tissue damage, evidencing the anti-inflammatory potential of the free drug. In view of the results, it is suggested that nanotechnology with the use of microparticles was able to reduce adverse effects, such as weight loss and, in addition, obtained results with a potential anti-inflammatory effect, despite the release of only 69% of 15mg of encapsulated triamcinolone in 24 hours. Thus, studies aimed at the application of nanotechnology and new assets should grow and expand in order to seek new therapies and elucidate mechanisms of action that have not yet been discovered.

Key words: Triamcinolone. Microparticles. Ulcerative Colitis. Histopathology.

LISTA DE QUADRO, TABELAS E FIGURAS

Número	Legenda	Página
Quadro 1	Principais características que diferem a Colite Ulcerativa da Doença de Chron	16
Tabela 1	Distribuição dos animais de acordo com o grupo experimental	27/28
Tabela 2	Efeito da colite ulcerativa experimental nos grupos tratados com SSZ, TR livre, Micropartícula TR e Biopolímeros sobre a pontuação microscópica do cólon de ratos com UC induzida por ácido acético. 0: normal; +: leve; ++: moderado; severo: +++.	38
Figura 1	Fotomicrografia representativa do Cólon saudável com as camadas Mucosa (I), Submucosa (II) e Muscular (III)	17
Figura 2	Desenho experimental do modelo de colite ulcerativa	28
Figura 3	Imagens macroscópicas dos graus de lesão do cólon nos diferentes grupos experimentais. (A) Grupo Controle negativo; (B) Colite; (C) SSZ; (D) TR 5mg; (E) TR 10 mg; (F) TR 15 mg; (G) Micropartícula TR; e (H) Biopolímeros	35
Figura 4	Fotomicrografias do cólon de animais submetidos a colite ulcerativa induzida por ácido acético. I. Camada Mucosa, II. Camada Submucosa, III. Camada Muscular. (A) Grupo Controle negativo; (B) Colite; (C) SSZ; (D) TR 5mg; (E) TR 10 mg; (F) TR 15 mg; (G) Micropartícula TR; e (H) Biopolímeros. Aumento de 100x.	37

LISTA DE GRÁFICOS

Número	Legenda	Página
Gráfico 1	Avaliação da Ingestão hídrica dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos controle e colite ($p < 0,01$).	32
Gráfico 2	Avaliação da Perda de peso dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos Controle negativo vs Colite, vs SSZ, vs TR (5, 10 e 15mg) e vs Micropartículas TR ($p < 0,01$). (#): diferença estatística entre os grupos Micropartículas e os grupos TR (5, 10 e 15mg) ($p > 0,05$).	33
Gráfico 3	Relação peso (g) x comprimento (cm) do Cólon dos animais dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos Controle negativo e Colite ($p < 0,01$); (**): diferença estatística entre os grupos Controle negativo e TR 5mg ($p < 0,01$).	34
Gráfico 4	Escore macroscópico dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5;10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos Controle (-) vs Colite, vs TR 5mg	36

($p < 0,01$); (**): diferença estatística entre os grupos Controle (-) vs TR 10, vs 15mg e vs Micropartícula TR ($p < 0,01$).

Gráfico 5 Comparação do escore macroscópico do grupo Colite com os grupos SSZ, TR 5;10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (***) : diferença estatística entre os grupos Colite e Biopolímeros ($p < 0,01$); (*) : diferença estatística entre os grupos Colite vs SSZ, vs TR 15mg e vs Micropartículas TR ($p < 0,05$). 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	27
3.2 ANIMAIS	27
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	27
3.4 INDUÇÃO DA COLITE ULCERATIVA	29
3.5 AVALIAÇÃO DA COLITE ULCERATIVA	29
3.5.1 Avaliação da atividade da doença	29
3.5.2 Avaliação macroscópica	29
3.5.3 Avaliação histopatológica	30
3.6 CARACTERÍSTICAS DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E BIOPOLÍMEROS	30
3.6.1 Cinética de liberação da Triancinolona encapsulada	30
3.6.2 Potencial de intumescimento da Triancinolona encapsulada e dos Biopolímeros	31
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS	32
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA	32
4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	33
4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	37
4.4 CARACTERÍSTICAS DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E BIOPOLÍMEROS	39
4.4.1 Cinética de liberação da Triancinolona encapsulada	39
4.4.2 Potencial de intumescimento da Triancinolona encapsulada e dos Biopolímeros	39
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) abrangem um conjunto de desordens crônicas inflamatórias, caracterizando-se por sangramento retal, dor abdominal, febre, perda de peso, diarreia (NACC, 2014), e são representativas de grande parte da população na atualidade, uma vez que geram repercussões importantes na qualidade de vida de seus portadores, acarretando alterações no âmbito social, psicológico e profissional (OLIVEIRA et al., 2010).

As DIIs estão distribuídas em todo o mundo e representam um sério problema de saúde, pois atingem preferencialmente pessoas jovens, apresentam períodos de recidivas frequentes e exibem formas clínicas de alta gravidade (OLIVEIRA et al., 2010). Segundo Oliveira et al (2010), a faixa etária mais susceptível compreende de dez a quarenta anos, e estudos epidemiológicos desenvolvidos por Thoreson e Cullen (2007) reafirmam que a doença inflamatória intestinal geralmente afeta pessoas jovens, exibindo uma incidência bimodal com um pico elevado na segunda ou na terceira década de vida. Em indivíduos idosos a incidência é variável, e oscila entre cinco e seis casos para cada 100.000 habitantes (PAIM et al., 2009; BRASIL, 2002).

Estudos de Benetton (2008) relatam diferenças étnicas e geográficas na incidência das DIIs, sendo mais comuns em brancos, com baixa frequência na população japonesa e acometendo, principalmente, países mais desenvolvidos em regiões da América do Norte e Europa. A menor incidência é encontrada nos países subdesenvolvidos distribuídos, por exemplo, na América do Sul, regiões da Ásia, e no continente africano, porém devido à alta industrialização, a implicação do ambiente, dieta e as práticas culturais que refletem como possíveis fatores de risco, sua incidência se apresenta em crescimento (THORESON, CULLEN, 2007; BENETTON et al., 2008).

Aspectos sobre a etiologia das DIIs são pouco relatadas, pois há uma dificuldade de elucidação do mecanismo e dos fatores específicos em que a doença é ativada, entretanto está descrito na literatura a sua relação combinada a fatores genéticos, imunológicos e ambientais, onde é desencadeado uma resposta imune exacerbada atípica que ocorre do intestino para outros tecidos e órgãos, causando muitas vezes reações extra intestinais (HANSEN et al., 2010). Como resultado dessa resposta imune, existe uma regulação sobre a síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios incluindo reativos de oxigênio, metabólitos nitrogenados, eicosanoides, quimiocinas e citocinas, que contribuem ativamente para o início da cascata patogênica e sua manutenção com alta resposta inflamatória intestinal (ALGIERI et al., 2013).

Estes mecanismos de regulação dos mediadores químicos, derivados da resposta imune inflamatória, contribuem para a identificação das doenças inflamatórias intestinais, as quais são classificadas em duas variedades mais relevantes: doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (UC) (TRIANAFILLIDIS et al., 2011; ALGIERI et al., 2013).

Assim, a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC) compreendem 90% das DIIs, com incidência global de 5 a 10 casos em 100.000 hab./ano, sendo a colite ulcerativa três vezes mais frequente e apresentando maior incidência de manifestações cutâneas e extra intestinais (DIÓGENES et al., 2003; LOPES et al., 2009). De maneira geral, pode-se considerar a incidência aproximada de dez casos de colite ulcerativa para 100.000 habitantes e três casos de doença de Crohn para cada 100.000 habitantes (BENETTON et al., 2008).

Apesar da DC e UC terem algumas características em comum, existem diferenças importantes, tanto a nível molecular quanto na evolução clínica dessas doenças crônicas. Enquanto a DC pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, geralmente de forma descontínua, a UC é restrita ao cólon, caracteriza-se pela inflamação contínua, invariavelmente envolvendo o reto, e é classificada de acordo com o limite proximal em três tipos: proctite ulcerativa, quando a inflamação ocorre na parte inferior do cólon acometendo o reto; colite distal ou limitada quando acomete apenas o lado esquerdo do cólon; e pancolite que acomete todo o cólon (THOMPSON et al., 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN, 2013).

No quadro 01 pode-se diferenciar melhor a DC da UC em relação a seus aspectos clínicos, localização anatômica e lesões provocadas (THOMPSON et al., 2011; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2009).

Aspecto clínico	Doença de Chron	Colite Ulcerativa
Diarreia	Acompanhada de dor abdominal e desnutrição	Sanguinolenta, frequente de pequeno volume
Localização	Afeta qualquer parte do trato gastrointestinal	Restrita ao cólon e reto
Lesões	Descontínuas e transmural, úlceras e fístulas	Contínuas e restritas a mucosa, dano glandular

Quadro 01: Principais características que diferem a Colite Ulcerativa da Doença de Chron.

Nas análises histopatológicas de um cólon saudável, as camadas da parede intestinal (I, II, III) apresentam um arcabouço preservado e saudável - Figura 1 - (JUNQUEIRA,

CARNEIRO, 2013). Já na DC a histologia do órgão é descrita com densa infiltração de linfócitos e macrófagos em todas as camadas da parede intestinal e na UC a lesão é restrita à região da mucosa, e o acometimento das camadas mais profundas como a camada muscular e a camada serosa é incomum, ocorrendo apenas nos casos fulminantes, habitualmente em associação com megacólon tóxico (THOMPSON et al., 2011; BERNSTEIN et al., 2010). Quando se tem UC ativa, a histopatologia consiste em infiltração de neutrófilos em sua camada mucosa, apresentando depleção de células caliciformes, e abscessos da cripta bem evidenciados. O processo inflamatório agudo está associado (particularmente epitelial) a destruição das células da mucosa (THOMPSON et al., 2011).

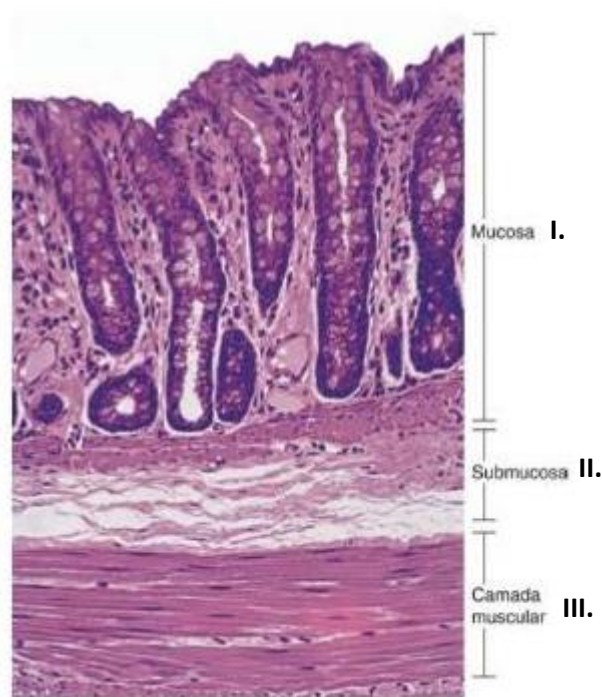


Figura 01: Fotomicrografia representativa do Cólón saudável com as camadas Mucosa (I), Submucosa (II) e Muscular (III) (Adaptado: JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

Direcionando o estudo a cerca da Colite ulcerativa, a literatura descreve aspectos clínicos relatando que as manifestações mais comuns são: diarreia, sangramento retal, eliminação de muco nas fezes e dor abdominal. Para não confundir com causas infecciosas, o diagnóstico deve ser bem criterioso seguindo avaliação da história clínica, exame de fezes, colonoscopia, e achados histopatológicos (BRASIL, 2002; UPTODATE, 2015).

A colite também pode ser classificada de acordo com o grau de atividade da doença, seguindo a classificação de Montreal. Assim, temos estágios de desenvolvimento da doença distribuídos e identificados como: remissão (S0): 03 ou menos evacuações por dia, sem qualquer presença de sangue ou aumento da urgência para a defecação; leve (S1): até 04

episódios de fezes por dia, possivelmente sanguinolentas; Moderado (S2): 04-06 episódios de fezes por dia com presença de sangue, sem sinais de comprometimento sistêmico; e grave (S3): mais de 06 episódios de fezes por dia com presença de sangue, somados aos sinais de envolvimento sistêmico (temperatura acima de 37,5 ° C, coração com ritmo acima de 90 batimentos/min, concentração de hemoglobina abaixo de 10,5 g / dL, ou VHS acima de 30 mm/h, baixa albumina e alterações eletrolíticas devido à diarreia e desidratação) (MEIER, STURM, 2011; UPTODATE, 2015).

Observando a gravidade que a doença pode alcançar, o objetivo do diagnóstico e tratamento médico é a rápida indução da remissão para manter o indivíduo com ausência total de sintomas e/ou evitar novas crises, prevenindo complicações da própria doença e o seu tratamento, uma vez que indivíduos com colite ulcerativa de longa duração correm um risco mais elevado de desenvolverem câncer colorretal que a população geral, e esse risco está relacionado à extensão do acometimento colorretal e, principalmente, a duração da doença inflamatória (GUPTA et al., 2007; BERNSTEIN et al., 2010; NIEMINEN et al., 2014).

A escolha do tratamento da UC depende do grau de atividade, da distribuição (região do intestino grosso acometido), curso da doença, frequência de recaídas, manifestações extra intestinais, medicamentos anteriores, perfil de efeitos adversos dos medicamentos e desejos individuais do paciente (MEIER, STURM, 2011). No acervo terapêutico são utilizados fármacos anti-inflamatórios, sendo destacados quatro grupos: aminossalicilatos (5-ASAs), corticosteroides, imunossupressores e agentes biológicos (MEIER, STURM, 2011; NACC, 2011). Outros fármacos também são utilizados na colite para minimizar a sintomatologia, tais como a diarreia ou a dor, mas eles não reduzem a inflamação (NACC, 2011).

Os aminossalicilatos compreendem o tratamento tópico e oral, e nesta classe terapêutica temos alguns princípios ativos a serem detalhados e explorados. Os 5-ASAs são quimicamente relacionados com a aspirina, e com o trabalho de amortecimento do processo inflamatório, permitem que o tecido danificado seja tratado. São utilizados em longo prazo para manter a remissão - recomendada pelas diretrizes do Reino Unido e da Europa para a gestão da UC - assim como para o tratamento de crises leves a moderadas dos casos de colite (NACC, 2011; GEDIIB, 2013; FORD et al., 2012).

O primeiro destes fármacos a ser desenvolvido foi sulfassalazina, que foi concebida para o tratamento de artrite e o seu uso na colite ulcerativa foi descoberto no início dos anos 1940. Os demais aminossalicilatos incluem mesalazina, olsalazina, e balsalazida, que atuam em diferentes sítios de ação, proporcionando ação terapêutica na porção posterior do intestino (NACC, 2011). A olsalazina e a balsalazida não estão disponíveis no comércio de

medicamentos brasileiro, mas a população afetada com UC tem no arsenal terapêutico a disponibilidade de sulfassalazina (via enteral) e mesalazina (via enteral e tópica) como exemplos de fármacos da classe dos 5-ASAs (GEDIIB, 2013).

Na classe dos anti-inflamatórios esteroides os primeiros fármacos foram utilizados por volta de 1959 com o uso da hidrocortisona e a cortisona, demonstrando efeitos benéficos no organismo, em particular, em processos inflamatórios, nos quais reduziram o rubor, edema e dor (NACC, 2011; STOTLAND et al., 2000). Em pesquisas sobre os fármacos utilizadas na colite, foi visto também que antes da introdução da cortisona como uma forma de tratamento, acometimentos graves de colite ulcerativa eram muito mais perigosos do que são hoje (NACC, 2011).

O uso de esteroides pode ser administrado por injeção, na forma de comprimidos, ou por via tópica. O tratamento com prednisona via oral é a escolha terapêutica mais utilizada para ataques agudos, e atualmente outros fármacos desta classe com administração tópica (via retal) como triancinolona, betametasona e metilprednisolona, são escolhas terapêuticas adjuvantes (GOMOLLON et al., 2013). Como a dose administrada dos corticoides orais usados na terapêutica da colite é elevada para promover a eficácia inicial e sucesso na resposta, o desmame do medicamento poderá ser realizado logo após este período de eficácia (NACC, 2011). É importante lembrar que essa classe terapêutica é regida por diversos efeitos adversos como: crescimento de pelos faciais, desenvolvimento ou agravamento da acne, aumento da glicemia, retenção de sódio, supressão da atividade da glândula suprarrenal, perda de peso; e que são desenvolvidos, principalmente, pela dose elevada para atingir o efeito terapêutico, e pelo seu efeito sistêmico (RENAME, 2010).

Outra classe usada para o tratamento da colite é a dos imunossuppressores (imunomoduladores) que tem como principais representantes a azatioprina, mercaptopurina, e ciclosporina que são utilizados nos pacientes para os quais houve falha no tratamento com os aminossalicilatos, e o uso de corticoides não podem ser diminuídos ou retirados com sucesso (BENETTON et al., 2008). Como há um risco maior de toxicidade ao utilizar esses medicamentos, é importante que seu uso só seja feito em casos graves (RENAME, 2010).

Por fim a classe dos agentes biológicos corresponde ao mais novo grupo de medicamentos a serem utilizados na terapêutica das DIIs em geral. Diferentemente da maioria dos medicamentos que são feitas a partir da combinação de produtos químicos, os biológicos são feitos a partir de proteínas de origem humana ou animal. Eles têm como alvo produtos químicos específicos envolvidos na resposta imune do organismo à infecção ou substâncias nocivas, que são excessivos ou trabalham inadequadamente. Eles são usados somente para a

doença ativa e grave após a falha dos demais tratamentos de escolha padrão (NACC, 2011). Nesta classe, além dos possíveis efeitos adversos e o maior risco de toxicidade (RENAME, 2010), deve-se ainda estudar o custo benefício do tratamento, o que leva a uma preferência ao uso das demais escolhas terapêuticas discutidas e que são eficazes (NACC, 2011).

Apesar das possibilidades de escolha terapêutica, estudos tem demonstrado que a baixa adesão ao tratamento tem sido um importante entrave para a melhora do quadro clínico de indivíduos acometidos pela colite ulcerativa, onde apenas 40% a 60% dos pacientes tem adesão satisfatória ao tratamento. Em parte, isso se deve aos inúmeros efeitos adversos causados pelos fármacos utilizados (Ke et al., 2012). Assim, diante da baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes, e com o aumento dos casos de UC, que podem ser gerados por inúmeros fatores sejam eles genéticos, imunológicos ou ambientais, se faz necessária a incrementação na terapêutica de novas possibilidades de tratamento visando miminizar os efeitos adversos oriundos dos tratamentos padrões (GOMOLLON et al., 2013; NACC, 2011; PONTTE et al., 2010).

Atualmente tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos para melhoria dos aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, buscando inovações e melhorias tecnológicas no desenvolvimento dos medicamentos. Novas estratégias de distribuição de ativos farmacoterapêuticos, incluindo polímeros melhorados e modificados, veículos inovadores de fármacos, bem como sistemas de liberação, têm sido estudadas extensivamente e investigados em modelos de colite experimental (NACC, 2011; PONTTE et al., 2010; LAUTENSCHLAGER et al., 2014).

Desde 1994 estudos de Cole e Hawkey já demonstravam um grande interesse e uma grande expectativa no desenvolvimento de fármacos com vetorização de ativos cólon específica para os casos de colite ulcerativa, a fim de reduzir os efeitos adversos desses medicamentos, melhorando sua eficácia terapêutica (COLE, HAWKEY, 1994). Anos depois, em 2002, a necessidade e as vantagens dos sistemas de veiculação e vetorização cólon específica já estavam bem reconhecidas e documentadas pela literatura, onde essa técnica iria proporcionar uma terapia mais eficaz de doenças do cólon, incluindo a colite ulcerativa. A veiculação e vetorização de ativos farmacológicos na região colônica tem o potencial para atender às necessidades terapêuticas importantes não satisfeitas com tratamento padrão, incluindo a administração oral de ativos macromoleculares, sendo alvejada como um padrão de liberação apropriada, que pode ser crucial no fornecimento de terapia eficaz para esta doença crônica (YANG et al., 2002).

Esses novos sistemas de entrega alvo específico oferecem uma gama de benefícios terapêuticos, como: redução de efeitos adversos por uma diminuição da absorção sistêmica de agentes ativos para a circulação, altas concentrações locais dos ativos em tecidos intestinais inflamados, redução do risco de interações medicamentosas e, finalmente, um melhor cumprimento do tratamento por uma frequência reduzida de administração dos ativos terapêuticos (LAUTENSCHLAGER et al., 2014).

Assim, o tratamento através de sistemas com veiculação e vetorização de ativos farmacológicos de forma específica parece ser mais promissor em relação às estratégias de distribuição presentes e já estabelecidas. Dessa forma, apesar da administração de medicamentos convencionais atuais estarem bem estabelecidas na gestão das DIIs, principalmente da colite ulcerativa, as desvantagens em termos de uma incapacidade de atingir o ativo diretamente para o local da doença, os altos riscos de reações adversas a medicamentos e a limitada eficácia terapêutica leva as estratégias convencionais serem substituíveis (LAUTENSCHLAGER et al., 2014).

O sistema de entrega específica e local dos ativos farmacoterapêuticos também precisam satisfazer os critérios em termos de uma biodegradação completa e uma elevada biocompatibilidade sem propriedades pró-inflamatórias, e, além disso, devem ter preferência para serem formulados em formas farmacêuticas com administração via oral para induzir e manter a aderência dos pacientes ao tratamento (LAUTENSCHLAGER et al., 2014). Outras características importantes para o uso dessa estratégia terapêutica devem ser levadas em consideração devido à localização distante do cólon no trato gastrointestinal, assim, um sistema de vetorização cólon específica evitará a liberação precipitada do ativo no estômago e intestino delgado, e a liberação do mesmo será feita somente na região do cólon (YANG et al., 2002).

Diante disso, muitas pesquisas avançaram com o uso de novas tecnologias para proporcionar melhores estratégias terapêuticas visando o controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos. Dentre essas, temos o uso das micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas), que são um dos principais campos de pesquisa relacionado às doenças que necessitam de uma vetorização de forma mais específica, e atuam principalmente, em células com alterações fisiopatológicas relacionadas a tumores sólidos ou tecidos inflamados (LAUTENSCHLAGER et al., 2014; VISCIDO et al., 2014).

Dentre todos os sistemas de transportadores de partículas utilizados para veiculação e vetorização de ativos farmacológicos para cólon, o sistema microparticulado tem se mostrado uma das melhores abordagens para entrega controlada de fármaco no local específico da inflamação, pois as micropartículas são pequenas partículas de fluxo livre, constituída por

polímeros naturais ou sintéticos tendo diâmetro de partícula variando de 1 a 1000 micrometros, e que foram desenvolvidas, principalmente, com o avanço da biotecnologia e da genômica, para propor terapias potentes e específicas. Atualmente, é crescente o uso das micropartículas no tratamento da UC (COLLNOT et al., 2012; NIDHI et al., 2014; LAUTENSHLAGER et al., 2013).

Para superar os desafios de desvantagens dos sistemas convencionais de administração de fármacos, além do aumento das reações adversas sistêmicas dos fármacos, os sistemas de micropartículas parecem ser uma terapia promissora para a liberação controlada e sustentada do fármaco após administração oral, que buscam direcionar os fármacos apenas para as regiões gastrointestinais específicas (COLLNOT et al., 2012; NIDHI et al., 2014). Além disso, esses estudos objetivam atingir a concentração máxima de agentes ativos em tecidos intestinais inflamados usando a vetorização do fármaco no local da doença para alcançar a eficácia terapêutica, reduzindo simultaneamente os efeitos adversos (LAUTENSHLAGER et al., 2013).

Assim, com o crescimento das pesquisas na área do desenvolvimento de micropartículas, os polímeros biodegradáveis (biopolímeros) têm atraído ainda mais a atenção dos pesquisadores devido as suas características como transportadores de fármacos, além das suas potencialidades terapêuticas e estabilidade nos fluídos biológicos (VISCIDO et al., 2014). A partir disto, muitos polímeros biodegradáveis vêm sendo utilizados e testados em diversas estratégias para aprisionar os fármacos de forma segura e eficaz, garantindo biodisponibilidade, e com responsabilidade de um controle temporal ou espacial de liberação dos ativos (MARONI et al., 2013).

Os polímeros de origem natural, animal, algas ou de origem microbiana, tais como: celulose, amido, quitosana, pectina, alginato e gomas, são testados extensivamente por serem materiais biodegradáveis e despertam interesse devido à baixa toxicidade e baixo custo. Eles têm sido largamente usados por várias décadas, atuando como excipientes em diversas formulações farmacêuticas, e a possibilidade de decomposição pelas enzimas do cólon torna possível a utilização de tais polímeros como suporte confiável na vetorização colônica, e atualmente existe uma preferência para utilização dos mesmos, pois a segurança de seu uso já está comprovada e as características de biocompatibilidade implícita em seu estado aditivo alimentar (SILVA et al., 2010; MARONI et al., 2013).

A quitosana é um desses polímeros biodegradáveis que mais desperta interesse entre os pesquisadores quando o assunto é a liberação colônica, pois é um polímero linear funcional derivado a partir da quitina, que é o polissacarídeo natural mais abundante na terra depois de

celulose, e não é digerida pelo trato gastrointestinal superior através das enzimas digestivas do ser humano. Além disso, a quitosana é um biopolímero que apresenta sítios reativos versáteis para modificações químicas, o que a insere em um conjunto de biomoléculas de grande interesse para pesquisadores de diversos ramos da ciência, uma vez que derivados de quitosana obtidos por meio dessas transformações demonstram diversas aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas (SILVA et al., 2010; GONSALVES et al., 2011).

A literatura também descreve que a quitosana age permitindo a abertura das junções oclusivas epiteliais, sendo capaz de aumentar a rota paracelular de absorção, a qual é importante para o transporte de compostos terapêuticos através da membrana. O mecanismo fundamental para este efeito promotor de absorção parece estar baseado nas cargas positivas do polímero, as quais interagem com a membrana celular resultando em uma reorganização das proteínas associadas às junções oclusivas. A quitosana possui muitas vantagens em relação a outros promotores de absorção, principalmente pela sua propriedade mucoadesiva que permite um maior tempo de residência no local de absorção. Esta habilidade foi demonstrada em células Caco-2, que funcionam como modelo de epitélio intestinal, bem como em experimentos *in vitro* em mucosas nasal, bucal, vaginal e de bexiga urinária de diferentes animais (DODANE et al., 1999; RANALDI et al., 2002).

Outro biopolímero que vêm despertando o interesse nas pesquisas é a goma guar, um polissacarídeo de origem vegetal derivada das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, da família Leguminosae. A literatura relata boa estabilidade deste ativo frente a alterações de pH, podendo estar em meios alcalinos ou ácidos sem perder suas características; e boa atividade tensoativa, principalmente quando se utiliza fármacos com baixa solubilidade em meio aquoso. Além disso, a goma guar apresenta atividade estabilizante em estudos com uso de sistemas particulados, o que desperta maior interesse em utilizar este ativo nas tecnologias de vetorização dos ativos com sistemas de partículas menores, como o do estudo em questão, utilizando micropartículas. (FREITAS, CAVALCANTI, 2004; CHIVERO et al., 2015; DODI et al., 2016).

Observando as propriedades dos dois polímeros, a quitosana e goma guar são descritas na literatura com extensas propriedades de degradação enzimática seletiva para a região do cólon, bioadesão e retenção de água, as quais são atrativas e complementares quando esses carboidratos são associados para o desenvolvimento de sistemas promissores de liberação colônica de fármacos. Além disso, a associação de goma guar e quitosana na forma de hidrogel mostrou-se resistente as condições de pH simulando o trato gastrointestinal superior, tendo

liberação controlada em condições de pH simulando o fluido intestinal (VILLANOVA, ORÉFICE, 2010; ARGIN, KOFINAS, LO, 2014; CHIVERO et al., 2015).

Associado a estes fatores que buscam melhorias na terapêutica da colite ulcerativa, e com avanços nas pesquisas utilizando micropartículas e nanopartículas com revestimento de polímeros biodegradáveis, objetivando a redução dos efeitos adversos dos medicamentos usados atualmente no tratamento da UC (COLLNOT et al., 2012), o conhecimento da força terapêutica dos esteróides que é extensivamente reconhecida, mas que sua utilização é limitada por efeitos adversos, vem em crescimento na busca de limitar estes efeitos, e os estudos estão sendo cada vez mais realizados com uso de micropartículas e nanopartículas preparadas com corticosteróides em modelos de colite experimental (VISCIDO et al., 2014; NIDHI et al., 2014).

Em revisões feitas na literatura, estudos mostraram que o uso de triancinolona, pertencente à classe dos corticosteroides, vem em crescimento, principalmente, por suas propriedades de potência terapêutica; e desde 1999 a literatura relata interesse na liberação colônica deste fármaco triancinolona (SILVA-JUNIOR et al., 2009; LOPES et al., 1999).

A triancinolona (TR) é um fármaco da classe dos corticosteroides, que apresenta longa duração de ação, e uma baixa dose para atingir seu efeito anti-inflamatório, além de, mínima retenção de sódio (UPTODATE, 2015), agindo na diminuição da inflamação por supressão da migração de leucócitos polimorfonucleares, e inversão do aumento da permeabilidade capilar, suprimindo o sistema imunológico, reduzindo a atividade e volume do sistema linfático. Suas características físico-químicas são identificadas por ser um pó muito fino, cristalino, branco, inodoro, ligeiramente higroscópico, e muito pouco solúvel em água, apresenta alta biodisponibilidade e é considerada mais potente do que a sulfassalazina para o tratamento de processos inflamatórios no cólon, como é o caso da colite ulcerativa, porém sua absorção sistêmica e liberação pré-colônica em formas convencionais de dosagem oral, são considerados fortes entraves para seu uso, pois fortes efeitos adversos acabam acometendo os indivíduos em tratamento (LOPES et al., 1999; LUCINDA-SILVA et al., 2010).

Para minimizar estes problemas de farmacocinética, o uso da triancinolona contida em micropartículas na busca de um modelo com vetorização do fármaco para o cólon, e com redução dos efeitos adversos, desperta um grande interesse para avaliar seu efeito em modelo de colite experimental (LOPES et al., 1999; LUCINDA-SILVA et al., 2010). Além disso, o uso de micropartículas biodegradáveis contendo triancinolona é considerado um novo potencial para opções de tratamento da UC, podendo proporcionar uma melhor adesão do paciente (GOMOLLON et al., 2013; SABZEVARI et al., 2013; SILVA et al., 2010).

Diante disso, um transportador de ativos com propriedades terapêuticas direcionados ao cólon, e com boas propriedades biofarmacêuticas poderia ser um grande avanço no tratamento da UC, uma vez que forneceria o ativo diretamente no cólon para atingir o sítio específico de inflamação (COCO et al., 2013; NIDHI et al., 2014).

Embora a literatura tenha demonstrado estudos que evidenciam a liberação cólon específica de sistemas particulados contendo triancinolona, as possíveis propriedades anti-inflamatórias no cólon, detém uma lacuna na literatura (VISCIDO et al., 2014; NIDHI et al., 2014), e o diagnóstico morfológico referente às possíveis ações que as micropartículas podem promover nunca foi vista em nenhum estudo.

Dessa forma, esse trabalho investigou os sistemas de distribuição de ativos de tamanho micrométrico, usando micropartículas revestidas com os biopolímeros de quitosana e goma guar, contendo como o princípio ativo a triancinolona, a fim de descobrir se o sistema poderia proporcionar uma melhora nos padrões macro e microscópicos das áreas colônicas inflamadas, bem como, redução de efeitos adversos, para conduzir uma melhor eficácia terapêutica no modelo de colite ulcerativa experimental em machos de ratos Wistar.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de micropartículas de quitosana e goma guar contendo triancinolona no modelo experimental de colite ulcerativa em ratos Wistar.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial anti-inflamatório das diferentes doses de triancinolona livre, sob aspectos macroscópicos e microscópicos do cólon de ratos submetidos a colite ulcerativa;
- Determinar a dosagem mais eficaz da triancinolona livre no tratamento de ratos submetidos a colite ulcerativa para elaboração das micropartículas;
- Avaliar a ação anti-inflamatória das micropartículas contendo triancinolona no parâmetro relacionado a atividade da colite ulcerativa experimental;
 - Avaliar o efeito das micropartículas contendo triancinolona sobre o padrão macroscópico do cólon em animais com colite ulcerativa;
 - Determinar o efeito das micropartículas contendo triancinolona sobre o padrão histopatológico do cólon em ratos submetidos a colite ulcerativa;

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A obtenção das micropartículas de triancinolona revestidas pelos biopolímeros quitosana e goma guar, foi adquirida em parceria com Departamento de Farmácia/UFRN. As micropartículas foram desenvolvidas pelo método de coacervação complexa dos polímeros quitosana e goma guar. Foram preparados duas fases, uma para cada polímero, sendo a triancinolona adicionada na fase em que está imersa a quitosana. Logo depois, houve a mistura entre as fases dos polímeros formando o complexo fármaco/polímero, e com a formação de um precipitado entre as fases pela interação do complexo polieletrólito entre os polímeros, os sistemas foram submetidos à secagem por spray drying.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 56 machos de ratos Wistar, pesando entre 250-300g, mantidos na sala de experimentação do Departamento de Morfologia da UFRN em regime controlado de temperatura (22°C) e fotoperíodo (12 h/luz/dia), recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos de acordo com a proximidade do peso em oito grupos com sete animais cada. O estudo teve início, somente, após a aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais da UFRN (CEUA), número de protocolo 002/2014.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 08 grupos no experimento, com sete animais por grupo, conforme descrito na tabela:

Grupo	Denominação	Descrição
1	Grupo Controle Negativo (-)	Sem indução da colite recebendo 1mL/dia de solução salina via oral.
2	Grupo Colite	Com indução de colite e sem tratamento.
3	Grupo Sulfassalazina	Com indução de colite e tratamento via oral com 500mg/Kg/dia de Sulfassalazina.

4	Grupo Triancinolona 5mg/Kg	livre	Com indução de colite e tratamento via oral da suspensão com 5mg/Kg/dia de Triancinolona
5	Grupo Triancinolona 10mg/Kg	livre	Com indução de colite e tratamento via oral da suspensão com 10mg/Kg/dia de Triancinolona
6	Grupo Triancinolona 15mg/Kg	livre	Com indução de colite e tratamento via oral da suspensão com 15mg/Kg/dia de Triancinolona
7	Grupo Micropartícula triancinolona	de	Com indução de colite e tratamento via oral da suspensão com 15mg/Kg/dia de micropartículas de Triancinolona
8	Grupo Biopolímeros		Com indução de colite e administração via oral do veículo contendo Quitosana e Goma guar

Tabela 01: Distribuição dos animais de acordo com o grupo experimental.

O experimento teve duração de 08 dias e a indução da colite aconteceu no terceiro dia. Os animais receberam tratamento em todos os dias do experimento, exceto no 8º dia, onde os animais foram eutanasiados através de uma overdose de xilazina (60mg/Kg de peso corpóreo) e quetamina (300mg/Kg de peso corpóreo) via intraperitoneal.

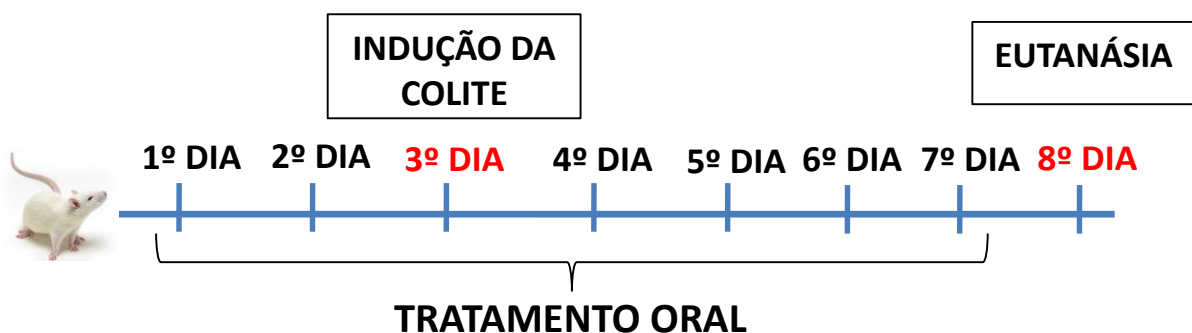


Figura 02: Desenho experimental do modelo de colite ulcerativa.

3.4 INDUÇÃO DA COLITE ULCERATIVA

A indução da colite ocorreu no terceiro dia do experimento e os animais foram mantidos em jejum por 12hs antes do procedimento. Para indução da colite aguda foi utilizado o método proposto por MacPherson e Pfeiffer (1978), e modificado por Millar et al (1996). Os animais foram previamente anestesiados com xilazina (20mg/Kg de peso corpóreo) e quetamina (100mg/Kg de peso corpóreo) via intraperitoneal, seguindo-se a inserção de um cateter de 2mm de diâmetro via retal até 8cm na altura do cólon. Com o auxílio de uma seringa foi injetado 1mL de ácido acético 4% em solução salina (0,9%), mantida no cólon por 30 segundos e posteriormente drenada. Enquanto a solução de ácido acético esteve em contato com o cólon o animal foi mantido de cabeça para baixo. Estudos recentes feitos por Minaiyan et al (2015), também seguem essa metodologia proposta.

3.5 AVALIAÇÃO DA COLITE ULCERATIVA

3.5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA

Diariamente foi realizada inspeção nos animais para verificar a presença ou ausência de diarreia, sangue nas fezes e inflamação perianal, além de acompanhamento sobre a ingestão alimentar e hídrica, a fim de inferir a variação de peso dos animais, para verificar se há a redução ou o ganho de peso. A cada dia do experimento a água era ajustada para um volume de 500mL e a ração para 200g, a fim de obter controle rigoroso de ambos os consumos.

3.5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após a eutanásia, todo o cólon dos animais foi retirado e lavado com soro fisiológico (0,9%), para limpeza do tecido removendo os restos fecais e aderências mesentéricas. Depois, o material foi colocado em uma placa de Petri para determinar o comprimento e o peso do cólon, observando a relação peso x comprimento x lesão (SALIM et al., 2013). Também foi realizado a avaliação do grau das lesões conforme o proposto por Wallace et al (1989):

- 0- Cólon normal.
- 1- Hiperemia localizada sem úlceras.
- 2- Ulceração sem hiperemia nem engrossamento da parede intestinal.

- 3- Ulceração com ponto de inflamação.
- 4- Dois ou mais sítios de ulceração e/ou inflamação.
- 5- Zonas grandes de inflamação e ulceração com uma extensão maior que 1cm.
- 6- Zonas grandes de dano tissular com uma extensão maior que 2cm adicionando 1 ponto a cada 1cm adicionais de extensão.

3.5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Após a avaliação macroscópica um fragmento do cólon foi fixado por 24hs em formalina tamponada 10% para a análise histopatológica. Após a fixação o material foi desidratado em uma série alcoólica crescente, diafanizado em xilol, impregnado e emblocado em parafina. O fragmento foi submetido a cortes de 5µm de espessura e corado por Hematoxilina e Eosina (HE). A coloração em HE possibilitou através da análise histopatológica parâmetros como: infiltrado inflamatório, ulceração, congestão vascular, edema, infiltrado transmural, hemorragia e deposição de hemossiderina. O grau de dano tecidual observado em escala microscópica foi classificado em ausente (0), leve (I), moderado (II) ou intenso (III), proposto por Salim et al (2013), e com adaptações.

3.6 CARACTERÍSTICAS DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E BIOPOLÍMEROS

3.6.1 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA

Em análises adicionais através da colaboração (Departamento de Farmácia/UFRN), foram realizados testes da cinética de liberação da triancinolona encapsulada para até 24 horas, assim como, análise do grau de intumescimento das amostras de Micropartículas e dos Biopolímeros.

A avaliação da cinética de liberação *in vitro* foi efetuada através da técnica de diálise, onde as micropartículas (triancinolona + Biopolímeros – quitosana/ goma guar) que estavam imersas em membrana de diálise devidamente selada, tiveram alíquotas de 1mL retiradas em intervalos de tempo até atingir 24 horas de estudo. As concentrações de fármaco nas alíquotas foram determinadas usando curva padrão (4 a 20 µg/mL) de triancinolona em espectrofotômetro usando metodologia validada. A porcentagem de liberação foi calculada e o perfil de liberação da triancinolona encapsula determinado (SANTOS-MAGALHÃES, 2000).

3.6.2 POTENCIAL DE INTUMESCIMENTO DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E DOS BIOPOLÍMEROS

A capacidade de intumescimento da micropartícula e dos Biopolímeros foram avaliadas pela capacidade da entrada de água por osmose em uma quantidade de amostra, também inserida dentro de uma membrana de diálise. O meio escolhido foi tampão fosfato pH 6,8 a fim de mimetizar o pH intestinal. Nos tempos pré-estabelecidos para até 24 horas, o sistema foi retirado e pesado em balança analítica (Radwag, modelo AS 220/C/2, Brasil). As medidas foram realizadas em triplicatas e representadas em porcentagem relativa em relação ao peso do sistema no tempo inicial (sem intumescimento).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos Softwares BioEstat versão 5.3 e GraphPad Prism versão 6, que possibilitaram transformar as informações obtidas em números que geraram a interpretação das análises e a criação dos gráficos. O Software Microsoft Office Excel versão 2016 foi utilizado para criação de gráfico ilustrativo. Na avaliação dos critérios de normalidade dos dados obtidos, foi realizado o teste Shapiro-wilk. Seguindo critérios de normalidade e homocedasticidade, as diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA One Way), seguida do pós-teste Tukey. Em todos os testes foi considerado o grau de significância de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA

Após a indução da colite, todos os grupos, exceto o Controle negativo, apresentaram episódios diarreicos. Nos animais dos grupos Colite, TR 5mg e TR 10mg, foram observados ainda a presença de sangue nas fezes, tendo o grupo Colite as fezes mais sanguinolentas e diarreicas, seguido do grupo TR 5mg. Os animais dos grupos SSZ, TR 15mg, Micropartícula TR e Biopolímeros apresentaram episódios diarreicos discretos quando comparado aos demais grupos e, além disso, não foi observado presença de sangue nas fezes, sugerindo melhor atividade desses últimos tratamentos descritos no combate a lesão induzida.

Na avaliação da ingestão hídrica houve diferença estatística ($p > 0,05$) do consumo apenas entre os grupos Controle negativo (133mL) e Colite (67mL). Esses dados expressos em percentual representam, respectivamente, 26% e 13% de 500mL da água ofertada. Entre os demais grupos a ingestão hídrica foi semelhante, sendo SSZ - 87mL (17,4%), TR 5mg - 84mL (16,8%), TR 10mg - 88mL (17,6%), TR 15mg - 85mL (17%), Micropartícula TR - 95mL (19%) e Biopolímeros - 113 mL (22%) - (gráfico 01).

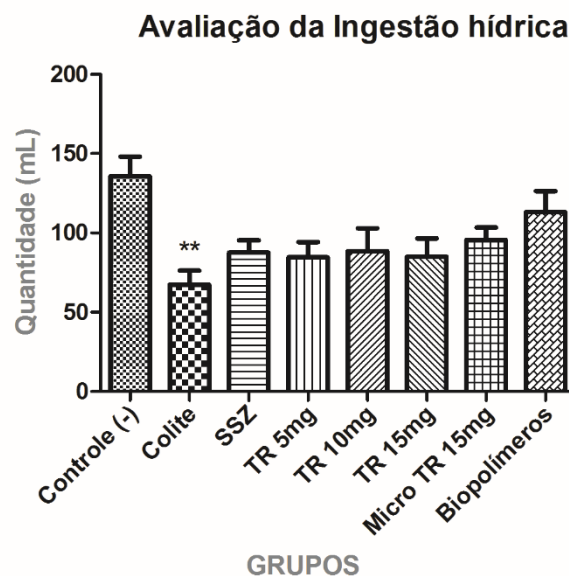


Gráfico 01: Avaliação da Ingestão hídrica dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos controle e colite ($p < 0,01$).

A ingestão alimentar apresentou variações entre os grupos, onde os animais que receberam tratamento com TR 5mg e TR 10mg consumiram juntos cerca de 61 a 68 gramas de ração ofertada por dia (200g/dia), o que levou a estes grupos apresentarem uma perda de peso equivalente a 25% e 22%, respectivamente. Os animais dos grupos TR 15mg e SSZ tiveram perda de peso equivalente a 21% e 18%, e consumiram 74 e 56 gramas de ração, respectivamente. A menor variação de peso foi observada nos animais dos grupos Micropartículas TR (13%), Biopolímeros (9%) e Controle negativo (3%), tendo o consumo de ração valores mais elevados: 77g, 89g e 104 gramas, respectivamente. Houve diferença estatística ($p>0,05$) na perda de peso do grupo Controle negativo com os demais grupos, com exceção do grupo dos Biopolímeros. Entre os grupos tratados com Triancinolona, houve diferença estatística quando o tratamento foi feito com triancinolona encapsulada comparado a sua forma livre ($p>0,05$), onde a micropartícula reduziu entre 8% a 12% a perda de peso, evidenciando redução desse efeito adverso com a utilização da nanotecnologia – (gráfico 02).

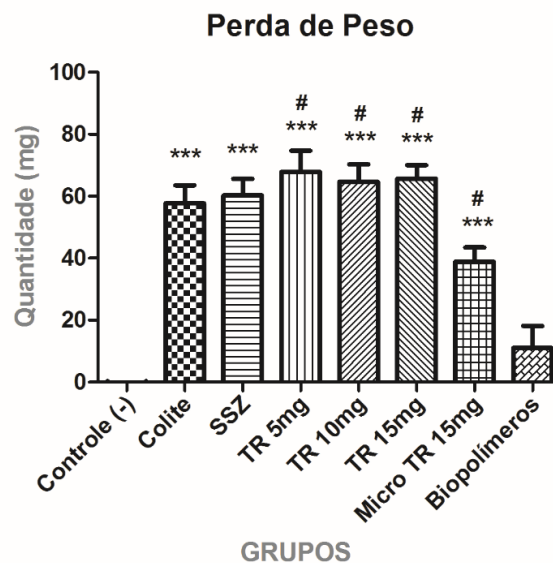


Gráfico 02: Avaliação da Perda de peso dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (***) : diferença estatística entre os grupos Controle negativo *vs* Colite, *vs* SSZ, *vs* TR (5, 10 e 15mg) e *vs* Micropartículas TR ($p<0,01$). (#) : diferença estatística entre os grupos Micropartículas e os grupos TR (5, 10 e 15mg) ($p>0,05$).

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica foi feita através de duas análises. A primeira refere-se à relação do peso (g) x comprimento (cm) do cólon, onde quanto maior o peso do tecido, maior

é a lesão e menor é o seu comprimento. Os animais dos grupos com menor valor dessa proporção, indicavam uma melhora nas condições de saúde, sugerindo para aqueles animais dos grupos tratados, que o ativo utilizado estava tendo ação anti-inflamatória e protetora no tecido. Foi possível notar que o grupo Controle negativo seguiu o padrão esperado com o menor resultado da relação peso(g)/comprimento(cm), sendo este valor 0,13, assim como, o grupo Colite que apresentou o maior valor 0,21 peso(g)/comprimento(cm) . Entre os tratamentos, os grupos TR 15 mg, TR 10 mg e Micropartícula TR obtiveram padrão semelhante desta relação, sendo, respectivamente, 0,13, 0,14, e 0,14, sugerindo menor dano tissular. O grupo TR 5mg apresentou dentre os tratamentos a maior relação peso x comprimento, sendo esta 0,19. Através desses resultados foi possível observar que o modelo de indução a colite foi efetivo, e a dose de Triancinolona 5mg sugeriu não atingir efeito terapêutico no combate a lesão – (gráfico 03).

Os grupos tratados com SSZ (0,17) e Biopolímeros (0,17) obtiveram um resultado intermediário nesta análise. No gráfico abaixo temos a relação peso(g)/comprimento(cm) do cólon dos animais, onde foi observado que o grupo Controle negativo diferiu estatisticamente apenas dos grupos Colite e TR 5mg ($p < 0,01$).

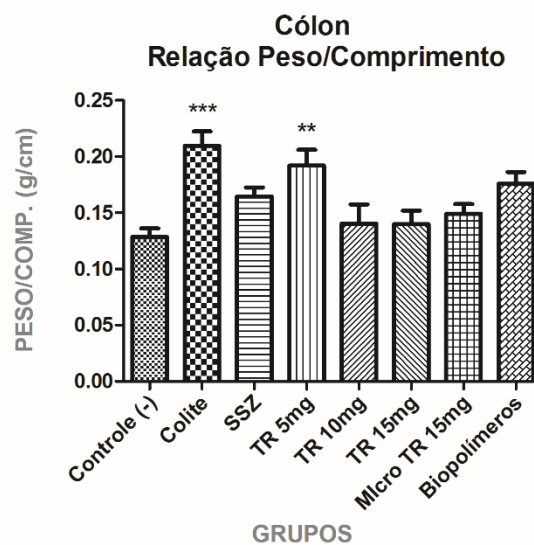


Gráfico 03: Relação peso (g) x comprimento (cm) do Cólon dos animais dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5, 10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (**): diferença estatística entre os grupos Controle negativo e TR 5mg ($p < 0,01$); (**): diferença estatística entre os grupos Controle negativo e Colite ($p < 0,01$).

Em relação a análise macroscópica, o grupo Controle negativo seguiu os parâmetros esperados sem a presença de nenhuma lesão tecidual. O grupo Colite e TR 5mg apresentaram

as maiores lesões, com escore 7,3 e 7,1, respectivamente. O grupo TR 10 mg apresentou escore 4,4, e os grupos Sulfassalazina, TR 15mg e Micropartícula TR, apresentaram respectivamente escores 3,2, 3,3 e 3,7, onde foi evidenciado a redução de danos tissulares com a extensão da lesão menor que 2 cm. Os Biopolímeros apresentaram o menor escore (2,7) quando comparado aos grupos que receberam tratamento, sugerindo que os compostos utilizados apresentam possíveis ações de proteção ao tecido (figura 03).

Nas figuras abaixo foram identificadas alterações como: (A) Grupo Controle negativo, cólon dentro dos padrões de normalidade; (B) Colite, partes enegrecidas observando a presença de necrose tecidual e lesão grave + espessamento de parede intestinal; (C) SSZ, presença de regiões com hiperemia; (D) TR 5mg, presença de região necrosada representando área de lesão; (E) TR 10 mg, presença de região com extensa hiperemia, e foco de ulceração; (F) TR 15 mg, presença de região com hiperemia + pequeno foco de ulceração; (G) Micropartícula TR, presença de hiperemia + discreto espessamento da parede intestinal + foco de ulceração; (H) Biopolímeros, presença de regiões com hiperemia discreta.

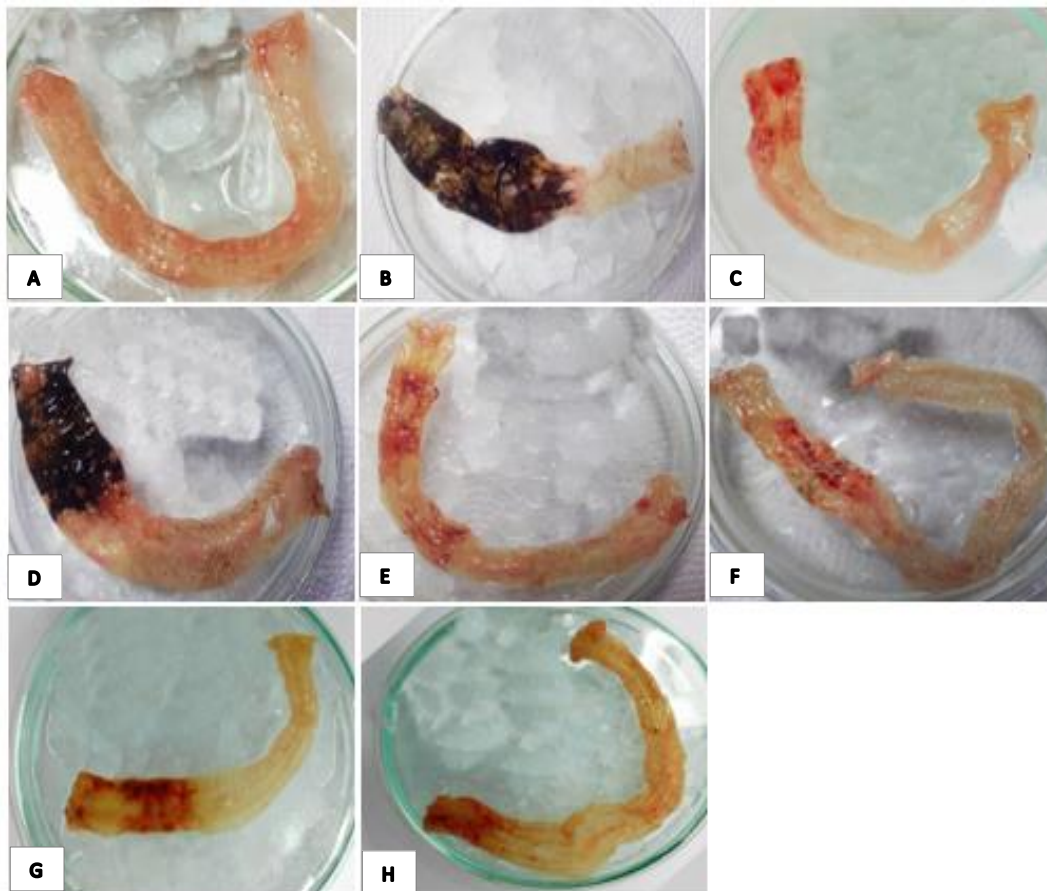


Figura 03: Imagens macroscópicas dos graus de lesão do cólon nos diferentes grupos experimentais. (A) Grupo Controle negativo; (B) Colite; (C) SSZ; (D) TR 5mg; (E) TR 10 mg; (F) TR 15 mg; (G) Micropartícula TR; e (H) Biopolímeros.

Houve diferença estatística do grupo Controle negativo quando comparado aos grupos (gráfico 04) Colite, TR 5 mg, TR 10 mg, TR 15 mg e Micropartícula TR com valor de $p < 0,01$. O grupo SSZ e Biopolímeros não diferiram do grupo Controle negativo. Quando analisado o grupo Colite (gráfico 05) comparando-o com os demais grupos que receberam tratamento, foi possível notar diferença estatística com os grupos SSZ, TR 15 mg e Micropartícula TR, ambos $p < 0,05$ e Biopolímeros $p < 0,01$; sugerindo que o tratamento padrão com SSZ apresentou atividade anti-inflamatória e protetora esperada. A Triancinolona livre na dose de 15mg e a Triancinolona encapsulada apresentaram potencial efeito anti-inflamatório, e os Biopolímeros surpreenderam, demonstrando que provavelmente existiu uma via de proteção ao tecido para reduzir a lesão macroscópica. Em análise adicional o tratamento padrão SSZ comparado aos grupos TR 5, 10, 15mg, Micropartícula TR e Biopolímeros, diferiu estatisticamente apenas do grupo TR 5mg $p < 0,05$.

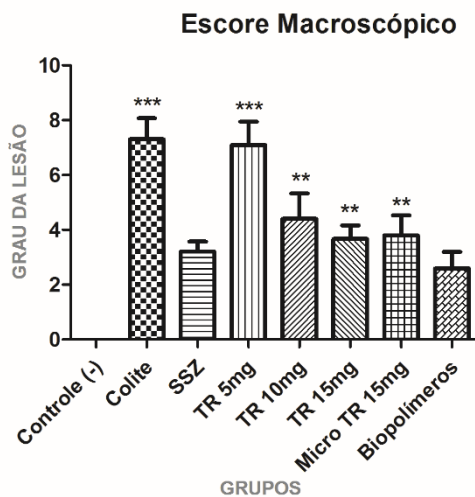


Gráfico 04: Escore macroscópico dos grupos Controle (-), Colite, SSZ, TR 5;10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (***) : diferença estatística entre os grupos Controle (-) vs Colite, vs TR 5mg ($p < 0,01$); (**): diferença estatística entre os grupos Controle (-) vs TR 10, vs 15mg e vs Micropartícula TR ($p < 0,01$).

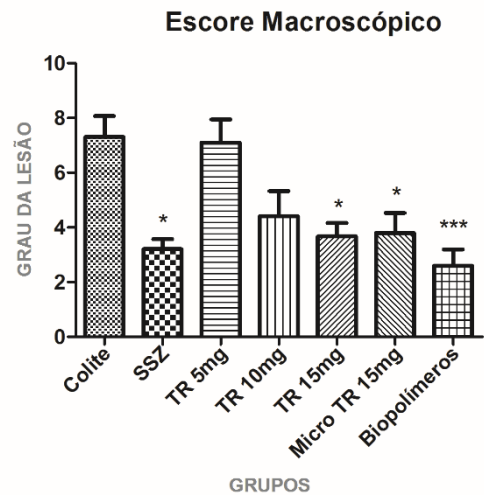


Gráfico 05: Comparação do escore macroscópico do grupo Colite com os grupos SSZ, TR 5;10 e 15 mg, Micropartículas TR e Biopolímeros. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e analisados utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. (***) : diferença estatística entre os grupos Colite e Biopolímeros ($p < 0,01$); (*): diferença estatística entre os grupos Colite vs SSZ, vs TR 15mg e vs Micropartículas TR ($p < 0,05$).

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Através da análise das lâminas coradas por HE foi observada presença ou ausência de ulceração, deposição de hemossiderina, congestão vascular, edema, infiltrado inflamatório, infiltrado transmural e hemorragia (figura 04). A avaliação histopatológica mostrou que o grupo Controle negativo não apresentou alteração tecidual, enquanto que o grupo Colite obteve lesões mais severas. O modelo de indução da colite ulcerativa por ácido acético foi eficaz, uma vez que os resultados referentes aos grupos Controle negativo e Colite mostraram diferenças significativas (BEHERA et al., 2012) em todas as análises anteriores, reafirmando-se nessa análise.

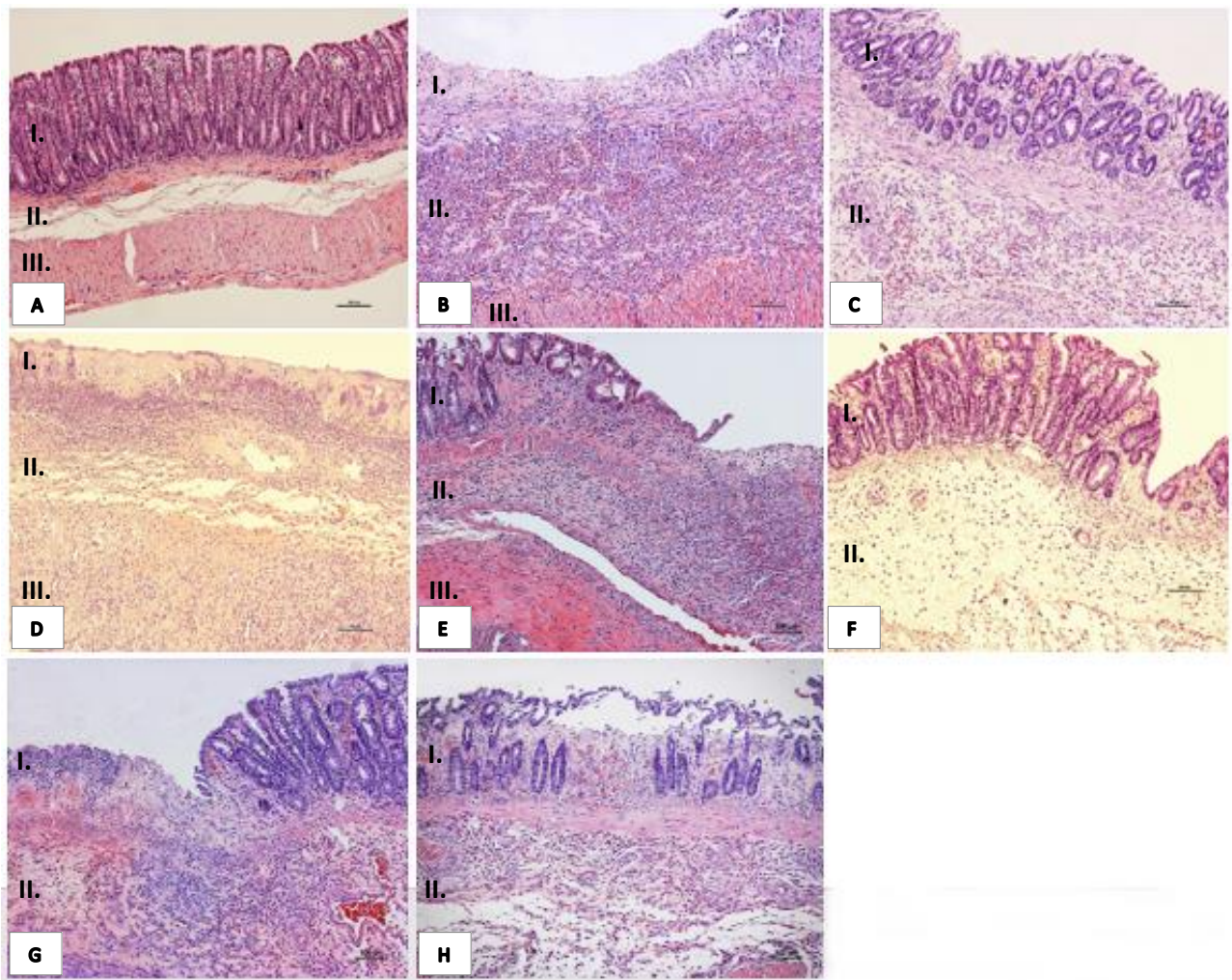


Figura 04: Fotomicrografias do cólon de animais submetidos a colite ulcerativa induzida por ácido acético. I. Camada Mucosa, II. Camada Submucosa, III. Camada Muscular. (A) Grupo Controle negativo; (B) Colite; (C) SSZ; (D) TR 5mg; (E) TR 10 mg; (F) TR 15 mg; (G) Micropartícula TR; e (H) Biopolímeros. Aumento de 100x.

Nas fotomicrografias foram descritas alterações como: (A) Grupo Controle negativo, cólon dentro dos padrões de normalidade em todas as camadas I, II e III; (B) Colite, destruição da camada de revestimento epitelial (I) + intenso infiltrado inflamatório + hemorragia na camada II + infiltrado transmural e hemorragia na camada III; (C) SSZ, recuperação do epitélio (I) + redução do infiltrado inflamatório na camada II + menor lesão nas camadas do cólon ; (D) TR 5mg, intensa necrose nas camadas I e II + infiltrado transmural (III); (E) TR 10 mg, presença de região com ulceração + início de reparo da lesão (I) + infiltrado inflamatório na camada II; (F) TR 15 mg, presença de região com reparo epitelial (I); (G) Micropartícula TR, presença de região com ulceração + início de reparo da lesão (I) + infiltrado inflamatório na camada II ; (H) Biopolímeros, presença de região com reparo epitelial (I) + menor lesão nas camadas do cólon. As imagens foram capturadas em aumento de 100x, com barra padrão de 100 µm.

As pontuações microscópicas de cada grupo, relacionadas com as secções histopatológicas do cólon, estão descritas na tabela 02.

Grupos	Ulceração	Hemossiderina	Congestão Vascular	Edema	Infiltrado Inflamatório	Infiltrado Transmural	Hemorragia
Controle (-)	0	0	0	0	0	0	0
Colite	+++	+++	++	++	+++	++	+++
SSZ 500 mg	+	+	+	++	++	+	+
TR 5 mg	+	++	++	+++	+++	++	++
TR 10 mg	++	+	++	++	++	+	++
TR 15 mg	+	+	0	+	+	+	+
Micro TR 15mg	++	++	+	++	++	++	++
Biopolímeros	+	++	0	++	++	+	+

Tabela 02: Efeito da colite ulcerativa experimental nos grupos tratados com SSZ, TR livre, Micropartícula TR e Biopolímeros sobre a pontuação microscópica do cólon de ratos com UC induzida por ácido acético. 0: normal; +: leve; ++: moderado; severo: +++.

Pontuações microscópicas das secções histopatológicas que apresentaram menor grau de intensidade sugerem ação protetora e restauradora dos fármacos (SALIM et al., 2013), mostrando que a dose de 15 mg da triancinolona apresentou uma melhor ação protetora quando comparada com as doses de 5 mg e 10 mg, sugerindo uma ação dose dependente (UPTODATE, 2015). Resultados similares à dose da TR 15mg foram observados nos animais tratados com

SSZ. Grupos que receberam Biopolímeros demonstraram um tecido com dano reduzido, sugerindo ação protetora desses compostos, já os tratados com Micropartículas obtiveram um dano superior, o que poderá ser explicado pela liberação parcial do fármaco encapsulado, gerando um dano semelhante ao grupo TR 10mg.

4.4 CARACTERÍSTICAS DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E BIOPOLÍMEROS

A Micropartícula TR foi avaliada no parâmetro relacionado a cinética de liberação do fármaco, uma vez que foi proposto a vetorização do fármaco ao cólon de maneira específica e controlada, bem como, sobre a análise do intumescimento que foi realizada também com os Biopolímeros.

4.4.1 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA

Relacionado a cinética de liberação foi observado que em 24 horas após administração da dose de Micropartícula TR 15mg, apenas 69% do fármaco tinha sido liberado para ação farmacológica, e isso corresponde a 10mg do ativo. Em 1 hora houve liberação de 22% (3,3mg) do fármaco, e em 3 horas 39% (5,8mg). Esse resultado evidencia que a Micropartícula TR liberou em 24 horas dose equivalente ao tratamento com fármaco livre 10mg, e apresentou em seus resultados uma redução do efeito adverso da perda de peso superior ao fármaco livre em todas as doses, apesar do efeito no tratamento ter sido semelhante ao fármaco livre na mesma dose de 10mg.

4.4.2 POTENCIAL DE INTUMESCIMENTO DA TRIANCINOLONA ENCAPSULADA E DOS BIOPOLÍMEROS

A análise de intumescimento entre os grupos Micropartícula TR e Biopolímeros demonstrou que em 3 horas houve aumento de volume da amostra de Micropartícula em 29% e de Biopolímeros em 19%. Essa análise repensa a ideia de que o aumento de volume estava relacionado a proteção do tecido no qual foi induzido a lesão, uma vez que o grau da lesão nos grupos dos Biopolímeros foi inferior ao grupo da Micropartícula TR, porém instigou o direcionamento da pesquisa para investigar o provável aumento da mucoadesão como mecanismo de proteção do tecido.

5 DISCUSSÃO

A Colite Ulcerativa é o subtipo, dentre as doenças inflamatórias intestinais, mais encontrado na prática clínica, e é caracterizada por uma inflamação crônica da mucosa, diarreia com presença de sangue e dor abdominal (CARBONELL et al, 2016). A Colite Ulcerativa induzida por ácido acético em ratos é um modelo experimental facilmente reproduzível e eficaz pelo fato de causar lesões na mucosa semelhante à encontrada em humanos, devido à inflamação e produção de espécies reativas de oxigênio (BEHERA et al, 2012).

O modelo experimental de colite ulcerativa foi avaliado através da atividade da doença, além da análise macro e microscópica. O presente estudo confirmou que esse modelo experimental induzido pelo ácido acético é um método eficaz para estudar a doença, pois ambos os resultados macro e microscópicos mostraram que o enema de ácido acético a 4% causa um processo inflamatório difuso, agudo e necrosante, o que corrobora com os estudos de Fedorak et al (1995), Souza et al (2007) e Anzoise et al (2016). A ação de neuropeptídios sobre a apoptose e dano oxidativo na colite experimental em ratos também foi evidenciada (AKCAN et al, 2008).

Através desse modelo, os resultados referentes aos grupos Controle negativo e Colite, mostraram diferenças estatísticas entre si, e entre os demais grupos nas análises experimentais. O uso da SSZ como fármaco padrão obteve resultados satisfatórios, apresentando baixo grau da lesão na análise macroscópica, presença de diarreia leve sem sangue, além de, discreto dano tecidual encontrado na análise histopatológica, evidenciando que o fármaco padrão tem ação no tratamento da colite ulcerativa como mostra a literatura (BRASIL, 2002).

A escolha da triancinolona se deve a sua alta potência terapêutica, além de, sua boa ação de atividade biológica que dura entre 12 e 36 horas (SILVA et al, 2006). A sua forma encapsulada, através de micropartículas poliméricas, como alternativa terapêutica para o tratamento da UC, foi descrita por Sabzevari et al (2013). Neste estudo, os pesquisadores avaliaram o uso do corticoide, Triancinolona, com nanopartículas biodegradáveis, a fim de evidenciar a nanotecnologia como uma estratégia em potencial para opções de tratamento tópico, proporcionando uma melhor adesão do paciente, uma vez que estudos realizados por Dewulf et al (2007) mostraram que 15% dos pacientes com UC não utilizam o medicamento prescrito, 13% não fazem uso do medicamento na quantidade recomendada que podem ser causados por problemas de esquecimento do horário, e 63% não aderem ao tratamento. Esses pacientes tem o risco de recidiva de 61% em contraposição de apenas 11% dos aderentes a terapia, e no que se refere ao câncer de cólon, os não aderentes têm o risco aumentado (31%),

enquanto que os aderentes apresentam riscos de apenas 3%. Os problemas relacionados a não adesão ao tratamento se dão, principalmente, devido as doses do fármaco padrão (SSZ) que necessitam de no mínimo 2 gramas/dia para manter o paciente no estado de remissão (KALINKOVA et al, 2001).

Nos parâmetros relacionados a atividade da doença, foi avaliado entre os grupos tratados a presença de diarreia, o consumo de água (ingestão hídrica) e de ração, a qual essa última relaciona-se a perda de peso. Os animais tratados com SSZ, apresentaram diarreia leve ou ausência desse sintoma, evidenciando a atividade do fármaco (BRASIL, 2002). A ingestão hídrica dos animais transcorreu normalmente, porém na análise do consumo de ração foi observado que os animais tratados com SSZ apresentaram perda de peso evidente. A literatura já elucida que um dos efeitos adversos ao uso do fármaco padrão, sulfassalazina, é a perda de peso e em casos graves há evolução para anorexia (NACC, 2011; PONTTE et al., 2010).

Os grupos tratados com Triancinolona livre, apresentaram na dose de 15mg o melhor resultado quando comparado com as doses de 5 e 10mg, lembrando que as doses terapêuticas utilizadas para Triancinolona podem variar de 4 a 40mg/dia (CAMPAGNOLO et al, 2008; KIM et al, 2016). Nesse grupo de tratamento (TR 15mg) foi observado diarreia leve ou ausência desse sintoma, corroborando com estudos de Lucinda-Silva, Salgado e Evangelista (2010) que relataram a Triancinolona como fármaco de maior potência farmacológica quando comparada a sulfassalazina, que atualmente é considerada o fármaco mais utilizado para o tratamento de colite ulcerativa. Estudos de Campagnolo (2008) e Fedorak et al (1995), reforçam também que os glicocorticoides, classe terapêutica da Triancinolona, participam como uma das principais linhas de escolha na terapia da doença inflamatória intestinal humana, tendo eficácia e bons resultados quando utilizadas para tratamento da UC. Quando avaliado a perda de peso, todos os grupos tratados com Triancinolona livre apresentaram essa característica, assim como é relatada na literatura (RENAME, 2010). Estudos realizados com outro fármaco, a Dexametasona, pertencente a mesma classe da triancinolona, mostraram que o mesmo não foi capaz de reduzir o parâmetro da perda de peso em ratos com colite ulcerativa induzida por ácido acético a 4% (MINAIYAN, 2015).

No tratamento realizado com Micropartícula TR, foi observado padrão de diarreia semelhantes as encontradas nos grupos TR 15mg e SSZ, bem como a não alteração da ingestão hídrica. Entretanto, a perda de peso reduziu significativamente com o uso do fármaco encapsulado, onde de acordo com literatura o desenvolvimento de um sistema de distribuição direcionado para mucosa do cólon apresenta vantagens como alta concentração de fármaco no órgão alvo com menor potencial para os efeitos adversos (CAMPAGNOLO, 2008). Estes

achados sugerem que a terapêutica via utilização da nanotecnologia foi capaz de levar mais fármaco para o local da lesão, reduzindo um dos principais efeitos adversos, a perda de peso, provocada pelo uso da triancinolona, e Sulfassalazina - fármaco padrão utilizando no tratamento da UC (THORENSEN, CULLEN, 2007).

Em 2008 estudos de McConnell et al investigaram a fisiologia intestinal para ampliar o conhecimento sobre a entrega de fármacos na região intestinal, e correlacionado a esse estudo Lucinda-Silva, Salgado e Evangelista (2010) publicaram um artigo para descrever a liberação controlada através de sistemas multiparticulados de Triancinolona pelo trato gastrointestinal. Esses estudos impulsionaram as pesquisas, no sentido de avaliar a atividade da triancinolona frente a uma lesão intestinal, uma vez que os achados atuais relatam apenas sobre a liberação modificada do fármaco no trato gastrointestinal sem avaliar a atividade do mesmo em doenças relacionadas ao cólon.

O grupo de animais que recebeu tratamento com Biopolímeros (quitosana/goma guar) não obteve diferença na ingestão hídrica quando comparado aos demais grupos, e a diarreia presente foi discreta. Em relação ao parâmetro perda de peso, este grupo apresentou os menores índices de perda de peso quando comparado com os demais tratamentos. Para elucidar esses achados, Argin et al (2014) mostraram que a Quitosana e a Goma guar apresentam propriedades de degradação enzimática seletiva para a região do cólon, mucoadesão, retenção de água, resistência às condições ácidas do TGI superior. Além disso, os estudos de Yang et al (2011) descreveram sobre a atividade antimicrobiana da Quitosana. Nesse sentido, a soma desses fatores pode ter amenizado a lesão induzida por ácido acético no modelo de colite ulcerativa, melhorando o estado geral do animal, uma vez que o tratamento não faz uso de fármacos que apresentam como principais efeitos adversos a perda de peso. As vantagens da associação entre Quitosana e Goma guar vão além, onde estudos de Haupt et al (2006), distinguiram a potencialização da atividade mucoadesiva e biodegradável entre os biopolímeros, tendo a Quitosana maior propriedade mucoadesiva no cólon e a Goma guar melhor ação biodegradável de maneira cólon específica.

Relacionada a propriedade mucoadesiva, tem-se que a mucoadesão de qualquer ativo aumenta o tempo de residência numa dada zona do tecido, proporcionando melhor absorção dos ativos e atuação tópica (VARUM, 2008). Estudos mostram que a Quitosana apresenta alta bioadesão, principalmente, quando utilizada em proporções maiores do que outros polímeros do sistema (HAUPT et al, 2006). Esses achados revelam algumas vantagens dos biopolímeros quando comparado as Micropartículas. Vale salientar que no presente estudo foi utilizada proporções iguais de Biopolímeros (Quitosana/Goma guar) nos dois tratamentos. No entanto,

o fato de ter um fármaco inserido no meio polimérico pode ter modificado a ação dos compostos devido as interações químicas. Dessa forma, os Biopolímeros que continham a Quitosana de maneira “livre”, apenas interagindo com a Goma guar podem apresentar atividade mucoadesiva mais potente. Estudos de Haupt et al (2006), que utilizaram biopolímeros de Quitosana e Goma guar para liberação colônica de Celecoxibe, corroboraram para compreender sobre a melhor atividade mucoadesiva quando há Quitosana em maiores proporções sem uso do fármaco, tendo a Goma guar, quando utilizada na formulação com fármacos, a principal função de auxiliar o sistema a ser biodegradado pelas enzimas atuantes no cólon, garantindo a liberação de fármacos imersos em sistemas de liberação modificados.

Assim, com base na literatura supracitada foi possível compreender que o dano no cólon foi menor no grupo que recebeu o tratamento com os Biopolímeros, pela possível ação protetora da Quitosana. A dose de Triancinolona demonstrou maior eficácia quando utilizado 15mg do fármaco, e por isso a escolha de ter encapsulado 15mg de Triancinolona, desenvolvendo a Micropartícula polimérica. A atividade da Micropartícula neste parâmetro macroscópico foi discretamente superior a dose de 10mg da Triancinolona, sugerindo também atividade dos biopolímeros neste sistema.

Na análise histopatológica, os menores danos tissulares foram observados nos animais tratados com a Triancinolona, graças ao efeito anti-inflamatório já conhecido na literatura. As micropartículas demonstraram padrão semelhante a encontrada na dose de 10 mg de triancinolona livre, uma vez que foi liberado em 24 horas a mesma concentração de fármaco. Já os biopolímeros apresentaram um padrão de recuperação do tecido importante, sugerido, principalmente, pelas propriedades da Quitosana de mucoadesão e atividade antimicrobiana.

Os resultados apresentados e discutidos que tiveram como base o estudo da atividade da doença, além das análises macro e microscópicas, investigaram a lacuna encontrada na literatura sobre a entrega de fármaco cólon específica frente a lesões induzidas neste local. Assim, esse estudo pôde fornecer subsídios, que podem ajudar a alavancar e possibilitar melhorias nessa linha de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

As micropartículas contendo Triancinolona demonstraram a partir da nanotecnologia, melhorias nos aspectos relacionados a redução dos efeitos adversos dos fármacos quando administrados na sua forma livre:

- O potencial anti-inflamatório das diferentes doses de triancinolona livre, foi melhor quando utilizada 15mg do fármaco sob todos os aspectos: macro e microscópicos do cólon, e atividade da doença, no modelo de colite ulcerativa experimental.
- As análises para 10mg de Triancinolona demonstraram efeito intermediário, sendo a dose de 5mg sugestiva para ação sub terapêutica nesta doença, uma vez que não foi evidenciado atividade de combate a lesão;
- As Micropartículas contendo triancinolona foram teoricamente produzidas para liberação de 15mg do fármaco em 24 horas. Apesar da liberação ter ocorrido em apenas 69% do ativo nas 24 horas, os parâmetros macro e microscópicos, e a atividade da colite ulcerativa experimental, foram amenizadas, e observou-se um excelente potencial efeito anti-inflamatório;
- Estudos para melhorar a cinética de liberação da Triancinolona encapsulada seriam de grande importância, pois poderiam otimizar o potencial efeito anti-inflamatório da Micropartícula frente a lesão tecidual;
- Os Biopolímeros de Quitosana e Goma guar surpreenderam, demonstrando atividade de combate a lesão no cólon reduzindo danos macroscópicos, sugeridos, pela ação protetora e de mucoadesão dos compostos;
- Estudos para investigar formulações de Biopolímeros buscando otimizar esses compostos seriam de interesse para a literatura, uma vez que são compostos de origem natural, e com custos reduzidos.

REFERÊNCIAS

- AKCAN, A. et al. Ameliorative effects of bombesin and neurotensin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis, oxidative damage and apoptosis in rat. **World J Gastroenterol**, v. 8, p. 1222-1230, 2008.
- ALGIERI, F. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitro benzene sulphonic acid model of rat colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 750–759, 2013.
- ANZOISE, M. L. et al. Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.194, p. 137–145, 2016.
- ARGIN, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically cross linked xanthane chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal Conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p.138-144, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE COLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN. **O que é colite?** Disponível em: <<http://www.abcd.org.br/coliteulcerativa.asp>>. Acesso em 10 mai. 2014.
- BEHERA, J. P. et al. Effect of aqueous extract of *Aegle marmelos* unripe fruit on inflammatory bowel disease. **Indian J Pharmacol**, v. 5, p. 614-618, 2012.
- BENETTON, C. A. et al. Colite Ulcerativa e Antioxidantes. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v. 3, p. 1-6, 2008.
- BERNSTEIN, C.N. et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, p. 112-124, 2010.
- BRASIL, PORTARIA SAS/MS. Retocolite Ulcerativa. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – Medicamentos Excepcionais**, nº 861, p. 557-562, de 04 de novembro de 2002.

CAMPAGNOLO, A. M. et al. Injeção de corticosteroide em patologias vocais inflamatórias crônicas, revisão da literatura. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v.74, p. 926–932, 2008.

CARBONELL, F. et al. Methotrexate Is Not Superior to Placebo for Inducing Steroid-Free Remission, but Induces Steroid-Free Clinical Remission in a Larger Proportion of Patients With Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, v.150, p. 380–388, 2016.

CHIVERO, P. et al. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. **Food Research International**, v.70, p. 7-14, 2015.

COCO, R. et al. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: Comparison of different strategies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 3-12, 2013.

COLE, A. T.; HAWKEY, C. J. Treatment of inflammatory bowel disease from now to the millennium. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**, v. 8, p. 351-379, 1994.

COLLNOT, E. M. et al. Nano-and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **J. Control. Release**, v. 161 (2), p. 235–246, 2012.

DEWULF, N. L. S.; MONTEIRO, R. A.; PASSOS, A. D. C.; VIEIRA, E. M.; TROCON, L. E. A. Adesão ao tratamento medicamentoso de pacientes com doenças inflamatórias intestinais acompanhados no ambulatório de um hospital universitário. **Arq. de Gastroenterologia**, v. 44, p. 289-96, 2007.

DIÓGENES, A. H. M. et al. Doença Inflamatória Intestinal com Gangrena Cutânea Mimetizando a Poliarterite Nodosa. **Rev Bras Reumatol**, v. 43, p. 334-336, 2003.

DODANE, V., KHAN, M. A., MERWIN, J. R., Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v.182, p.21-32, 1999.

DODI, G. et al. Carboxymethyl guar gum nanoparticles for drug delivery applications: preparation and preliminary in-vitro investigations. **Materials Science and Engineering: C**, v.63, p. 628-636, 2016.

FEDORAK, R. N.; HAEBERLIN, B.; EMPEY, L. R.; CUI, N.; NOLEN, H.; JEWELL, L. D.; FRIEND, D. R. Colonic Delivery of Dexamethasone From a Prodrug Accelerates Healing of Colitis in Rats Without Adrenal Suppression. **GASTROENTEROLOGY**, v.108, p. 1688-1699, 1995.

FORD, A. C. et al. Efficacy of Topical 5-Aminosalicylates in Preventing Relapse of Quiescent Ulcerative Colitis: A Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 513–519, 2012.

FREITAS, A. B. R., CAVALCANTI, O. A. Goma guar como Excipiente em Matrizes Hidrofilicas: Avaliação do Índice de Hidratação. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, p. 334-338, 2004.

GEDIIB, GRUPO DE ESTUDOS DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL. **Tratamento clínico das DIIs**. Disponível em: <<http://gediib.org.br/?artigos&pagina.asp>>. Acesso em 11 mai. 2014.

GOMOLLON, F., et al. The GETECCU clinical guideline for the treatment of ulcerative colitis: A guideline created using GRADE methodology. **Gastroenterol Hepatol**, v. 36, p. 483.e1–483.e46, 2013.

GONSALVES, A. A. et al. DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A RETICULAÇÃO DE QUITOSANA. **Quim. Nova**, v. 34, p. 1215-1223, 2011.

GUPTA, R. B. et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology**, p. 133-139, 2007.

HANSEN, R. et al. Inflammatory bowel disease. **Symposium: Gastroenterology**, v.20, p. 473-478, 2010.

HAUPT, S. et al. Luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal cancer. **European journal of pharmaceutical sciences**, v.28, p. 204–211, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **O Trato Digestivo**, Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 307, 2013.

KALINKOVA, G.; KANE, S. V.; COHEN, R. D.; AIKENS, J. E. B. Predictors of non-compliance with mesalamine in quiescent ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol.**, v. 96, p. 2929–2932, 2001.

Ke, F. et al. Herbal Medicine in the Treatment of Ulcerative Colitis. **Saudi J Gastroenterol**, v. 18, p. 3-10. 2012.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 12, p. 319-330, 2010.

KIM, Y. S. et al. Comparison of high- and low-dose intra-articular triamcinolone acetonide injection for treatment of primary shoulder stiffness: a prospective randomized trial. **J Shoulder Elbow Surg**, p. 1-7, 2016.

LAUTENSHLAGER, C., et al. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2014.

LAUTENSHLAGER, C., et al. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 2013.

LOPES, H.; CURADO, A. Terapêutica farmacológica da Colite Ulcerosa. **Normas de Orientação Clínica**, v. 16, p. 140-141, 2009.

LUCINDA-SILVA, R.M.; SALGADO, H. R. N.; EVANGELISTA, R.C. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. **CARBOHYDRATE POLYMERS**. v. 81, p. 260 – 268, 2010.

MCCONNELL, E. L. et al. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.364, p. 213–226, 2008.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, p. 135-150, 1978.

MARONI, A. et al. Film coatings for oral colon delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, p. 372– 394, 2013.

MEIER, J.; STURM, A. Current treatment of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v. 17, p. 3204-3212, 2011.

MILLAR, A. D. et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease in a rat model of colitis. **Gut**, v. 39, p. 407-415, 1996.

MINAIYAN, M. et al. Evaluation of anti-colitic effect of fluvoxamine against acetic acid-induced colitis in normal and reserpinized depressed rats. **European Journal of Pharmacology**, v.746, p. 293–300, 2015.

NACC: NATIONAL ASSOCIATION FOR COLITIS AND CROHN'S DISEASE. **Inflammatory Bowel Disease Basics**. Disponível em: <
<http://www.nacc.org.uk/content/ibd.asp> >. Acesso em 09 mai. 2014.

NACC: NATIONAL ASSOCIATION FOR COLITIS AND CROHN'S DISEASE. **Drugs used in IBD**. 4ed. Inglaterra: NACC, 2011.

NIDHI et al. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, p. 1-14, 2014.

NIEMINEN, U.; JUSSILA, A.; NORDLING, S.; MUSTONEN, H.; FARKKILA, M. A. Inflammation and disease duration have a cumulative effect on the risk of dysplasia and carcinoma in IBD: a case-control observational study based on registry data. **Int .J. Cancer**, p. 134-189, 2014.

OLIVEIRA, F. M. et al. Aspectos epidemiológicos das doenças intestinais inflamatórias na macrorregião de saúde leste do Estado de Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p.1031-1037, 2010.

PAIM, S. M. M. et al. Características dos portadores de retocolite ulcerativa cujos sintomas se iniciaram após os 50 anos de idade. **GED**, v. 28, p. 73-77, 2009.

PONTTE, A. C. A. et al. Consensus Guidelines For The Management Of Inflammatory Bowel Disease. **Arq Gastroenterol**, v. 47, p. 313-325, 2010.

RANALDI, G., MARIGLIANO, I., VESPIGNANI, I., PEROZZI, G., SAMBUY, Y. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.157-167, 2002.

RENAME. **FORMULÁRIO TERAPÊUTICO NACIONAL 2010** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, 2ª edição – Brasília: Ministério da Saúde, 2010-2011.

SABZEVARI, A. et al. Polymeric triamcinolone acetone nanoparticles as a new alternative in the treatment of uveitis: In vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, p. 63–71, 2013.

SALIM, S. A. et al. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. **World J Gastroenterol**, v. 34, p. 5633–5644, 2013.

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

SILVA, Penildon. **Farmacologia**, 7ª edição – Rio de Janeiro – Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, R. M. L. et al. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 260–268, 2010.

SILVA-JUNIOR, A. A.; MATOS, J. R.; FORMARIZ, T. P.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. **Int. J. Pharm.**, v. 368, p. 45 – 55, 2009.

SOUZA, M. M. et al. Effects of budesonide and probiotics enemas on the colonic mucosa of rats with experimental colitis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, p. 34-38, 2007.

STOTLAND, B. R., et al. ADVANCES IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. **Advances in gastroenterology**, v. 84, p. 1107-1124, 2000.

THOMPSON, A. I.; LEES, C. W. Genetics of Ulcerative Colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, p. 831-848, 2011.

THORESON, R.; CULLEN, J. J. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: An Overview. **Surg Clin N Am**, v. 87, p. 575–585, 2007.

TRIANAFILLIDIS, J. K.; MERIKAS, E.; GEORGOPOULOS, F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 185-210, 2011.

UPTODATE. **Clinical manifestations, diagnosis, and prognosis of ulcerative colitis in adults**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-prognosis-of-ulcerative-colitis-in-adults>>. Acesso em 29 jul. 2015.

UPTODATE. **Triamcinolone**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/triamcinolone-systemic-drug-information?source=preview&search=%2Fcontents%2Fsearch&anchor=F9606642&selectedTitle=1~142#F9606642>>. Acesso em 02 ago. 2015.

VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Rev. Bras. De Ciências Farmacêuticas**, v.44, p. 535–548, 2008.

VILLANOVA, J. C. O., ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, p. 51-64, 2010.

VISCIDO, A., et al. Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**, 2014.

WALLACE, J. L et al. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.96, p. 29-36, 1989.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO). Doença Inflamatória Intestinal: uma perspectiva global. **WGO**, 2009. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/21_inflammatory_bowel_disease_pt.pdf>. Acesso em 14 mai. 2014.

YANG, L. et al. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 1–15, 2002.

YANG, C.; HSU, C.; TSAI, M. Effect of crosslinked condition on characteristics of chitosan/tripolyphosphate/genipin beads and their application in the selective adsorption of phytic acid from soybean whey. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 659–665, 2011.

ANEXOS**Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

PROTOCOLO N.º 002/2014 (2)

Professor/Pesquisador: CHRISTINA DA SILVA CAMILLO

Natal (RN), 09 de maio de 2014.

Prezado Professor/Pesquisador,

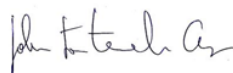
Vimos, através deste documento, informar que o projeto “EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Turnera ulmifolia* L. e *Anacardium occidentale* Linn EM RATOS SUBMETIDOS A COLITE ULCERATIVA AGUDA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO”, **protocolo n.º 002/2014**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: SETEMBRO 2015 (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,



John Fontenele Araujo
Coordenador da CEUA