



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO

**Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β -
ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação
pré-clínica em modelo de inflamação**

FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA

TERESINA - PI

2019

FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA

**Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β -
ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação
pré-clínica em modelo de inflamação**

Tese a ser submetida à Coordenação do Curso
RENORBIO da Universidade Federal do Piauí,
como requisito para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes.
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco A. Oliveira

TERESINA - PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

C972d Cunha, Francisco Valmor Macedo.
Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β – ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação pré-clínica em modelo de inflamação. / Francisco Valmor Macedo Cunha. - 2019.
153 f.: Il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, RENOBIO, Teresina, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes”.

1. Biotecnologia. 2. Dissolução. 3. Nanoemulsão.
3. Permeação em vitro. 4. Ciclodextrina. I. Título.

CDD: 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA

TÍTULO DO PROJETO: “Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β -ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação pré-clínica em modelo de inflamação.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

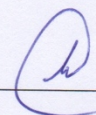
BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

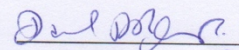
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI
(Presidente)

SATISFATORIO



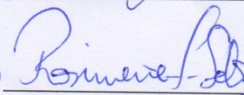
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo - UFPI
(Examinador)

SATISFATORIO



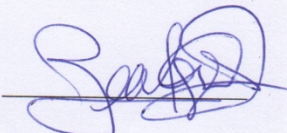
Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos - UFPI
(Examinadora)

Satisfatório



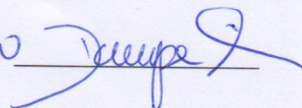
Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima
Damasceno – UEPB
(Examinador)

Satisfatório



Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira - FIOCRUZ/RJ
(Examinador)

SATISFATORIO



DATA DA AVALIAÇÃO: 12 de abril de 2019.

HORÁRIO: 09h

LOCAL: Auditório do curso de Farmácia - CCS/UFPI

FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA

**Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β -
ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação
pré-clínica em modelo de inflamação**

Tese submetida à Coordenação do Curso
RENORBIO da Universidade Federal do Piauí,
como requisito para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes (Orientador)
Universidade Federal do Piauí- UFPI

Prof. Dr. Daniel Dias Arcanjo Rufino (Membro Interno)
Universidade Federal do Piauí- UFPI

Prof^a. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos (Membro Externo)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Bolívar Ponciano G. L. Damasceno (Membro Externo)
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Membro Externo)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

CUNHA, F. V. M. **Desenvolvimento tecnológico de complexo de inclusão em β -ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação pré-clínica em modelo de inflamação.** Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CCS/UFPI, 2019.

RESUMO

Introdução: O ferulato de etila é um fenilpropanóide com atividades anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora de origem natural e sintética com potenciais usos na indústria nutracêutica e farmacêutica. Entretanto, possui baixa solubilidade em água o que compromete a absorção no trato gastrointestinal, diminuindo a biodisponibilidade e comprometendo a reprodutibilidade dos efeitos in vivo para aplicações farmacêuticas de uso oral. Formas farmacêuticas para administração tópica têm aumentado nos últimos anos devido a busca por formas de tratamento com menos efeitos adversos e colaterais. Ciclodextrinas de origem natural e sintética são amplamente utilizadas a fim de melhorar o perfil de dissolução de substâncias pouco solúveis. As nanoemulsões tem sido a tecnologia de escolha para aplicação de substâncias hidrofóbicas por via tópica propiciando ambiente favorável a pele e perfil de liberação controlado. **Objetivo:** Desenvolver, caracterizar e testar em modelo de edema de pata induzido por carragenina complexo de inclusão de β -ciclodextrina com ferulato de etila e nanoemulsão para vetorização de ferulato de etila por via tópica. **Material e Métodos:** Complexos de inclusão de ferulato de etila e β -ciclodextrina foram obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização e spray drying. Os complexos obtidos foram avaliados quanto ao teor de ferulato de etila, estabilidade, perfil de dissolução, pesquisa de interações químicas através de FT-IR, caracterizados através de análise térmica, DRX e avaliação da atividade antiinflamatória in vivo através de modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Para desenvolvimento da nanoemulsão diagrama de fases pseudo-ternário foi desenvolvido com variações nas concentrações de surfactantes (Tween 80, Span 80), óleo (óleo de soja) e água. Os sistemas foram obtidos por ultrassonicação e foram avaliados quanto aos aspectos macroscópicos bem como tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Ao melhor sistema obtido foi incorporado ferulato

de etila a 1%, 2.5% e 5%. A melhor nanoemulsao foi então avaliada quanto a estabilidade, pesquisa de interações químicas através de FT-IR, avaliação de permeação in vitro através de célula de Franz, teste de irritação cutânea e avaliação de atividade antiinflamatória in vivo através de modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. **Resultados:** Os complexos de inclusão obtidos resultaram em aumento da solubilidade e estabilidade comparativamente ao ferulato de etila isolado. Além disso, os complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray drying apresentaram melhor efeito farmacológico comparativamente ao ferulato de etila 100 mg/kg v.o e o complexo obtido por spray drying apresentou efeito anti-inflamatório significativamente melhor que a indometacina (10 mg/kg) da segunda a quarta hora testadas. Dos sistemas obtidos, as melhores características de tamanho de partícula, PDI e estabilidade foi obtido com a proporção de 2.5% de óleo e 10% de tensoativo e 1% de ferulato de etila. A análise por FT-IR não revelou interação entre os componentes da nanoemulsão. O ensaio de liberação in vitro confirmou o perfil de liberação controlado, 26% de liberação do ativo após 6 horas de ensaio. A nanoemulsão obtida não apresentou sinais de irritação cutânea e foi efetiva na redução do edema ($p < 0,01$) da terceira a quinta hora no ensaio de edema de pata em ratos. **Conclusão:** Os sistemas binários entre ferulato de etila e B-ciclodextrina resultaram em aumento da solubilidade, melhora do perfil de dissolução do ativo, aumento da estabilidade e eficácia farmacológica em modelo inflamatório in vivo. A nanoemulsao desenvolvida apresentou boa estabilidade, perfil de liberação controlado e foi efetiva na redução da inflamação no modelo testado.

Palavras-chave: ferulato de etila; nanoemulsão; permeação in vitro; ciclodextrina; dissolução; biotecnologia.

CUNHA, F. V. M. **Technological development of inclusion complex in β -cyclodextrin and nanoemulsion containing ethyl ferulate for preclinical application in inflammation model**. Ph.D. Thesis, Post-Graduation Program in Biotechnology, CCS / UFPI, 2019.

ABSTRACT

Introduction: Ethyl ferulate is a phenylpropanoid with anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective activities of natural and synthetic origin with potential uses in the nutraceutical and pharmaceutical industry. However, it has low solubility in water which compromises the absorption in the gastrointestinal tract, decreases the bioavailability and compromises the reproducibility of the effects in vivo for pharmaceutical applications of oral use. Pharmaceutical forms for topical application have increased in recent years due to the search for forms of treatment with fewer adverse and side effects. Cyclodextrins of natural and synthetic origin are widely used in order to improve the dissolution profile of poorly soluble substances. Nanoemulsions have been the technology of choice for application of hydrophobic substances in a topical manner providing a favorable skin environment and controlled release profile. **Aims:** To develop, characterize and test in carrageenan-induced paw edema model of inclusion of B-cyclodextrin with ethyl ferulate and nanoemulsion for the vectorization of topical ethyl ferulate. **Material and Methods:** Inclusion complexes of ethyl ferulate and B-cyclodextrin were obtained by physical mixing, blending, lyophilization and spray drying. The complexes were evaluated for ethyl ferulate content, stability, dissolution profile, chemical interactions through FT-IR, characterized by thermal analysis, XRD, and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity using a paw edema model induced by carrageenan in rats. For the development of the nanoemulsion phase diagram pseudo-ternary was developed with variations in the concentrations of surfactants (Tween 80, Span 80), oil (soybean oil) and water. The systems were obtained by ultrasound and were evaluated for macroscopic aspects as well as particle size, polydispersity index and zeta potential. The best system obtained was 1%, 1%, 2.5% and 5% ethyl ferulate. The best nanoemulsion was then evaluated for stability, search for chemical interactions through FT-IR, evaluation of in vitro permeation through Franz cell, skin irritation test and evaluation of in

vivo anti-inflammatory activity through induced paw edema model by carrageenan in rats. **Results:** The inclusion complexes obtained resulted in increased solubility and stability compared to isolated ethyl ferulate. In addition, the complexes obtained by malaxage, lyophilization and spray drying had a better pharmacological effect compared to ethyl ferulate 100 mg / kg and the complex obtained by spray drying presented a significantly better anti-inflammatory effect than indomethacin (10 mg / kg) from the second to the fourth hour tested. From the systems obtained, the best particle size, PDI and stability characteristics were obtained with the proportion of 2.5% oil and 10% surfactant and 1% ethyl ferulate. FT-IR analysis revealed no interaction between nanoemulsion components. The in vitro release assay confirmed the controlled release profile, 26% release of the active after 6 hours of assay. The nanoemulsion obtained showed no signs of skin irritation and was effective in reducing edema ($p < 0.01$) from the third to fifth hour in the para edema test in rats. **Conclusion:** Binary systems between ethyl ferulate and B-cyclodextrin resulted in increased solubility, improved dissolution profile, increased stability and pharmacological potency in an in vivo inflammatory model. The developed nanoemulsion presented good stability, controlled release profile and was effective in the reduction of inflammation in the model tested.

Keywords: ethyl ferulate; nanoemulsion; in vitro permeation; cyclodextrin; dissolution; biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação aguda e crônica e os pré-requisitos para a resolução.....	20
Figura 2 – Mecanismos e estruturas envolvidas no processo de adesão e migração de células durante o processo inflamatório.....	22
Figura 3 – Estrutura química dos fenilpropanóides.....	27
Figura 4 – Estrutura molecular do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato).....	29
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura e topografia da alfa, β e gamaciclodextrinas.....	31
Figura 6 – Perfis de solubilidade de fase e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors.....	33
Figura 7 – Visão esquemática das técnicas para obtenção de nanoemulsões. A) técnicas de alta energia e b) técnicas de baixa energia.....	36

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Estrutura molecular do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato).....	52
Figura 2 – Estratégia de busca e resultados encontrados em prospecção científica sobre ferulato de etila.....	54
Figura 3 – Efeitos do ferulato de etila demonstrado na literatura pesquisada.....	55
Figura 4 – Estratégia de busca e resultados encontrados em prospecção tecnológica sobre ferulato de etila.....	62
Figura 5 – Relação entre a quantidade de patentes depositadas e artigos científicos publicados entre os anos de 2002 e 2016.....	63
Figura 6 - Distribuição do número de patentes em função do país de origem da tecnologia.....	64
Figura 7 – Percentual de ocorrência dos documentos patentários de acordo com a Classificação Internacional de Patentes.....	65
Figura 8 – Patentes terapêuticas e possível via de ação para a atividade reclamada associada ao ferulato de etila.....	67

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Curva de calibração do ferulato de etila a 325 nm obtido através de espectrofotometria UV-Vis.....	88
Figura 2 – Espectros de varredura em UV-Vis de soluções com diferentes concentrações de β -CD contendo ferulato de etila.....	89
Figura 3 – Diagrama de solubilidade de fases do ferulato de etila em soluções com diferentes concentrações de β -CD.....	90
Figura 4 - Espectro de infravermelho do ferulato de etila (1), β -CD (2), mistura física (3) e complexos de inclusão obtidos por malaxagem (4) spray-drying (5) e liofilização (6).....	92
Figura 5 - Espectro de infravermelho do ferulato de etila (1), β -CD (2), mistura física (3) e complexos de inclusão obtidos por malaxagem (4) spray-drying (5) e liofilização (6) mostrando possíveis sítios de interação entre ferulato de etila e B-ciclodextrina.....	93
Figura 6 – Curvas de DSC, TGA e DTG do ferulato de etila obtido na razão de 10°C/min.....	95
Figura 7 – Curvas de DSC de B-ciclodextrina, ferulato de etila, mistura física e complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray dried.....	96
Figura 8 – Curvas de TGA da B-ciclodextrina, ferulato de etila, mistura física e complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray dried.....	97
Figura 9 - Difrátograma de raios X do ferulato de etila, β -CD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física, malaxagem e spray-dried.....	98
Figura 10 – Perfil de liberação do ferulato de etila, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem, spray dried e liofilização.....	94
Figura 11 – Conteúdo (A) e massa degradada (B) de ferulato de etila nos complexos obtidos por spray drying, liofilização, malaxagem e mistura física....	95
Figura 12 – Avaliação da estabilidade do ferulato de etila em complexos de inclusão obtidos por diferentes métodos.....	96
Figura 13 – Efeito de complexos de inclusão de ferulato de etila obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização e spray dryer sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	97

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Diagrama de fases pseudo-ternário envolvendo óleo de soja estabilizado com mistura de surfactantes Span 80 e Tween 80 em EHL = 12...	119
Figura 2 – Registros fotográficos dos sistemas nanoemulsionados com tensoativo fixo a 10% e variação da proporção de óleo de 2,5 a 25%.....	120
Figura 3 – Espectros infravermelhos dos componentes da nanoemulsão isoladamente. 1 – Ferulato de etila; 2 – Span 80; 3 – Tween 80; 4 – Óleo de soja; 5 – Água.....	124
Figura 4 – Infravermelho com transformada de Fourier do ferulato de etila (1), nanoemulsão sem incorporação de droga (2) e as nanoemulsões com ferulato de etila incorporado a 1% (3), 2,5% (4) e 5% (5).....	125
Figura 5 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> de ferulato de etila, nanoemulsão contendo 1%, 2,5% e 5% de ferulato de etila.....	126
Figura 6 – Estabilidade de nanoemulsões A) sem incorporação do ferulato de etila e B) com incorporação do ferulato de etila avaliados quanto ao tamanho das gotas e índice de polidispersão (PDI).....	128
Figura 7 – Efeito de nanoemulsão incorporada com ferulato de etila sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	129

LISTA TABELAS

CAPITULO 1

Quadro 1 – Patentes e reivindicações relacionadas ao ferulato de etila e suas aplicações.....	68
--	-----------

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Proporção surfactante/óleo usados no diagrama de fases com óleo fixo a 5%.....	112
Tabela 2 – Proporção surfactante/óleo usados no diagrama de fases com surfactante fixo a 10%.....	113
Tabela 3 – Composição dos sistemas para incorporação do ferulato de etila...	114
Tabela 4 – Composição, tamanho de partículas, potencial de polidispersão e potencial zeta dos sistemas nano emulsionados desenvolvidos.....	118
Tabela 5 – Efeito da amplitude de sonicação sobre as características dos sistemas nanoemulsionados.....	121
Tabela 6 – Efeito da temperatura de sonicação sobre as características dos sistemas nanoemulsionados.....	122
Tabela 7 – Efeito da incorporação ferulato de etila sobre o tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.....	123

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

15-LOX	15 Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilil ciclase
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
APCs	Células apresentadoras de antígenos do inglês " <i>antigen presenting cells</i> "
ARE	Elemento de resposta antioxidante do inglês " <i>antioxidant response element</i> "
β-CD	β-ciclodextrina
COX	Ciclo-oxigenase
DAMP	Padrões moleculares associados à lesão do inglês " <i>damage associated molecular pattern</i> "
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DRx	Difração por raios X
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial do inglês " <i>endothelial nitric oxide sintase</i> "
ERNs	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas derivadas do oxigênio
FE	Ferulato de etila
GPCRs	Receptores associados à proteína G do inglês " <i>G protein coupled receptors</i> "
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Receptor de Glicocorticóide do inglês " <i>glucocorticoid recepto</i> "
GRd	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HMGB1	Grupo de proteínas de alta mobilidade do inglês " <i>hogh mobility group protein 1</i> "
HO-1	Hemi-oxigenase
HSP	Proteínas de choque térmico do inglês " <i>heat shock protein</i> "
ICAM	Molécula de adesão intercelular do inglês " <i>intercelular adhesion molecule</i> "

IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a Insulina 1 do inglês " <i>insulin like growth factor</i> "
IL-1 β	Interleucina 1 β
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível do inglês " <i>inducible nitric oxide sintase</i> "
LFA	Antígeno associado à função do linfócito do inglês " <i>linphocyte function-associated antigen</i> "
LOX-5	Lipoxigenase 5
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
MAPK	Kinase associada a mitógenos do inglês " <i>Mitogen-activated protein kinase</i> "
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos do inglês " <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> "
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos do inglês " <i>Macrophage colony-stimulating fator</i> "
mDNA	DNA mitocondrial do inglês " <i>mitochondrial DNA</i> "
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator nuclear κ B do inglês " <i>nuclear factor κB</i> "
NO	Óxido nítrico do inglês " <i>nitric oxide</i> "
NO $_2^-$	Nitrito
NOD	Proteína ligante ao domínio olimerização de nucleotídeos do inglês " <i>nucleotide binding oligomerization domain protein like receptors</i> "
Nrf-2	Fator nuclear derivado do eritróide do inglês " <i>nuclear factor erythroid 2</i> "
O $_2^-$	Ânion superóxido
OH $^-$	Hidroxila
ONOO $^-$	Peroxinitrito
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos do inglês " <i>pathogen associated molecular patterns</i> "
PGs	Prostaglandinas
PGD $_2$	Prostaglandina D $_2$
PGE $_2$	Prostaglandina E $_2$
PGJ $_2$	Prostaglandina J $_2$

PI3k	Fosfatidil inositol 3 cinase
PLA ₂	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico do inglês " <i>thiobarbituric acid reative species</i> "
TEP	Tempo de elevação da pata
TG	Travigravimetria
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i> do inglês " <i>Toll-like receptors</i> "
TNF- α	Fator de necrose tumoral α do inglês " <i>tumoral necrosis factor α</i> "
TXA ₂	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
• Geral.....	18
• Específicos.....	18
3. REDERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Processo Inflamatório.....	19
3.2 Tratamento Farmacológico da Inflamação.....	22
3.3 Produtos naturais como alternativas no tratamento de doenças inflamatórias.....	24
3.4 Ferulato de etila.....	28
3.5 Ciclodextrinas.....	30
3.5.1 Diagrama de Solubilidade de Fase.....	32
3.6 Nanoemulsão.....	33
Referências.....	36
CAPÍTULO 1.....	49
Introdução.....	51
Métodos e Design de estudo.....	52
Resultados e Discussão.....	53
Prospecção Científica.....	53
Prospecção Tecnológica.....	61
Conclusão.....	71
Referências.....	72
CAPÍTULO 2.....	80
Desenvolvimento tecnológico e caracterização de complexos de inclusão contendo ferulato de etila.....	80
Introdução.....	82
Materiais e Métodos.....	83
<i>Ferulato de etila, obtenção e solução.....</i>	83
<i>Diagrama de solubilidade de fases.....</i>	83
<i>Preparação dos complexos de inclusão.....</i>	84
<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF).....</i>	85
<i>Análise Térmica.....</i>	85
<i>Difratograma em Raios X.....</i>	85
<i>Estudos de dissolução.....</i>	86

Determinação do conteúdo de ferulato de etila nos complexos	86
Determinação da estabilidade dos complexos	86
<i>Animais</i>	87
<i>Efeito dos complexos de inclusão de ferulato de etila com β-CD obtidos através de mistura física, malaxagem, liofilização e spray dryer sobre o edema de pata induzido por carragenina</i>	87
<i>Análise Estatística</i>	88
Resultados e Discussão	88
Conclusão	103
Referências	103
CAPÍTULO 3	112
Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsão para vetorização do ferulato de etila por via tópica	112
Introdução	114
Materiais e Métodos	116
<i>Materiais</i>	116
<i>Determinação da proporção de surfactantes</i>	116
<i>Diagrama de fase pseudo-ternário</i>	116
<i>Otimização das condições de produção de nanoemulsão</i>	117
<i>Avaliação do tamanho das partículas e do potencial zeta</i>	117
<i>Incorporação do ferulato de etila em nanoemulsão</i>	118
<i>Doseamento do ferulato de etila incorporado em nanoemulsão</i>	118
<i>Espectroscopia por Infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)</i>	119
<i>Estudos de estabilidade</i>	119
<i>Estudo de liberação in vitro</i>	119
<i>Animais</i>	120
<i>Efeito da nanoemulsão de FE sobre o edema de pata induzido por carragenina</i>	120
<i>Análise Estatística</i>	121
Resultados e Discussão	121
Conclusão	135
Referências	135
4. PERSPECTIVAS	148
APÊNDICE	149
APÊNDICE A – Comprovante de aprovação do Comitê de ética em Experimentação animal	150

Anexo 1 – Publicação do capítulo 1	151
Anexo 2 – Submissão do Capítulo 2	152

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças inflamatórias, as artrites e inflamações de partes moles (bursites, tendinites e miosites) são as afecções mais prevalentes podendo levar a incapacidade física e laboral gerando grande ônus para o tratamento de tais afecções (HELMICK et al, 2008; BROTEN et al, 2014). Já em 2008, apenas nos Estados Unidos, estimava-se aumento de 40% nos diagnósticos de artrite nos 25 anos por vir demonstrando o impacto dessas doenças sobre o bem-estar social (LAWRENCE et al, 2008). No Reino Unido, em 2001, a incidência de distúrbios musculoesqueléticos foi de 947 para cada 10000 habitantes compreendendo principalmente artralgia e inflamação de tecidos moles (SHIFF et al, 2015).

Muitas classes de fármacos como corticosteroides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e agentes biológicos são utilizados para tratar distúrbios inflamatórios. Entretanto, a utilização desses fármacos causa uma série de efeitos indesejáveis tais como úlceras gástricas, dispepsia, sangramentos gastrintestinais e complicações cardiovasculares (DINARELLO, 2010). Dentro deste contexto, as plantas têm sido extensivamente utilizadas para tratamento de enfermidades ao longo da história. Tal popularidade deve-se principalmente à sua abundância para uso, segurança, efetividade e relação custo-benefício (MAHESH; RAMKANTH; SALEEN, 2011). O avanço na pesquisa em produtos naturais é tão evidente que 60% de todas as novas drogas reportadas entre 1981 e 2006 são de origem natural. Produtos naturais com atividade anti-inflamatória são usados como remédios populares em condições inflamatórias como febre, dor, enxaqueca e artrite. Várias substâncias com atividade anti-inflamatória têm sido identificadas em óleos essenciais destacando-se ainda os flavonoides, terpenóides e alcalóides. Para a maioria destes produtos, a atividade anti-inflamatória é inferida a partir de outras atividades farmacológicas identificadas relacionadas com a modulação da resposta inflamatória. Desta forma, substâncias antioxidantes têm sido apontadas como anti-inflamatórios promissores (YUAN et al, 2006).

O ferulato de etila é um derivado do ácido cinâmico, e, portanto, um análogo estrutural dos ácidos ferúlico, caféico e da curcumina que já possuem

suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias bem documentadas (KIKUZAKI, 2002). A presença do grupo éster no ferulato de etila atribui-lhe maior lipofilicidade em relação ao ácido ferúlico (SULTANA, 2012).

Estudos demonstram que o ferulato de etila age principalmente através da ativação de vias nucleares induzindo a expressão de uma série de genes vitais que codificam proteínas capazes de manter a homeostase em condições de estresse através do aumento da expressão das enzimas antioxidantes, fatores de crescimento e de proteínas antiapoptóticas e redução da expressão da iNOS (óxido nítrico sintase indutível) (SULTANA, 2012). Todos estes efeitos parecem estar associados ao poder antioxidante do ferulato de etila uma vez que as respostas são subseqüentes à diminuição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e que estudos *in vitro* ou *in vivo*, em modelos de inflamação, ainda não foram documentados na literatura (ISLAM et al, 2009). Além disso, o ferulato de etila apresentou importante atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica por via oral diminuindo a migração celular, estresse oxidativo e IL-1 β e TNF- α (CUNHA et al, 2016).

No entanto, a via oral pode apresentar restrições à ação de fármacos pouco solúveis, uma vez que estes não serão adequadamente absorvidos até o local de ação (KLEIN et al, 2013). Dentre os sistemas de solubilização, a complexação em β -ciclodextrina (β -CD) destaca-se uma vez que não altera as características físico-químicas da barreira formada pela pele e tampouco da droga veiculada pelo complexo (LOFTSSON; MASSON, 2001). Tal experiência tem sido realizada com inúmeros fármacos anti-inflamatórios com resultados positivos tais como hidrocortisona, dexametasona, indometacina, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e piroxicam (LOFTSSON; MASSON, 2001).

Estudos mostram que a complexação com a β -CD atenua toxicidade e elevam a DL50 da droga complexada. Outro fator importante é que a complexação pode prolongar a duração e a potência das drogas possibilitando a diminuição da dosagem, o que também contribui para a redução da toxicidade do complexo (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A utilização da via tópica para a administração de fármacos anti-inflamatórios tem sido foco de muitas investigações pela possibilidade de aplicação local e diminuição dos efeitos adversos comuns a aplicação oral destes

fármacos. Dentre as possibilidades para a aplicação tópica, as nanoemulsões tem sido bastante utilizadas como sistemas carreadores de fármacos e ativos para diversas aplicações terapêuticas (SINGH et al, 2017; RAI et al, 2018). Estudos tem demonstrado que as nanoemulsões diminuem os efeitos adversos além de propiciarem perfil de liberação prolongada no fármaco carreado proporcionando efeito duradouro e minimizando a necessidade de diversas aplicações diárias. Desta forma, as nanoemulsões são consideradas a melhor tecnologia devido à sua natureza fluídica, interação proeminente com as células da pele, tamanho de gotículas pequenas, capacidade de permeação eficiente, capacidade de proteção para fornecer moléculas mesmo irritantes, voláteis e de alto peso molecular (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; GUPTA et al, 2016).

2. OBJETIVOS

- Geral
 - Desenvolver e caracterizar complexo de inclusão em β -ciclodextrina e nanoemulsão contendo ferulato de etila para aplicação pré-clínica em modelo de inflamação.

- Específicos
 - Preparar e caracterizar complexo de inclusão do ferulato de etila com β -ciclodextrina (β -CDFE);
 - Desenvolver e caracterizar nanoemulsão contendo ferulato de etila;
 - Avaliar o efeito do complexo β -CDFE e nanoemulsão em modelo de edema de pata induzido por carragenina;

3. REDERENCIAL TEÓRICO

3.1 Processo Inflamatório

A inflamação é uma resposta fisiológica adaptativa desencadeada por estímulos nóxicos ou lesão tecidual que visa a restauração da homeostase e o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008). A mesma cursa com destruição e reparo tecidual, envolve o recrutamento de derivados do sangue como proteínas plasmáticas e leucócitos, devido às alterações na vasculatura que levam a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

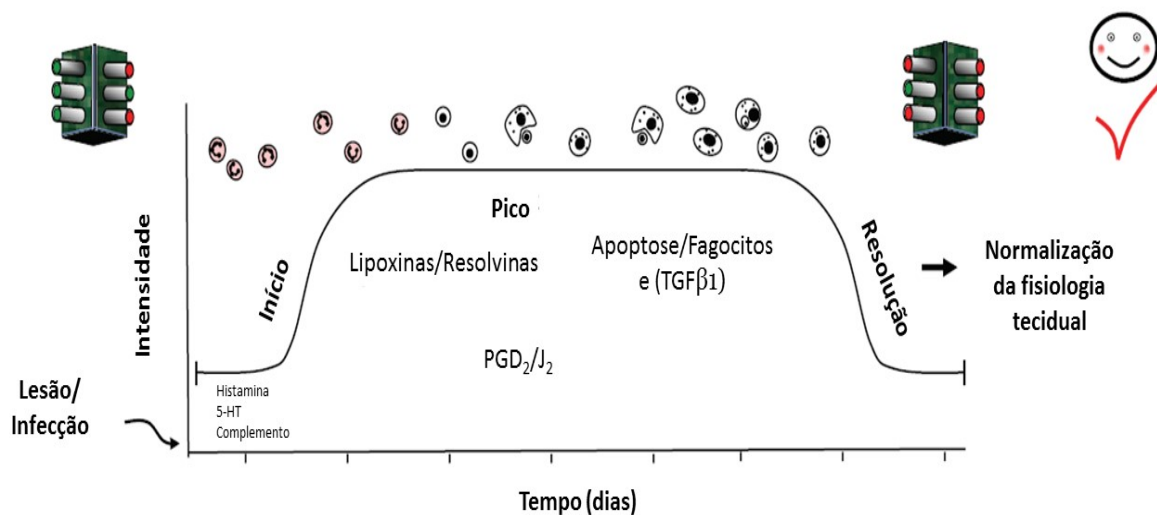
O entendimento do processo inflamatório dá-se de forma mais clara quando abordadas as vias clássicas de lesão inicial, sejam elas química, biológica ou mecânica. Contudo, doenças estreitamente relacionadas à inflamação como diabetes, artrite reumatoide e outras doenças reumáticas, resguardam nuances ainda não compreendidas totalmente que tornam o processo mais complexo (MEDZHITOV, 2008). Conceitualmente, o processo inflamatório é mediado por efetores celulares (macrófagos, neutrófilos, linfócitos) e químicos (citocinas, quimiocinas, prostanóides, lipoxinas, óxido nítrico) que se somam a fim de eliminar o agente agressor (WHITE, 1999) (**Figura 1**).

Dentre os mediadores da inflamação destacam-se as citocinas, um vasto conjunto de polipeptídios celulares que gerenciam amplamente a resposta inflamatória através do controle da migração celular e do estado de ativação da célula, através dos seus principais representantes: TNF (Fator de necrose tumoral) e IL-1 (Interleucina 1) (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Prostanóides é o nome dado ao grupo constituído por prostaglandinas (PGs) e tromboxano A₂ (TXA₂) com ações vasomotoras e quimiotáxicas, formados pela ação das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) a partir do ácido araquidônico (AA) proveniente da membrana plasmática por ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

De forma geral, quando desencadeada, a inflamação pode iniciar-se pelo reconhecimento de patógenos por componentes do sistema imune inato, como os receptores *Toll like* (TLR) e receptor NOD *like* (NLR) presentes na superfície de macrófagos e mastócitos residentes (células apresentadoras de antígenos -

APCs) ou pela liberação de neuropeptídeos como substância P em resposta a dor em caso de trauma ou lesão tecidual (TEKEUCHI; AKIRA, 2010; KEYEL, 2014; MOTTA et al, 2015).

Figura 1 – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação aguda e crônica e os pré-requisitos para a resolução.



Fonte: SERHAN et al, 2007.

Os sinais para desencadeamento do processo inflamatório podem ser basicamente de dois tipos: I) PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*, padrões moleculares associados a patógenos) relacionados à resposta imune inata e consequente inflamação em resposta a lesão de origem biológica; e II) DAMPs (do inglês, *damage associated molecular patterns*, padrões moleculares associados a lesão) que consistem em moléculas próprias do tecido e que, no geral, têm sua existência restrita ao meio intracelular mas que são liberadas mediante lesão física ou química como ácidos nucleicos e determinadas proteínas como o HMGB1 (proteínas de alta mobilidade do grupo B1) (BROGGI; GRANUCCI, 2015).

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs leva a produção, pelas APCs, de uma variedade de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, FAP (fator ativador de plaquetas) e eicosanoides, levando ao aumento da permeabilidade capilar, principalmente de vênulas pós-capilares, gerando edema local, quimiotaxia e transmigração de neutrófilos para o foco

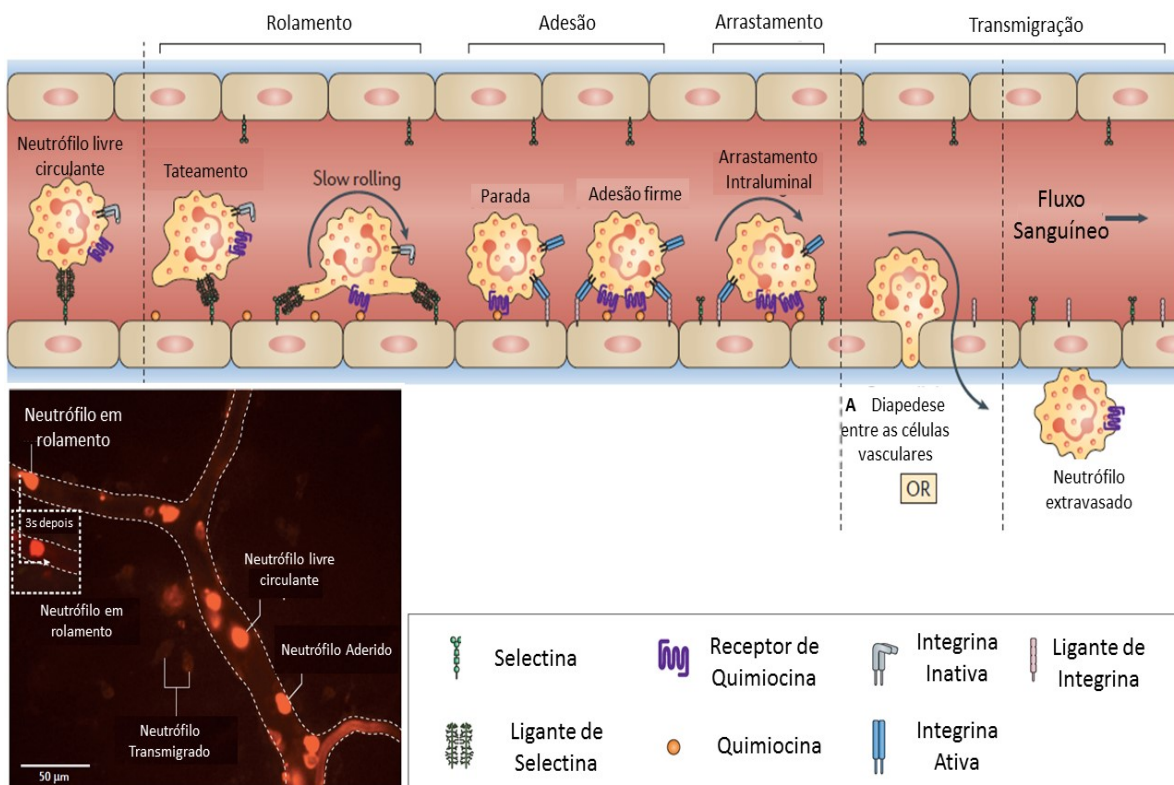
inflamatório (NATHAN, 2002). As células do endotélio ativadas possuem permeabilidade seletiva aos leucócitos, não permitindo a passagem de eritrócitos e hemácias, por exemplo. Isso dá-se devido à expressão de moléculas de adesão em suas superfícies (selectinas) que ligam-se seletivamente às integrinas e receptores de quimiocinas presentes na superfície dos leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

O processo de transmigração refere-se à passagem de células da circulação sistêmica para o foco da lesão e compreende duas fases distintas, são elas: rolamento e adesão (HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2013). A primeira fase refere-se ao recrutamento de células livres na circulação através da ligação das moléculas de adesão P-selectina e E-selectina expressas nas células endoteliais, aos seus ligantes glicosilados presentes na superfície das células livres, enquanto que a segunda refere-se à ligação firme entre as moléculas LFA-1 (antígeno associado a função do linfócito do tipo 1) expressas nas células inflamatórias e ICAM-1 e ICAM-2, moléculas de adesão intercelular expressas nas células endoteliais (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013) (**Figura 2**).

O êxito do processo inflamatório reside na eliminação do agente causal iniciando o processo de reparo tecidual logo após a eliminação do indutor do processo inflamatório o qual é mediado principalmente por macrófagos residentes e recrutados da circulação (NATHAN; DING, 2010). Mediadores como as lipoxinas, protectinas, resolvinas, TGF- β (fator de crescimento transformador β), interleucinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10 principalmente), SLPI (protease inibidora da secreção de leucócitos), HSP (proteínas de choque térmico), são fundamentais nesta fase do processo por recrutarem monócitos que removem as células mortas e iniciam o processo de reparo tecidual (JANSSEN; HENSON, 2012).

A magnitude da resposta inflamatória é fator preponderante para resolução ou cronificação da inflamação: resposta insuficiente resulta em imunodeficiência o que pode resultar em câncer; resposta excessiva pode causar morbidade e mortalidade em doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn, aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia cerebral e miocárdica, nesses casos, a inflamação pode ser mais letal que o agente causal (TRACEY, 2002).

Figura 2 – Mecanismos e estruturas envolvidas no processo de adesão e migração de células durante o processo inflamatório.



Adaptado de: KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013.

3.2 Tratamento Farmacológico da Inflamação

Os anti-inflamatórios têm sido utilizados com sucesso para alívio da dor, inflamação e febre há mais de 3500 anos, e continuam em uso por milhões de pacientes ao redor do mundo (VONKEMAN; VAN DE LAR, 2010; SOSTRES et al, 2010; BRUNE; PATRIGNANI, 2015). Muitas classes de fármacos como corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) com diferentes afinidades às isoformas da ciclooxigenase (COX) são utilizados para tratar distúrbios inflamatórios. Entretanto, a utilização desses fármacos causa uma série de efeitos indesejáveis tais como úlceras gástricas, dispepsia, sangramentos gastrintestinais e complicações cardiovasculares (GILROY et al, 2004; GAUTAM; JACHAK, 2009; DINARELLO, 2010; HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2013).

Os corticosteroides são anti-inflamatórios eficazes em basicamente todas as doenças inflamatórias e alérgicas. A efetividade extensiva dessa categoria de drogas advém da ação pleiotrópica da ativação de seu receptor (GR – receptor de glicocorticoide) em múltiplas vias de sinalização (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Dessa forma, podem atuar desde a inibição da produção de prostaglandinas, da vasodilatação e da permeabilidade vascular, além da transmigração de leucócitos ao sítio inflamatório (NEWTON, 2000; HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2013). O pleiotropismo, porém, resulta em diversos efeitos adversos tais como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão arterial sistêmica, inibição do reparo de feridas, osteoporose e distúrbios metabólicos, principalmente quando administrados cronicamente (NARUM; WESTERGREN; KLEMP, 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides são a principal modalidade terapêutica de afecções inflamatórias e artríticas (LANE et al, 2008). Na Europa, em 2004, os AINEs representaram 7,7% das prescrições (SOSTRES et al, 2010). Apesar de representarem grupo heterogêneo quanto à estrutura química, farmacocinética e farmacodinâmica, os AINEs carregam consigo mecanismo de ação semelhante: inibem a produção de prostaglandinas pelo bloqueio da COX resultando em efeitos analgésico, antipirético e anti-inflamatório (VONKEMAN; VAN DE LAR, 2010).

A COX apresenta três isoformas sendo a COX-1 e COX-2 relevantes no tratamento farmacológico da inflamação. A primeira está constitutivamente expressa na maioria dos tecidos enquanto que a COX-2 tem sua expressão condicionada a estímulos por citocinas, lipopolissacarídeos e fatores de crescimento, dentre outros (HOWARD; DELAFONTAINE, 2004; PERRONE et al, 2010). A inibição das isoformas da COX pode resultar em efeitos deletérios, especialmente nos tecidos e órgãos onde seus produtos (PGE₂) são protetores, como o trato gastrointestinal e rins (SOSTRES et al, 2010).

Estima-se que 20-30% dos pacientes em uso regular de AINEs desenvolvam algum tipo de dispepsia ou lesão gástrica (JONES et al, 2008; SOSTRES et al, 2010). As mucosas gástricas e duodenais são ricas em prostaglandinas que exercem papel protetor no trato gastrointestinal, provendo adequada perfusão à mucosa, secreção de bicarbonato pelas células epiteliais,

secreção de muco e manutenção do pH neutro da mucosa (RADI; KHAN, 2006). A inibição da COX e consequente diminuição da concentração de PGs culminam com o aumento da susceptibilidade à lesão do TGI (VAN SCHOOR, 2014). Adicionalmente, tanto os inibidores da COX-1 quanto da COX-2 podem causar nefrotoxicidade com necrose papilar e nefrite intersticial (BING; LOMNICKA, 2002). Diante de tais problemas relacionados ao uso de inibidores da COX-1, bem como a descoberta de uma segunda isoforma da COX, a COX-2, estritamente relacionada ao processo inflamatório e pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de drogas específicas a sua inibição, surgiram os coxibes (LANE et al, 2008).

Os coxibes representaram a primeira classe de AINEs desenvolvidos com base em estudos racionais a fim de diminuir os efeitos gastrintestinais provocados por fármacos com maior afinidade à COX-1 (PATRONO; ROCCA, 2009). Seu lançamento no mercado em meados da década de 1990 trouxe euforia à comunidade médica devido à sua maior afinidade à COX-2 e consequente menor toxicidade gastrintestinal (JONES et al, 2008). A descoberta dos efeitos tóxicos cardiovasculares incluindo infarto agudo do miocárdio e alterações trombóticas culminaram com a retirada do mercado do rofecoxibe (WARNER; MITCHELL, 2008). A inibição da COX-2 favorece os eventos protrombóticos pelo desequilíbrio entre as concentrações de prostaciclina e tromboxanos, resultando na diminuição da concentração de prostaciclina preferencialmente produzidas pela COX-2 (ZARRAGA; SCHWARS, 2007; PATRONO; ROCCA, 2009).

Diante de tais inconvenientes, a busca por drogas dotadas de eficácia terapêutica associada ao desprovimento de toxicidade e efeitos adversos faz-se necessária (MISHRA; TIWARI, 2011; BRUNE; PATRIGNANI, 2015). Devido à experenciação cultural e riqueza de entidades químicas com atividade biológica, as plantas medicinais e o acervo etnofarmacológico são as fontes de pesquisa mais comuns (OLIVEIRA et al, 2012).

3.3 Produtos naturais como alternativas no tratamento de doenças inflamatórias

Planta medicinal é qualquer planta utilizada diretamente ou como fonte de uma droga para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou alterar os estados fisiológico ou patológico do processo saúde-doença (PETROVSKA, 2012; RATES, 2001). Nesse sentido, chás, pós, tinturas e outras formas de preparações herbais eram utilizadas para tratamento das mais diversas enfermidades (BALUNAS; KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005).

Após o advento do método científico, tais plantas passaram a ser testadas seja em estudos de campo, estudos clínicos ou análises laboratoriais, e a lista de espécies a serem investigadas continua a crescer (BALUNAS; KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005). Aproximadamente metade (125.000) das espécies de plantas do mundo encontram-se nas florestas tropicais, tornando-as o berço de potenciais fármacos para uso medicinal (GURIB-FAKIM, 2006).

De acordo com Balunas e Kinghorn (2005), apenas uma a cada cinco mil substâncias isoladas chegarão a fase de ensaios clínicos em humanos e será aprovada para uso. Ainda segundo estes autores, o percurso da descoberta e isolamento da substância até sua aprovação e uso é árduo e dispendioso, perdurando em média 10 anos e alcançando montante de 800 milhões de dólares.

Problemas relacionados à baixa solubilidade, absorção e biodisponibilidade podem limitar o desenvolvimento de fármacos a base de produtos naturais (GANESAN, 2008). De acordo com Richton (2008), não apenas no isolamento e descoberta de substâncias bioativas com fins medicinais baseia-se o estudo das plantas: problemas relacionados a farmacocinética ou efeitos adversos podem ser contornados com modificações na estrutura da substância, ou a mesma pode ser utilizada como modelo para desenvolvimento de fármacos sintéticos com efeitos similares (por exemplo: ácido salicílico, aspirina; ibuprofeno, acetaminofeno e naproxeno; as penicilinas; morfina e naltrexona). Ressalta-se que, por vezes, a substância isolada apresenta efeito farmacológico inferior ao extrato que lhe deu origem o que é justificado pela ausência das relações de sinergismo com outras substâncias presentes no extrato (GOSSLAU et al, 2011).

No plano medicamentoso, múltiplos efeitos têm sido confirmados como anticâncer, antiaterosclerótico, antitrombótico, anti-hipertensivo, antibiótico e

antiviral, antidiabético e anti-inflamatório (RATES, 2001; PETROVSKA, 2012). Associado às suas atividades terapêuticas, soma-se a baixa incidência de efeitos adversos, fator preponderante para aumento da adesão do paciente ao tratamento (GOSSLAU et al, 2011).

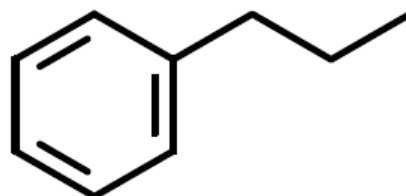
Dentro deste contexto, diversas famílias (*Zingiberaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Ginkgoaceae*, *Iriaceae*) têm demonstrado efeito inibidor da inflamação através da inibição de vias importantes de sinalização como a do ácido araquidônico, NF- κ B e a via do óxido nítrico (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003) além da ciclooxigenase 2 pelas plantas da família Apocynaceae, Asteraceae e Laminiaceae (SHAH; SETH; MAHESHWARI, 2011). Vantagem adicional aos produtos naturais em relação ao tratamento químico convencional é a ação multifocal daqueles na cascata inflamatória, ou seja, apesar de apresentarem efeitos menores em diferentes etapas da cascata inflamatória, o somatório dos efeitos tende a ser maior que a ação focal dos fármacos sintéticos convencionais contribuindo, inclusive, para o aparecimento de menos efeitos adversos (GOSSLAU et al, 2011).

As plantas, assim como os demais organismos vivos, produzem grande variedade de metabólitos primários e secundários. Os primários são destinados a prover energia, permitir o crescimento e a reprodução, e são essenciais à vida. Já os secundários, apesar de não estarem diretamente relacionados aos processos dos metabólitos primários, desenvolvem importantes funções adaptativas e protetoras que favorecem a sobrevivência e propagação da espécie, tais como: proteção contra patógenos (vírus, micoplasma, bactérias e fungos), contra predadores (insetos, mamíferos), contra plantas competidoras e estresses externos (radiação ultravioleta, ozônio), além disso, podem exercer a função de atração de espécies polinizadoras e dispersoras de sementes (KORKINA, 2007; SÁ et al, 2014).

Os metabólitos secundários derivam do metabolismo primário de todos os aminoácidos e carboidratos através de processos de síntese como metilação, glicolização, acilação, fenilação, oxidação e redução através de vias metabólicas específicas (glicólise, fotossíntese, ciclo do citrato, via chiquimato dentre outros) (SÁ et al, 2014). Dentre as várias classes de metabólitos secundários, a maior é a dos fenilpropanóides (KORKINA, 2007; VOGT, 2010). Tais substâncias

consistem em um anel fenólico ligado a uma cadeia alquil, geralmente de três carbonos, de onde deriva o nome “fenilpropanóide” (C₆-C₃). Esta estrutura pode ainda ter substituintes ligados ao anel fenólico (alquilas e hidroxilas especialmente) ou ainda combinações da estrutura básica, formando oligômeros com estrutura (C₆-C₃-C₆)_n (HARMATHA et al, 2011) (**Figura 4**). São sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico, a posterior redução do grupo carboxila deste gera um aldeído (cinamaldeído) e reduções subseqüentes monolignóis (fenilpropenos: eugenol e safrol) (VOGT, 2010; SÁ et al, 2014).

Figura 3 – Estrutura química dos fenilpropanóides.



Adaptado de: Sá et al, 2014.

Os fenilpropanóides e seus derivados estão entre os componentes ativos mais comuns de alimentos, aromas, fragrâncias, vinhos óleos essenciais, cervejas e diversos segmentos da medicina tradicional chinesa (VOGT, 2010; SÁ et al, 2014).

Tendo em vista as numerosas funções protetoras dos fenilpropanóides nas plantas, essas substâncias são de grande interesse especialmente para o desenvolvimento de produtos medicinais com finalidades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, antivirais, cicatrização de feridas, antibióticas e como protetores aos raios UVB (KORKINA, 2007; SÁ et al, 2014). Dentre as aplicações medicinais destaca-se o uso como anti-inflamatórios. Tal uso vem sendo descrito nos últimos anos e os mecanismos pelos quais este efeito se dá têm sido elucidados.

Segundo Korkina et al (2011), os fenilpropanóides exercem importante atividade anti-inflamatória pois atuam em todas as frentes possíveis: inibição da expressão de enzimas pro-inflamatórias (COX-2, LOX-5, iNOS, NADPH-oxidase

e PLA₂), nas vias de transdução de sinal da resposta inflamatória (NF-κB, AP-1, Akt e ERK), inibição de receptores e transcrição de genes (PPARS e ARE) e principalmente por combater os mediadores não proteicos da inflamação como radicais livres (EROS e ERNS) e produtos da peroxidação lipídica (NATARAJAN et al, 1996; MICHALUART et al, 1999; SONG et al, 2002; ESTROV et al, 2003; GAUTAM; JACHAK, 2009; SÁ et al, 2014). Tais achados têm sustentado a pesquisa e uso de fenilpropanóides como agentes anti-inflamatórios.

Vários fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico como o ácido caféico, curcumina, ácido ferúlico, dentre outros, possuem atividades antioxidante e anti-inflamatória bem documentadas (KORKINA et al, 2011). O ácido ferúlico apresentou atividade anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*, mas devido a sua baixa lipofilicidade não expressou os mesmos resultados *in vivo*, apresentando pequena biodisponibilidade e estabilidade (SCAPAGNINI et al, 2004). Neste sentido, os derivados estéricos do ácido ferúlico, como o ferulato de etila, possuem maior poder antioxidante evidenciando a importância da modificação na molécula (ANSELMINI et al, 2004).

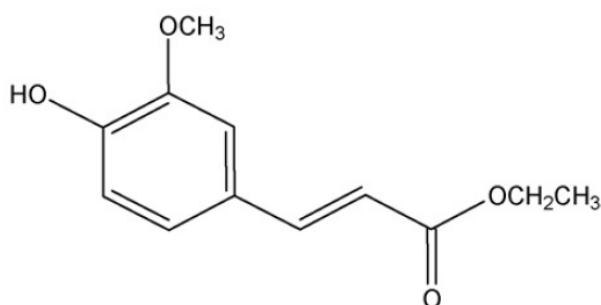
3.4 Ferulato de etila

O ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato) (C₁₂H₁₄O₄), um fenilpropanóide, é um derivado do ácido ferúlico amplamente presente em vegetais e especialmente em grãos como arroz e milho (ZHANG et al, 2010) (**Figura 5**). À classe constituída por derivados esterificados do ácido ferúlico dá-se o nome de fitoésteres ferulatos, da qual o ferulato de etila faz parte (ZHANG et al, 2010). Com peso molecular de 222,24 daltons, pKa de 9,98 e maior polaridade entre os derivados estéricos do ácido ferúlico (log P de 2,24), o ferulato de etila, apesar de possuir poucos substituintes antioxidantes no anel aromático e na cadeia lateral alquila, possui boa permeabilidade nas membranas biológicas, justificando assim seu melhor perfil antioxidante em relação ao ácido ferúlico (NENADIS; ZHANG; TSIMIDOU, 2003). A avaliação da seletividade epiderme-derme confirma a maior capacidade de penetração do ferulato de etila, que apresentou taxa de absorção transdérmica de 22 a 51 vezes maior que seu

precursor, o ácido ferúlico, em pH de 6,0 e 9,9 respectivamente (ZHANG et al, 2010).

A presença do grupo éster no ferulato de etila atribui-lhe maior lipofilidade em relação ao seu correlato, o ácido ferúlico, atribuindo-lhe maior capacidade de permeio nas barreiras biológicas (SULTANA, 2012). A farmacocinética do ferulato de etila é pouco conhecida, mas acredita-se que esta substância seja clivada ou por ação da microflora intestinal ou mesmo por enzimas plasmáticas e hepáticas dando assim origem ao seu precursor que sofre conjugação e por fim é eliminado através da urina e fezes (BOLLING et al, 2011).

Figura 4 – Estrutura molecular do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato).



Adaptado de ZHANG et al, 2010.

Estudos têm demonstrado que os derivados estéricos do ácido ferúlico exercem atividade tamponadora de radicais livres e preventiva na formação dos mesmos principalmente através do aumento na expressão de proteínas antioxidantes como glutathione. Os mecanismos envolvidos em tal resposta relacionam-se a ativação da via do Nrf-2 e inibição do NF-κB (SULTANA, 2012). Outros efeitos importantes relacionados a atividade anti-inflamatória incluem a inibição do NF-κB, da COX-2 e da iNOS (ISLAM et al, 2009), indução da quinona redutase (BOLLING et al, 2011), aumento da expressão da HO-1 (enzima hemeoxigenase) e da proteína HSP-70 (CALABRESE et al, 2008). Estudo in vivo realizado por Cunha et al (2016) evidenciou atividade anti-inflamatória e condroprotetora em modelo de artrite induzida por ACF com diminuição de marcadores inflamatórios com IL-1B e TNF-α bem como melhor perfil radiográfico nos animais tratados com ferulato de etila.

Quanto à toxicidade, a maioria dos estudos remete a avaliações *in vitro* em populações de células específicas (fibroblastos, astrócitos e macrófagos). Em neurônios e astrócitos, por exemplo, o ferulato de etila em diferentes concentrações (1, 5, 15, 25 e 50 μM) apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração resultando na redução da viabilidade em 63% e 82% em astrócitos e neurônios respectivamente (SCAPAGNINI et al, 2004). Dados de toxicidade *in vivo* foram encontrados na descrição da substância de uma indústria química (ClearSynth®) que a sintetiza, relatando as doses letais médias por via oral para coelhos (3200 mg/kg), ratos (980 mg/kg) e camundongos (300 mg/kg).

3.5 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são produtos cíclicos da degradação enzimática do amido por uma família de enzimas conhecidas como ciclodextrinas glicosiltransferases (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; CRINI, 2014). Consistem em oligossacarídeos formados por pontes α -1,4 contendo seis (alfa), sete (β) ou oito (gama) unidades de glicopiranoose perfazendo uma estrutura tridimensional de cone truncado sendo o interior lipofílico e o exterior hidrofílico, assim, substâncias lipofílicas podem ser inclusas na estrutura tridimensional da ciclodextrina permitindo que as mesmas permeiam as membranas biológicas (LOFTSSON; MASSON, 2001; CRINI, 2014).

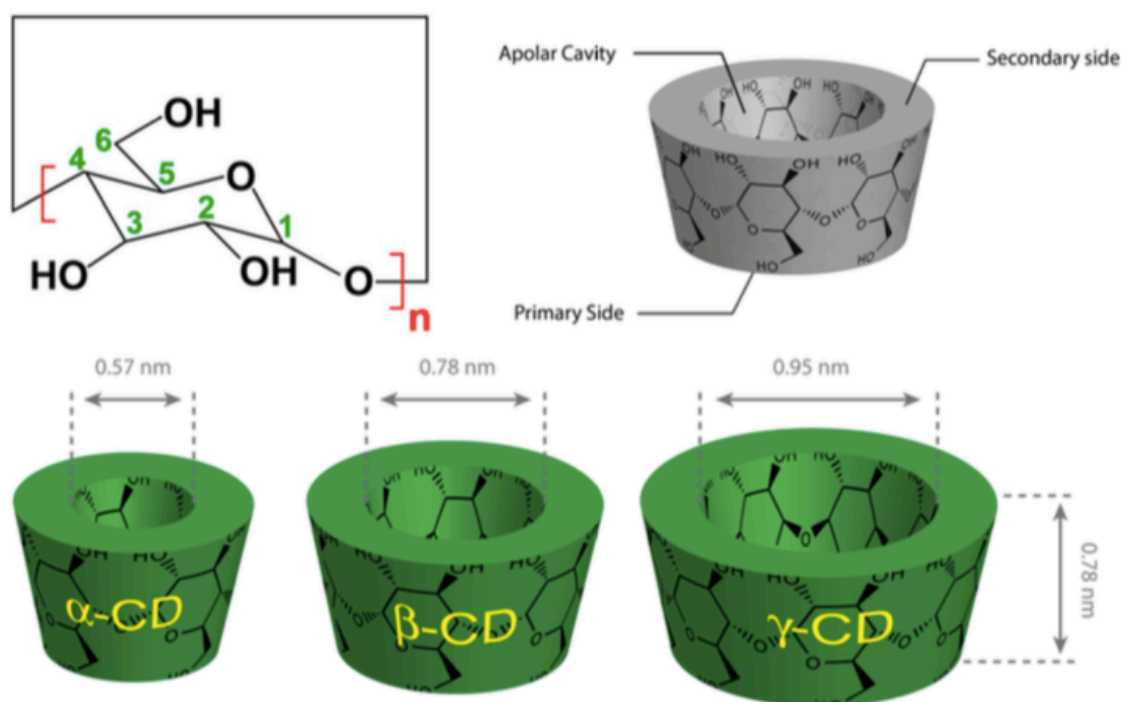
Devido à conformação da cadeia das unidades de glicopiranoose, as ciclodextrinas têm a forma de um cone truncado em vez de cilindros perfeitos. Os grupos hidroxilas são orientadas para o exterior do cone com os grupos hidroxila primários dos resíduos de açúcar na borda estreita do cone e os grupos hidroxila secundários na borda mais larga. A cavidade central é revestida pelos átomos do esqueleto de carbono e oxigênio etéreo dos resíduos de glicose, o que lhe confere um caráter lipofílico (RITA; AMIT, CHANDRASHEKHAR, 2011).

As ciclodextrinas possuem uma cavidade hidrofóbica que pode encapsular outras moléculas. Desta forma, a molécula hospedeira, pode sofrer modificações incluindo aumento da estabilidade físico-química, características biológicas além de solubilidade, dissolução e biodisponibilidade aumentados (SARAVANA; SUSHMA; PRASANNA, 2013; CRINI, 2014). Tais efeitos resultam

em otimização; estabilização e proteção contra reações oxidativas, hidrolíticas e fotolíticas; redução da volatilidade e diminuição dos efeitos desagradáveis de fármacos (CHAUDHARY; PATEL, 2013).

Dentre as ciclodextrinas, a tipo β tem se destacado por 3 razões básicas: o diâmetro de sua cavidade é o melhor para moléculas hospedeiras, os métodos para sua produção não requerem tecnologias sofisticadas além de possuir baixo custo (SARAVANA; SUSHMA; PRASANNA, 2013; CHAUDHARY; PATEL, 2013).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura e topografia da alfa, β e gama ciclodextrinas. Adaptado de CRINI, 2014.



As ciclodextrinas possuem diversas aplicações nos mais diversos setores como o farmacêutico, alimentar, química, cosméticos, biotecnologia, agricultura, higiene, têxtil e ambiental devido a sua aprovação por diversas agências regulatórias ao redor do mundo (SARAVANA; SUSHMA; PRASANNA, 2013; CRINI et al, 2014).

Substâncias voláteis complexadas a ciclodextrinas apresentam menor evaporação e degradação quando expostas a temperaturas mais altas (LIMA et al., 2012). Outro resultado da encapsulação em ciclodextrina é a diminuição de

efeitos secundários indesejáveis como irritação da mucosa ou sabores desagradáveis devido a proteção do contato entre a substância e membranas do corpo que antecedem o processo de dissolução (ZHANG et al., 2010).

3.5.1 Diagrama de Solubilidade de Fase

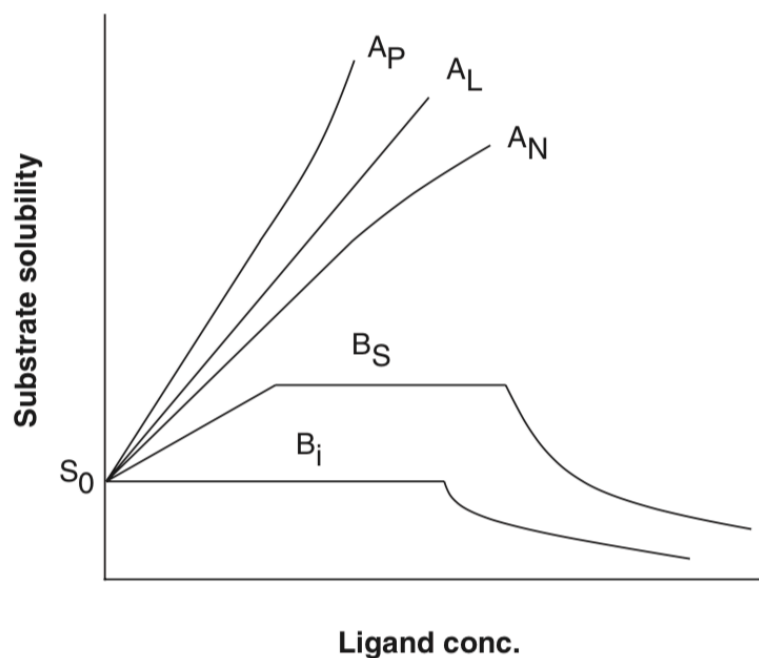
O mais utilizado e amplamente aplicado sistema analítico para verificação da formação de complexos com CDs é o diagrama de solubilidade de fase proposto por Higuchi e Connors (1965) (CHAUDHARY; PATEL, 2013). Tal método baseia-se na avaliação das mudanças de solubilidade do substrato em meio aquoso e em volume constante à medida em que é acrescida quantidade crescente de ciclodextrina. Experimentalmente, um excesso do substrato é adicionado a soluções de mesmo volume, mas com concentrações crescentes de CDs (VEIGA; PECORELLI et al., 2006; CHAUDHARY; PATEL, 2013).

Os perfis de solubilidade de fase do tipo A são obtidos quando a solubilidade do substrato aumenta à medida em que aumenta a concentração da ciclodextrina. Quando o complexo é de primeira ordem em relação ao ligante e primeira ou maior ordem em relação ao substrato, os perfis de solubilidade de fase do tipo AL são obtidos. Se o complexo é de primeira ordem em relação ao substrato, mas de segunda ou maior ordem em relação ao ligando, então os perfis de solubilidade de fase do tipo AP são obtidos (LOFTSSON et al, 2005). Perfis de solubilidade de fase do tipo AN podem ser difíceis de interpretar. O desvio negativo da linearidade pode estar associado a alterações induzidas pela ciclodextrina na constante dielétrica do meio aquoso de complacência, mudanças na solubilidade complexa ou auto-associação de moléculas de ciclodextrina (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2009).

Os perfis de solubilidade de fase do tipo B indicam a formação de complexos com solubilidade limitada no meio aquoso. Em geral, os derivados de ciclodextrina solúveis em água formam perfis de solubilidade de fase do tipo A, ao passo que as ciclodextrinas naturais menos solúveis formam frequentemente perfis do tipo B. Acredita-se que a maioria dos complexos droga / ciclodextrina sejam complexos de inclusão, mas as ciclodextrinas também são conhecidas por formar complexos de não inclusão e agregados complexos capazes de dissolver

drogas através de estruturas semelhantes a micelas (CUNHA-FILHO;SÁ-BARRETO, 2009; CHAUDHARY; PATEL, 2013).

Figura 6 – Perfis de solubilidade de fase e classificação dos complexos de acordo com Higuchi e Connors. Adaptado de: LOFTSSON et al, 2005.



Os perfis de solubilidade de fase não verificam a formação de complexos de inclusão. Eles descrevem apenas como a concentração crescente de ciclodextrina influencia a solubilidade do fármaco. Para distinguir entre complexos de inclusão e não inclusão, os resultados experimentais dos estudos de fase de solubilidade devem ser comparados com outros resultados experimentais de, por exemplo, estudos de UV/VIS, fluorescência e RMN (LOFTSSON et al, 2005).

3.6 Nanoemulsão

As nanoemulsões são a dispersão óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O) de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um surfactante apropriado. O diâmetro médio das gotículas de uma nanoemulsão é geralmente menor que 500 nm. O pequeno tamanho de gotícula dá a elas uma aparência clara ou nebulosa

que difere da cor branca leitosa associada à emulsão (SINGH et al, 2017). A principal diferença entre as emulsões e as nanoemulsões é que as primeiras, embora possam exibir excelente estabilidade cinética, são termodinamicamente instáveis e eventualmente apresentarão separação de fases. Outra diferença importante é a aparência deles; as emulsões são turvas, enquanto as nanoemulsões são transparentes ou translúcidas. Além disso, existem diferenças no método de preparação, uma vez que as emulsões requerem uma grande entrada de energia (DONSI; FERRARI, 2016; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016).

Diversas aplicações têm sido designadas as nanoemulsões desde o uso na indústria cosmética, farmacêutica seja na produção de medicamentos antimicrobianos, quimioterápicos, produção de vacinas orais, sistema de delivery de ativos, aplicação tópica dentre outros (THAKUR; GARG, 2012; CHAVDA; SHAR, 2017).

As nanoemulsões possuem uma série de vantagens em relação a outras formas farmacêuticas. Dentre elas destaca-se a eliminação na variabilidade de absorção e aumento da taxa de absorção, auxílio na solubilização de drogas lipofílicas, propiciam o desenvolvimento de formas de formas farmacêuticas líquidas para ativos insolúveis, aumento da biodisponibilidade, propiciam o uso de várias vias de administração (tópica, oral e intravenosa), ajudam no mascaramento de sabores, melhoram a eficácia de um fármaco, permitindo que a dose total seja reduzida, minimizando os efeitos colaterais. Além disso, as nanoemulsões são por definição sistemas termodinamicamente estáveis (THAKUR; GARG, 2012; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016).

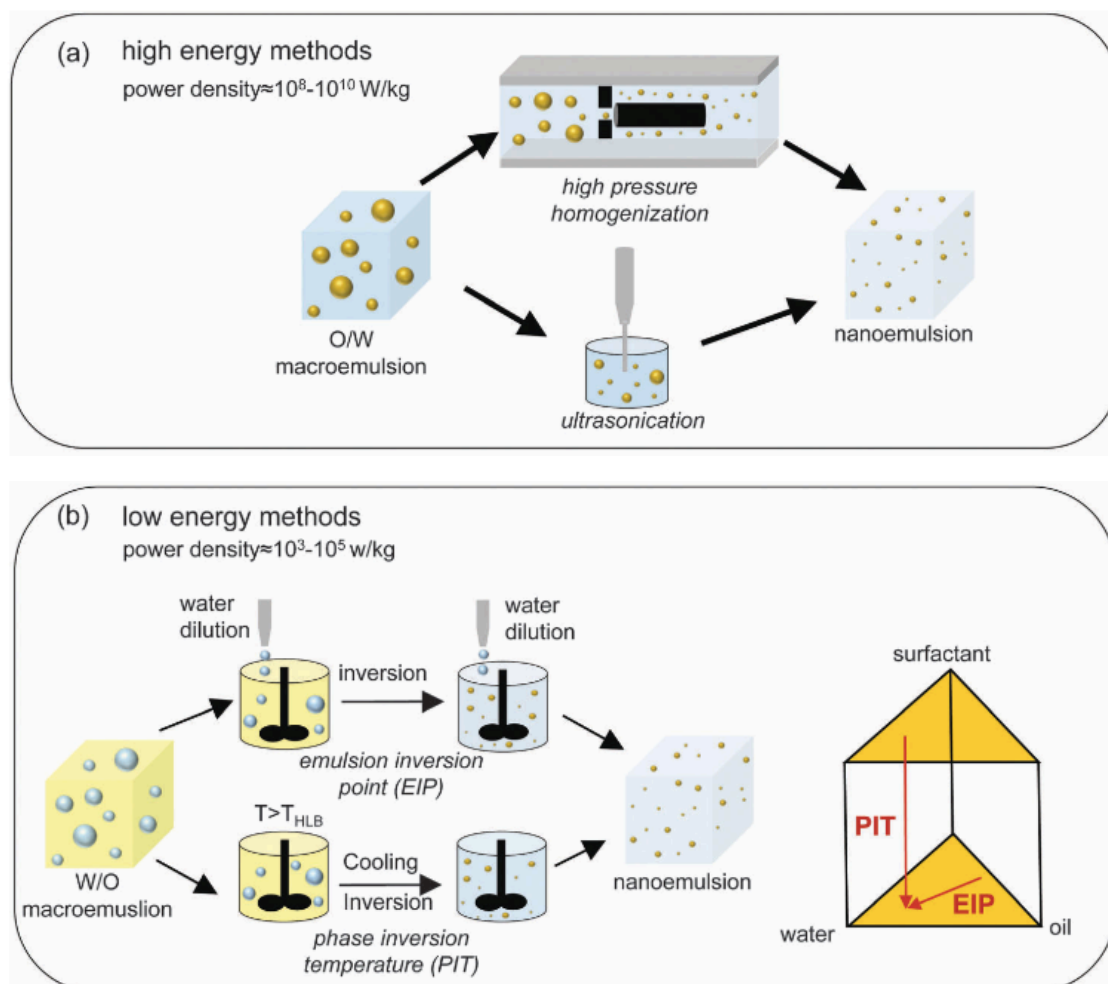
Por outro lado, desvantagens dos sistemas baseados em nanoemulsão também são observadas tais como a necessidade de grande concentração de surfactante e co-surfactantes para estabilizar as nanogotícolas, capacidade de solubilização limitada para substâncias de ponto de fusão alto, o surfactante deve ser atóxico para aplicações farmacêuticas e a estabilidade das nanoemulsões é influenciada por parâmetros ambientais, como a temperatura e o pH (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; GUPTA et al, 2016).

Nanoemulsões podem aumentar a permeabilidade da pele por vários mecanismos. Primeiro, elas fornecem uma alta capacidade de solubilização para

compostos lipofílicos e hidrofílicos, aumentando assim a capacidade de carga e a aplicação da dose da formulação. Segundo, sua grande área de superfície e bom contato com a pele, juntamente com sua natureza oclusiva, garantem um bom contato superficial com a superfície do estrato córneo. Terceiro, os seus componentes óleo e tensoativo podem ter um efeito de melhoramento de permeação direta na estrutura lipídica do estrato córneo (ROBERTS et al, 2017).

As nanoemulsões podem ser obtidas por dois grupos de processos: os métodos de alta energia de emulsificação o qual inclui a utilização de homogeneizadores de alta pressão e ultrassom e métodos de baixa energia representado pelo método de inversão de fases e temperatura de inversão de fases (OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017; SINGH et al, 2017).

Figura 7 – Visão esquemática das técnicas para obtenção de nanoemulsões. A) técnicas de alta energia e b) técnicas de baixa energia. Adaptado de GUPTA et al, 2016.



Em termos de estabilidade, cinco fenômenos podem ser observados nas nanoemulsões: cremeação, floculação, coalescência, inversão de fases e Ostwald ripening. Nas nanoemulsões, o fenômeno de instabilidade mais frequente é o *Ostwald ripening*. Trata-se de um processo no qual uma gotícula de maior diâmetro cresce à medida em que engloba as menores o que é motivado pelo aumento da solubilidade de glóbulos menores oleosos da fase dispersa na fase contínua (THAKUR; GARG, 2012; SINGH et al, 2017).

A cremeação ocorre devido às diferenças na densidade entre as duas fases, em que a influência da gravidade causa separação das fases. A floculação é mais bem descrita como a agregação das partículas devido à baixa força de atração entre os coloides e depende da energia de interação (forças atrativas e repulsivas) entre duas partículas em função da distância. Em emulsões, a atração é dependente das forças de Van der Waals e a repulsão é devido ao tensoativo presente na interface. A coalescência é resultado da fusão dos glóbulos e pode ser completa, quando os glóbulos são líquidos, ou parcial, se os glóbulos contêm matéria cristalina e, geralmente, esta última acarreta inversão de fases. Dentre os mecanismos de instabilidade, a coalescência é muitas vezes considerada a mais importante em se tratando dos sistemas dispersos (GUPTA et al, 2016; OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

Referências

ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; LA ROSA, C.; FACINO, R. M.; SEGA, A.; TSUNO, F. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 35, p. 1241–1249, 2004.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Reviews of Ecology Evolution Systematics**. vol. 43, p. 385-406, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, vol. 78, p. 431 – 441, 2005.

BING, R. J.; LOMNICKA, M. Why Do Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors Cause Cardiovascular Events? **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 39, n. 3, p. 521-522, 2002.

BOLLING, Bradley W.; JI, Li Li; LEE, Chen-Hsien; PARKIN, Kirk L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. vol.59, n. 7, pp. 645-66, 2007.

BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe- and danger-induced inflammation. **Molecular Immunology**, vol. 63, p. 127–133, 2015.

BROTEN, L.; AVIÑA-ZUBIETA, J. A.; LACAILLE, D.; JOSEPH, L.; HANLY, J. G.; LIX, L.; O'DONNELL, S.; BARNABE, C.; FORTIN, P. R.; HUDSON, M.; JEAN, S.; PESCHKEN, C.; EDWORTHY, S. M.; SVENSON, L.; PINEAU, C. A.; CLARKE, A. E.; SMITH, M.; BÉLISLE, P.; BADLEY, E. M.; BERGERON, L.; BERNATSKY, S. Systemic autoimmune rheumatic disease prevalence in Canada: updated analyses across 7 provinces. **Journal of Rheumatology**. Vol. 41, n. 4, pp. 673-679, 2014.

CALABRESE, Vittorio; Calafato, Stella; PULEO, Eduardo; CORNELIUS, Carolin; SAPIENZA, Maria; MORGANTI, Pierfrancesco; MANCUSO, Cesare. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 358–363, 2008.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). **Planta Medica**. vol. 69, p. 973-983, 2003.

CHAUDHARY, V. B.; PATEL, J. K. Cyclodextrin inclusion complex to enhance solubility of poorly water soluble drugs: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Research**. Vol. 4, n. 01, pp. 68-76, 2013.

CHAVDA, V. P.; SHAR, D. A review on novel emulsification technique: a nanoemulsion. **J. Pharmacology and Toxicology Studies**, vol. 5, n. 1, 2017.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, vol. 114, n. 09, pp. 10940-10975, 2014.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.

CUNHA, F. V. M.; GOMES, B. S.; SOUSA NETO, B.; FERREIRA, A. R.; SOUSA, D. P.; MARTINS, M. C. C.; OLIVEIRA, F. A. Ferulic acid ethyl ester diminished Complete Freund's Adjuvant-induced incapacitation through antioxidant and anti-inflammatory activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Vol. 389, n. 1, p. 117, 2016.

DE LIMA, J.R. et al. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 397-402, 2012.
DINARELLO, Charles A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, vol. 140, p. 935–950, 2010.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **J. Biotechnol.**, vol 233, pp. 106-120, 2016.

ESTROV, Z.; SHISHODIA, S.; FADERL, S.; HARRIS, D.; VAN, Q.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, B.; AGGARVAL, B.B. Resveratrol blocks interleukin-1b-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kB, inhibits proliferation, causes Sphase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, vol. 102, p. 987-995, 2003.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, vol. 02, n. 1, p. 12-26, 1997.

GASENAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 12, p. 306–317, 2008.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, vol. 29, p. 767--820, 2009.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Reviews. Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Molecular and Nutritional Food Research**. vol. 55, p. 74–82, 2011.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, vol. 12, n. 11, 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27, p. 1–93, 2006.

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. **Cell**, vol. 34, n. 01, p. 01-06, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Ann Epidemiol**. vol. 15, p. 686–699, 2005.

HARMATHA, J; ZÍDEK, Z; KMONÍČKOVÁ, E; ŠMIDRKAL, J. Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. **Interdisciplinary Toxicology**. vol. 4, n. 1, p. 5–10, 2011.

HELMICK, C. G.; FELSON, D.T.; LAWRENCE, R.C.; GABRIEL, S.; HIRSCH, R.; KWOH, C.K.; LIANG, M. H.; KREMERS, H. M.; MAYES, M. D.; MERKEL, P. A.; PILLEMER, S. R.; REVEILLE, J. D.; STONE, J. H. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. **Arthritis and Rheumatism**. Vol. 58, n. 1, p. 15-25, 2008.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Advances in analytical chemistry and instrumentation. **Interscience**, New York, v. 4, p. 117-212, 1965.

HOWARD, P. A.; DELAFONTAINE, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 43, n. 4, p. 519-525, 2004.

ISLAM, S; YOSHIDA, H; MATSUKI, N; ONO, K; NAGASAKA,R; USHIO, H; GUO, Y; HIRAMATSU, T; HOSOYA, T; MURATA, T; HORI, M; OZAKI, H. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- κ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **J Pharmacol Sci**, vol. 111, p. 328 – 337, 2009.

JAISWAL, M.; DUDHE, M.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**. Vol. 05, pp. 123-127, 2015.

JANSSEN, J. W; HENSON, P. M. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. **Toxicologic Pathology**, vol. 40, p. 166-173, 2012.

JONES, R.; RUBIN, G.; BERENBAUM, F.; SCHEIMAN, J. gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, vol. 121, n. 6, p.464-474, 2008.

KEYEL, P. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. **Cytokine**, vol. 69, p. 136–145, 2014.

KIKUZAKI, Hiroe; HISAMOTO, Masashi; HIROSE, Kanae; AKIYAMA, Kayo; TANIGUCHI, HISAJI. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 2161-2168, 2002.

KLEIN T., LONGHINI R., BRUSCHI M. L., MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 23, n. 1, p: 186-193, 2013.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews**, vol. 13, n. 03, p. 159-175, 2013.

KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, vol. 53, n. 1, p. 15-25, 2007.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 11, p. 823-835, 2011.

LANE, L.; WHITE, W. B.; ROSTOM, A.; HOCHBERG, M. COX-2 Selective Inhibitors in the Treatment of Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**s, vol. 38, p. 165-187, 2008.

LAWRENCE, R. C.; FELSON, D. T.; HELMICK, C. H.; ARNOLD, L. A.; CHOI, H.; DEYO, R. A.; GABRIEL, S.; HIRSCH, R.; HOCHBERG, M. C.; HUNDER, G. G.; JORDAN, J. M.; KATZ, J. K.; KREMERS, H. M.; WOLFE, F. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States, Part II. **Arthritis Rheum.** Vol. 58, n. 1, p. 26–35, 2008.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MÁSSON, M.; JÄRVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, vol. 2, n. 2, 2005.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm**. Vol. 225, n. 1-2, pp. 15-30, 2001.

MAHESH, G.; RAMKANTH, S; SALEEN, M. Anti-inflammatory drugs from medicinal plants: a comprehensive review. **International Journal of Review in Life Sciences**, vol. 01, p.01-10, 2010.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. Vol. 140, n. 3, p. 771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, n. 07, p. 428-435, 2008.

MICHALUART, P.; MASFERRER, J. L.; CAROTHERS, A. M.; SUBBARAMAIAH, K.; ZWEIFEL, B. S.; KOBOLDT, C.; MESTRE, J. R.; GRUNBERGER, D.; SACKS, P. G.; TANABE, T.; DANNENBERG, A. J. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **Cancer Research**, vol. 59, p. 2347–2352, 1999.

MOTTA, V.; SOARES, f.; SUN, T.; PHILPOTT, D. J. Nod-like receptors: versatile cytosolic sentinels. **Physiological Reviews**, vol. 95, p. 149–178, 2015.

NARUM, S.; WESTERGREN, T.; KLEMP, M. Corticosteroids and risk of gastrointestinal bleeding: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, vol. 04, n. 05, p. 01-09, 2014.

NATARAJAN, K.; SINGH, S.; BURKE, T.R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 93, p. 9090-9095, 1996.

NATHAN, C; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, vol. 140, n. 3, p. 871–882, 2010.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, vol. 420, n. 12, p. 846–852, 2002.

NENADIS, Nikolaos; ZHANG, Hong-Yu; TSIMIDOU, Maria Z. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 51, p. 1874-1879, 2003.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, vol. 55, p. 603–613, 2000.

OCA-ÁVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Food Sci.**, vol. 16, pp. 1-6, 2017.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 61, n. 02, p. 255-265, 2011.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, vol. 59, p. 285–289, 2009.

PERRONE, M. G.; SCILIMATI, A.; SIMONE, L.; VITALE, P. Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be reconsidered. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 17, p. 3769-3805, 2010.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol. 58, p. 163–173, 2006.

RAI, V. K.; MISHRA, N.; YADAV, K. S.; YADAV, N. P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **J. Controll. Releas.**, vol. 270, pp. 203-225, 2018.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol. 39, p. 603–613, 2001.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, vol. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**. vol. 31, p. 986-1000, 2011.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, vol. 101, p.43-49, 2008.

RITA, L.; AMIT, T. CHANDRASHEKHAR, G. Current trends in B-cyclodextrin baed drug delivery systems. **Internat. J. Res. Ayurved. Pharmac.** Vol. 02, n. 05, pp 1520-1526, 2011.

ROBERTS, M. S.; MOHAMMED, Y.; PASTORE, M. N.; NAMJOSHI, S.; YOUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I. N.; ABD, E.; LEITE-SILVA, V. R.; BENSON, H. A. E.; GRICE, J. E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **J. Controll. Releas.**, vol. 247, pp. 86-105, 2017.

SÁ, R. C. S, ANDRADE, L. N, OLIVEIRA, R. R. B., SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, vol. 19, p. 1459-1480, 2014.

SARAVANA, K. K.; SUSHMA, M.; PRASANNA, R. Y. Dissolution Enhancement of poorly soluble drugs by using complexation technique – a review. **J. Pharmac. Sci. Res.**, vol. 5, n. 5, pp. 120-124, 2013.

SAVARDEKAR, P.; BAJAJ, A. Nanoemulsion – a review. **Internat. J. Res. Pharmac. Chem.**, vol. 6, n. 2, pp. 312-322, 2016.

SCAPAGNINI, Giovanni; BUTTERFIELD, Allan; COLOMBRITA, Claudia; SULTANA, Rukhsana; PASCALE, Alessia; CALABRESE, Vittorio. Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, Vol. 6, n. 5, p. 811-818, 2004.

SHAH, B. N; SETH, A. K; MAHESHWARI, K. M. A review on medicinal plants as a source of anti-inflammatory agents. **Research Journal of Medicinal Plant**. vol. 05, n. 02, p. 101-115, 2011.

SHIFF, N. J.; LIX, L.M.; JOSEPH, L.; DUFFY, C.; TUCKER, L. B.; SVENSON, L. W.; BELISLE, P.; BERNATSKY, S. The prevalence of systemic autoimmune rheumatic diseases in Canadian pediatric populations: administrative database estimates. **Rheumatol Int**. vol. 35, n. 3, pp. 569-573, 2015.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASUA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and application in drug delivery. **J. Control. Relea.**, vol. 252, pp. 28-49, 2017.

SONG, Y.S.; PARK, E.H.; HUR, G.M.; RYU, Y.S.; LEE, Y.S.; LEE, J.Y.; KIM, Y.M.; JIN, C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Letters**; vol. 175, p. 53-61, 2002

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper

gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol. 24, p. 121–132, 2010.

SULTANA, Rukhsana. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1822, p. 748–752, 2012.

TEKEUCHI, O.; AKIRA, S.; Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, vol. 140, n. 03, p. 805–820, 2010.

THAKUR, N.; GARG, G. Nanoemulsions: A review on various pharmaceutical applications. **Global J. Pharmacol.**, vol. 6, n. 3, 2012.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, vol. 420, n. 12, p. 853-859, 2002.

VAN SCHOOR, J. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal risk. Part 2. **South African Pharmacology Journal**, vol. 81, n. 02, p. 10-13, 2014.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, vol. 03, n 1, p. 2–20, 2010.

VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. **Seminar in Arthritis and Rheumatism**, vol. 39, p. 294-312, 2010.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet**, vol. 371, n. 01, p. 270–73, 2008.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 103, n. 03, p. S378-S371, 1999.

YUAN, G; WAHLQVIST, M. L; HE, G; YANG, M; LI, D. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pac J Clin Nutr**, vol. 15, p. 143-152, 2006.

ZARRAGA, I. G. E.; SCHWARS. Coxibs and heart disease: What we have learned and what else we need to know. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 49, n. 01, p. 01-14, 2007.

ZHANG, Li-Wen; AL-SUWAYEHB, Saleh A.; HSIEHC, Pei-Wen; FANGA, Jia-You. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 399, p. 44-51, 2010.

ZHANG, N. et al. Effective protection and controlled release of insulin by cationic β - cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 393, n. 1, p. 213-219, 2010.

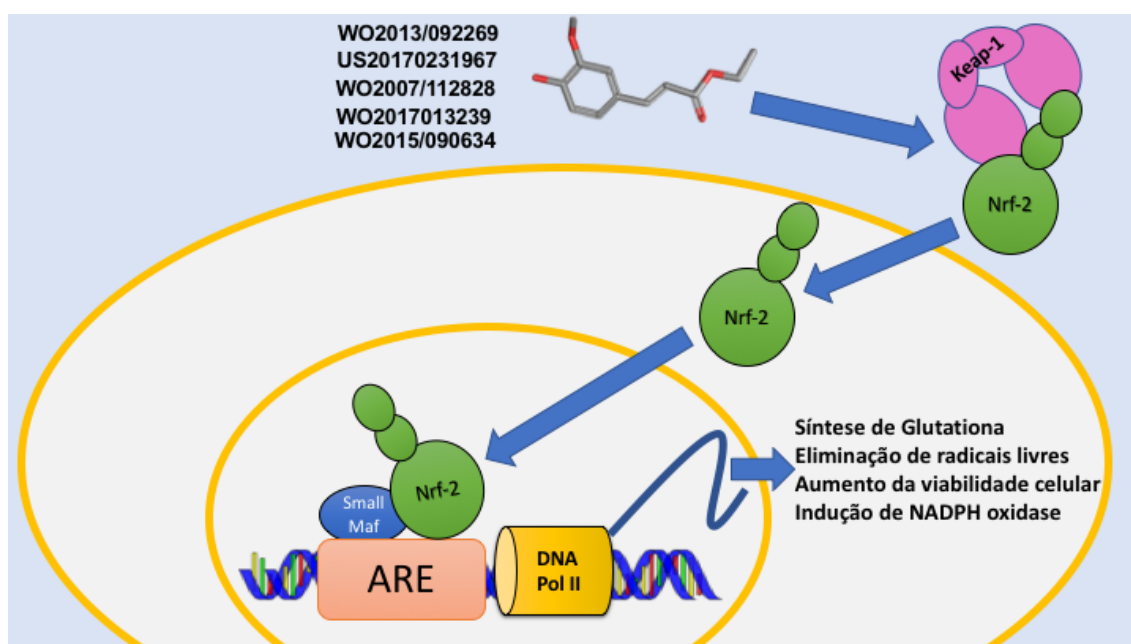
CAPÍTULO 1

Revisão sistemática e prospecção tecnológica: ferulato de etila, um fenilpropanóide com ações antioxidantes e neuroprotetoras

Expert Opinion on Therapeutic Patents

Fator de Impacto: 4,297

Qualis: A1



CAPÍTULO 1

Revisão sistemática e prospecção tecnológica: ferulato de etila, um fenilpropanóide com ações antioxidantes e neuroprotetoras

Francisco Valmor Macedo Cunha¹, Angélica Gomes Coelho², Francisco de Assis Oliveira³, Lívio César Cunha Nunes⁴

1 Doutorando em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio). Mestre em Farmacologia.

2 Doutorando em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio). Mestre em Ciências Farmacêuticas.

3 Doutor em Farmacologia. Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí.

4 Doutor em Ciências Farmacêuticas. Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí.

Resumo

O ferulato de etila é um fenilpropanóide com atividades anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora de origem natural e sintética com potenciais usos na indústria nutracêutica e farmacêutica. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar o cenário atual acerca de patentes e artigos científicos disponíveis envolvendo a substância em questão, no tocante a aspectos como quantidade, áreas do conhecimento e países depositantes. Para tanto, realizou-se prospecção tecnológica e científica nas bases de patentes WIPO, EPO, USPTO e INPI e científica nas bases Pubmed, Web of Science e Lilacs utilizando-se as palavras-chave “ferulic acid ethyl ester” e “ethyl ferulate” nos idiomas inglês e português. Foram incluídos um total de 16 artigos e 17 patentes das quais 10 eram chinesas e 11 reivindicavam o uso do ferulato de etila ou para a síntese de outras substâncias ou métodos de síntese do próprio. Cinco dentre as patentes selecionadas reivindicavam aplicações terapêuticas relacionadas ao tratamento de infecções por micobactérias, utilização como cosmético e atividade

neuroprotetora. A revisão sistemática da literatura revelou atividades antioxidante, neuroprotetora, anti-inflamatória, antimutagênica, antiapoptótica, antimutagênica e antiproliferativa. Assim, o ferulato de etila, apesar de suas atividades farmacológicas conhecidas, é pouco explorado pelas indústrias farmacêutica e nutracêutica.

Palavras-chave: ferulato de etila, biotecnologia, produto natural, antioxidante.

Abstract

Ethyl ferulate is a phenylpropanoid with anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective activities of natural and synthetic origin with potential uses in the nutraceutical and pharmaceutical industry. Therefore, the objective of this study was to investigate the current scenario regarding patents and scientific articles available involving the substance in question, regarding aspects such as quantity, areas of knowledge and depositor countries. In order to do so, we conducted technological and scientific prospecting on the WIPO, EPO, USPTO and INPI and scientific databases in Pubmed, Web of Science and Lilacs databases using the keywords "ferulic acid ethyl ester" and "ethyl ferulate" in English and Portuguese. A total of 16 articles and 17 patents of which 10 were Chinese and 11 claimed the use of ethyl ferulate or for the synthesis of other substances or synthetic methods of the same. Five of the patents selected claimed therapeutic applications related to the treatment of mycobacterial infections, use as a cosmetic and neuroprotective activity. The systematic review of the literature revealed antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, antimutagenic, antiapoptotic, antimutagenic and antiproliferative activities. Thus, ethyl ferulate, despite its known pharmacological activities, is little explored by the pharmaceutical and nutraceutical industries.

Key-words: ferulic acid ethyl ester, biotechnology, natural product, antioxidant.

Introdução

A busca por substâncias efetivas e desprovidas, ao menos em parte, de efeitos adversos é contínua. Devido a diversidade botânica e o uso etnofarmacológico com sucesso de muitas dessas espécies vegetais, a procura por substâncias de origem natural tem obtido relativo sucesso (OLIVEIRA et al, 2011). A ação através de várias vias efectoras e de sinalização para combater patologias talvez seja o fator principal para a efetividade dos produtos naturais (DINARELLO, 2010).

Os fenilpropanóides e seus derivados estão entre os componentes ativos mais comuns de alimentos, aromas, fragrâncias, vinhos óleos essenciais, cervejas e diversos segmentos da medicina tradicional chinesa (VOGT, 2010; SÀ et al, 2014). Tendo em vista as numerosas funções protetoras dos fenilpropanóides nas plantas, essas substâncias são de grande interesse especialmente para o desenvolvimento de produtos medicinais com finalidades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, antivirais, cicatrização de feridas, antibióticas e como protetores aos raios UVB (KORKINA, 2007; SÁ et al, 2014).

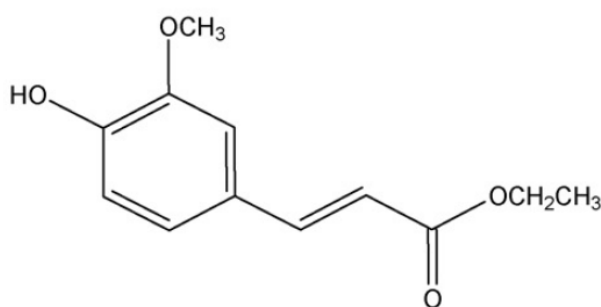
O ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato) ($C_{12}H_{14}O_4$) é um fenilpropanóide derivado do ácido ferúlico amplamente presente em vegetais e especialmente em grãos como arroz e milho (ZHANG et al, 2010). Apesar dos poucos substituintes antioxidantes no anel aromático e na cadeia lateral alquila, possui boa permeabilidade nas membranas biológicas, justificando assim seu melhor perfil antioxidante em relação ao ácido ferúlico (NENADIS; ZHANG; TSIMIDOU, 2003).

Devido a presença da função éster no ferulato de etila, o mesmo possui maior lipofilia em relação ao seu correlato, o ácido ferúlico, atribuindo-lhe maior capacidade de permeio nas barreiras biológicas (SULTANA, 2012). Os derivados estéricos do ácido ferúlico exercem atividade tamponadora de radicais livres e preventiva na formação dos mesmos, principalmente através do aumento na expressão de proteínas antioxidantes como glutathione. Os mecanismos envolvidos em tal resposta relacionam-se a ativação da via do Nrf-2 e inibição do NF- κ B (SULTANA, 2012). Outros efeitos importantes relacionados a atividade anti-inflamatória incluem a inibição do NF- κ B, da COX-2 e da iNOS (ISLAM et al, 2009), indução da quinona redutase (BOLLING et al, 2011), aumento da

expressão da HO-1 (enzima hemeoxigenase) e da proteína HSP-70 (CALABRESE et al, 2008). Tais ações propiciam ao ferulato ação anti-inflamatória (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; PERLUIGI et al, 2006; ISLAM et al, 2009; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), neuroprotetora (SCAPAGNINI et al, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; FENG et al, 2008; GARRIDO et al, 2012), antioxidante (KIKUZAKI et al, 2002; ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; PERLUIGI et al, 2006; CALABRESE et al, 2008; FENG et al, 2008; ISLAM et al, 2009; BOLLING et al, 2011; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), antiapoptótica (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004), antimutagênica (DI DOMENICO et al, 2009), antirreumática e condroprotetora (CUNHA et al, 2016), protetor solar (CLOQUENET et al, 2008) e antiproliferativa (TSAI et al, 2015).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi realizar revisão sistematizada sobre as atividades comprovadas do ferulato de etila e prospecção tecnológica sobre suas aplicações. O artigo foi dividido em duas seções principais compreendendo a revisão sistemática e a prospecção tecnológica.

Figura 1 – Estrutura molecular do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato).



Métodos e Design de estudo

Trata-se de uma prospecção científica e tecnológica realizada em bases de dados e bancos de patentes, respectivamente, com o objetivo de compreender o estado da arte no concernente ao fenilpropanóide ferulato de etila. Para tanto, em ambas as buscas, artigos e patentes, foram utilizadas as palavras-chave “*ferulic acid ethyl ester*” or “*ethyl ferulate*” em inglês ou “ferulato

de etila” em português quando aplicável. As buscas foram realizadas em agosto de 2018 e não foi estabelecida datas de corte para artigos ou patentes.

A prospecção científica foi realizada nas bases de dados *Pubmed*, *Web of Science* e *Lilacs* (Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde) abrangendo as estratégias de busca citadas anteriormente. Inicialmente os artigos foram analisados pela leitura de título e resumo, aqueles elencados para análise foram lidos na íntegra. Artigos de revisão, vias de síntese, descrições de classes de ativos ou artigos que não abordassem o uso do ferulato de etila foram excluídos da pesquisa. Além disso, os artigos duplicados, encontrados em mais de uma das bases utilizadas também foram excluídos. A estratégia de busca, os passos seguidos e resultados quantitativos da busca e análise nas bases de dados estão apresentados na **Figura 2**.

A prospecção tecnológica foi realizada nos bancos de patentes *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A prospecção tecnológica também seguiu a estratégia de busca descrita anteriormente utilizando os descritores para busca nos títulos ou resumos. Foram excluídas patentes ou pedidos de depósito de patentes que não reivindicassem a aplicação do ferulato de etila em seus métodos ou produtos e as patentes duplicadas nos bancos de patentes. A presente prospecção avaliou o número total de depósito de patentes e sua relação com o número de artigos científicos publicados em periódicos especializados. Os documentos patentários investigados foram avaliados também quanto ao ano de depósito, país depositante, instituição depositante, bem como a categoria de acordo com a Classificação Internacional de Patentes. A estratégia de busca, os passos seguidos e resultados quantitativos da busca e análise nos bancos de patentes estão apresentados na **Figura 2**.

Os resultados foram tabulados em planilha do Microsoft Excel, seguida de tratamento estatístico descritivo para a construção de gráficos e tabelas.

Resultados e Discussão

Prospecção Científica

Com base na pesquisa realizada nas bases de dados listadas acima, foram encontrados 167 artigos com os critérios estabelecidos. Todos os artigos nas bases de dados Pubmed e Web of Science. Na triagem inicial foram excluídos 136 artigos que não se encaixaram nos critérios de inclusão através da leitura dos títulos e resumos. Dezesesseis artigos foram excluídos posteriormente por estarem duplicados nas bases de dados analisadas e, por fim, 16 artigos foram inclusos. O esquema de busca e os valores por bases de dados estão descrito na **Figura 02**.

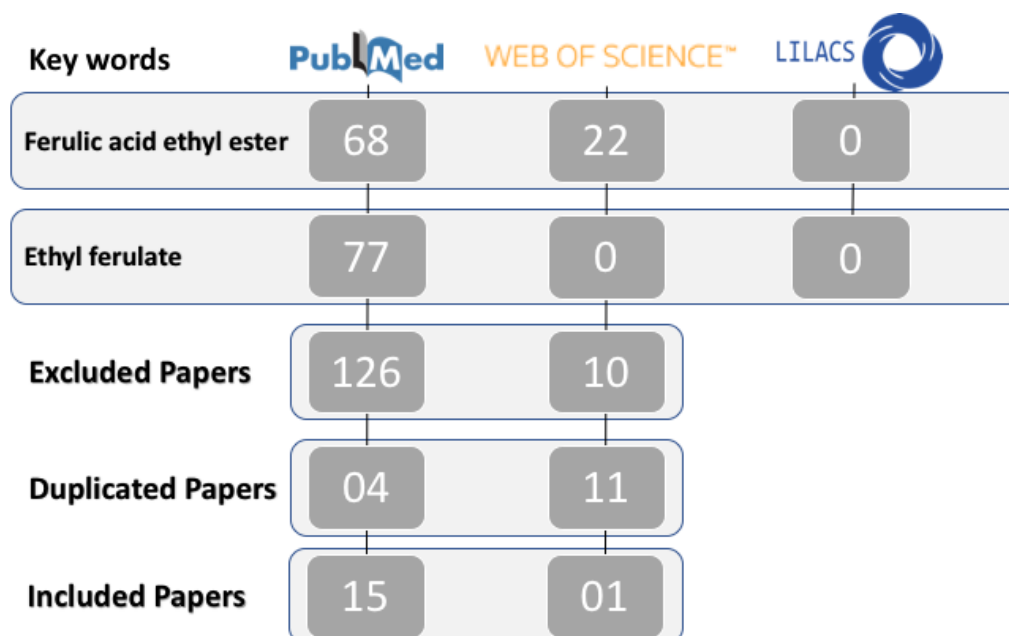


Figura 2 – Estratégia de busca e resultados encontrados em prospecção científica sobre ferulato de etila.

Diversas foram as atividades demonstradas nos artigos selecionados com base na revisão literária dentre as quais pôde-se observar as atividades antioxidante (KIKUZAKI et al, 2002; ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; PERLUIGI et al, 2006; CALABRESE et al, 2008; FENG et al, 2008; ISLAM et al, 2009; BOLLING et al, 2011; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), antiapoptótica (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004), anti-inflamatório (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; PERLUIGI et al, 2006; ISLAM et al, 2009; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), neuroprotetor (Scapagnini et al, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; FENG et al, 2008; GARRIDO et al, 2012), antimutagênico (DI DOMENICO et al, 2009), antirreumático e

condroprotetor (CUNHA et al, 2016), protetor solar (CLOQUENET et al, 2008) e antiproliferativo (TSAI et al, 2015) como representado na **Figura 3**. A maioria dos artigos pesquisados relatou mais de uma atividade com maior ocorrência de associação à avaliação da atividade antioxidante *in vitro*. Devido a este fator, a soma do número de trabalhos na **Figura 2** difere da quantidade de estudos incluídos nesta revisão sistemática e representados em sua maioria por estudos que avaliaram a atividade antioxidante associada à estudos de neuroproteção e avaliação de atividade antiinflamatória.

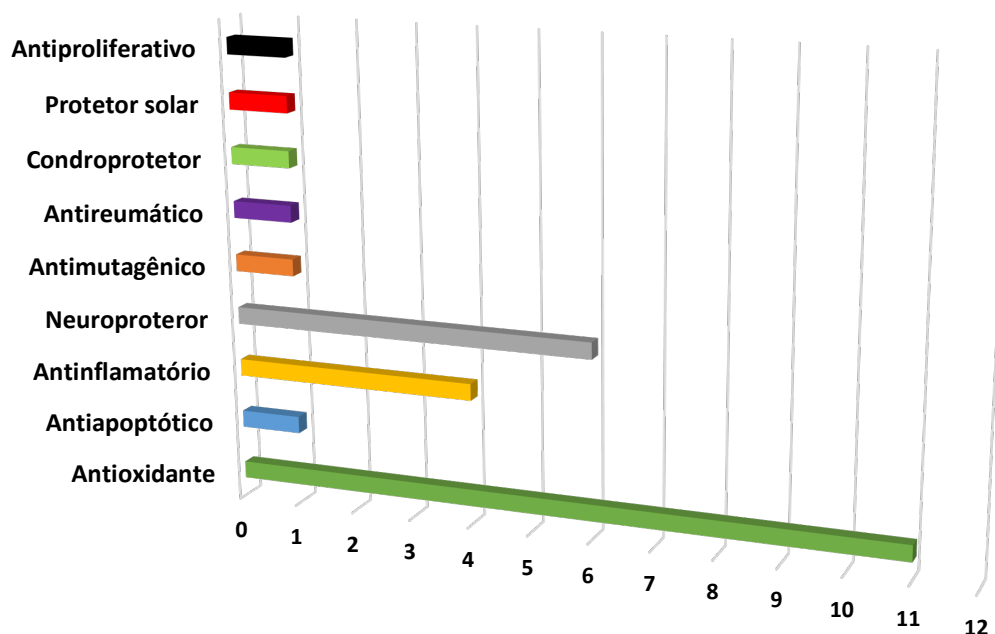


Figura 3 – Efeitos do ferulato de etila demonstrados na literatura pesquisada.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi o tema mais recorrente relacionado ao uso do ferulato de etila (Figura 3). A maior parte dos estudos foram realizados *in vitro* através de culturas celulares diversas (SULTANA et al, 2005; CALABRESE et al, 2008; FENG et al, 2008; ISLAM et al, 2009) ou através dos métodos de ABTS e DPPH (KIKUZAKI et al, 2002; JOSHI et al, 2006; NAZARÉ et al, 2014).

Neste sentido, Calabrese et al (2008) submeteu fibroblastos humanos a meio com concentrações de H₂O₂ variando de 0-1000 $\mu\text{mol/L}$ e as expôs ou não ao ferulato de etila na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$. Os autores observaram que o ferulato de etila na concentração utilizada foi eficiente na diminuição da

oxidação de proteínas e lipídios bem como induziu a expressão de HSP-70 e HO-1 (CALABRESE et al, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Kikuzaki et al (2002) que avaliou o efeito dos ferulato de etila sobre a auto oxidação do metil linoleato e peroxidação de lipossomas de vários derivados do ácido ferúlico através do método de DPPH e APPH. Neste estudo, o ferulato de etila apresentou capacidade varredora de radicais livres de 21% e reduziu a peroxidação de lipossomas induzida por APPH (Kikuzaki et al, 2002).

Além disso, o ferulato de etila mostrou maior potência varredora de radicais livres pelo método de DPPH que o ácido ferúlico além de apresentar atividade inibidora na produção de radicais livres em neutrófilos humanos ativados por zymosan e inibir a formação de ânions superóxido através da inibição do complexo enzimático xantina-xantina oxidase ou através da atividade tamponadora direta (NAZARÉ et al, 2014).

Islam et al (2009) demonstraram que o ferulato de etila (1, 20, 40 e 60 μM) reduziu significativamente a produção de radicais livres em fibroblastos NIH 3T3 expostas a H_2O_2 e macrófagos ativados por LPS expostos a FAEE 10 μM . Em estudo semelhante, neurônios corticais foram pré-tratados com ferulato de etila 10, 25 e 50 μM e posteriormente submetidos a estresse mediante exposição ao peptídeo amiloide- β . O ferulato de etila preservou a viabilidade celular além de diminuir o estresse protéico e lipídico através da diminuição do acúmulo de radicais livres no meio intracelular, aumento da expressão da HO-1 e HSP-70 comparativamente ao grupo controle (Sultana et al, 2005).

Efeitos semelhantes aos observados anteriormente também foram relatados por Joshi et al (2006), Perluigi et al (2006), Feng et al (2008), Cunha et al (2016), O primeiro realizou pré-tratamento de gérbilos com 150 mg/Kg (i.p) de ferulato de etila os quais posteriormente foram eutanasiados para retirada dos neurônios corticais que por sua vez foram expostos a 2-azobis(2-amidino-propano) dihydrochloride (AAPH) ou $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ como agentes indutores de estresse oxidativo. O pré tratamento com ferulato de etila reduziu significativamente o estresse oxidativo induzido por 2-azobis(2-amidino-propano) dihydrochloride (AAPH) e $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ além de induzir o aumento de expressão da HO-1 e HSP-70 (JOSHI et al, 2006). Perluigi et al (2006) fez estudo semelhante onde gérbilos pré-tratados com ferulato de etila ou dimetilsufóxido

via i.p. (150 mg/Kg) foram eutanasiados para isolamento dos sinaptosomos os quais foram incubados com peptídeo amiloide B 1-42. Os autores observaram que o grupo tratado com ferulato de etila preveniu a oxidação protéica e peroxidacao lipídica HO-1.

Cunha et al (2016) avaliaram marcadores de estresse oxidativo (TBARS, grupos sulfidrílicos, superóxido dismutase e catalase) em ratos submetidos a modelo de bolsa de ar ativada por carragenina tratados com ferulato de etila por via oral nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. O ferulato de etila nas doses de 100 e 100 mg/Kg inibiu superóxido dismutase, catalase e aumentou a concentração de tióis totais indicando importante ação antioxidante *in vivo*. Feng et al (2008), avaliou o efeito do ferulato de etila (1uM) sobre TBARS e grupos carbonílicos em mitocôndrias hepáticas e cerebrais isoladas de ratos submetidos modelo de isquemia-reperfusão. O ferulato de etila na concentração de 1 uM apresentou diminuição da peroxidação lipídica e protéica (Feng et al, 2008).

Os efeitos relacionados às ações do ferulato de etila como agente antioxidante tem sido imputadas tanto a sua atividade tamponadora de radicais livres quanto á ação na via clássica Keap1-Nrf2. Ratos com alimentação suplementada com 0,1 e 1% de FE apresentaram maior concentração de tióis totais nos rins e cólon (BOLLING et al, 2011).

De tal modo que diante de um estresse oxidativo, através do sistema de sinalização Keap1-Nrf2 (fator nuclear E2) há aumento da transcrição de enzimas antioxidantes por intermédio do ARE (elemento de resposta antioxidante) (NGUYEN; NIONI; PICKETT, 2009; BRIGELIUS-FLOHÉ; KIPP, 2012). Fato importante a ser relacionado é que nos estudos citados anteriormente há aumento de atividade ou na concentração de enzimas quando há presença de ferulato de etila, sugerindo ação sobre tais sistemas.

Neuroproteção

No geral, substancias antioxidantes são relacionadas a atividade neuroprotetora (WOJTUNIK-KULESZA et al, 2016). Isso deve-se basicamente pelo fato de que a fisiopatologia de doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso frequentemente estão imbrincadas a mecanismos de aumento de

estresse oxidativo (CHEN; GUO; KONG, 2012; FEDERICO et al, 2012; KIM et al, 2015; NIEDZIELSKA et al, 2016).

O ferulato de etila como discutido anteriormente possui tais propriedades (SCAPAGNINI et al, 2004; JOSHI et al, 2006; GARRIDO et al, 2012) e, por isso, tem sido testado especialmente para prevenção de dano por isquemia-reperfusão (FENG et al, 2008) ou para doenças crônico-degenerativas como Alzheimer (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; SULTANA et al, 2005). Não obstante do que foi discutido até aqui, todos os estudos que avaliaram atividade neuroprotetora do ferulato de etila testaram concomitantemente o efeito antioxidante.

Scapagnini et al (2004), observou que o ferulato de etila induziu a transcrição de mRNA para HO-1 bem como aumentou a tradução e atividade de HO-1 tanto em cultura de astrócitos quanto de células hipocâmpais de ratos. Em outro trabalho, gérbilos foram pré tratados com 150 mg/Kg (i.p) de ferulato de etila e posteriormente eutanasiados. Neurônios corticais foram retirados e expostos a 2-azobis(2-amidino-propano) dihydrochloride (AAPH) ou $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ como agentes indutores de estresse oxidativo. O pré tratamento com ferulato de etila induziu aumento de expressão da HO-1 e HSP-70 e reduziu a expressão de iNOS (JOSHI et al, 2006). Entretanto, os achados de Garrido et al (2012) não corroboram com os apresentados nos estudos anteriores ao demonstrar que o ferulato de etila nas concentrações 0.2, 1, 5 e 25 μM não inibe significativamente a diminuição da viabilidade celular induzida por H_2O_2 em células PC12. Tais achados divergentes podem estar associados a diferentes linhagens celulares utilizadas, modelos de lesão neural e as concentrações e doses diferentes utilizadas por estes estudos.

No que concerne a utilização do ferulato de etila em modelos animais de doença, o mais utilizado foi toxicidade induzida por peptídeo amiloide β . Nesse sentido, Sultana et al (2005) avaliou o efeito protetor do ferulato de etila (10, 25 e 50 μM) sobre neuronios corticais expostos ao peptídeo amiloide- β . Os autores observaram que o ferulato de etila preservou a viabilidade celular da diminuição na expressão da enzima iNOS, aumento da expressão da HO-1 e HSP-70 comparativamente ao grupo controle. Ainda neste sentido, Perluigi et al (2006), observou diminuição da expressão da iNOS (óxido nítrico indutível) e aumento

da expressão de HO-1 (heme-oxigenase 1) em sinaptosomos, expostos ao peptídeo amiloide β , de gérbilos submetidos a pré-tratamento (*i.p*) com FAEE ou dimetilsufóxido (150 mg/Kg). Em estudo semelhante Abdul e Butterfield (2004) observaram que neurônios corticais de gérbilos submetidos a pré-tratamento com ferulato de etila (25 μ M) e posteriormente expostos ao peptídeo amiloide β possuíam maior viabilidade devido inibição da apoptose mediante diminuição da liberação de citocromo c. Este último resultado complementa aqueles encontrados por Sultana et al (2005) uma vez que justifica a maior viabilidade neuronal por inibição do processo apoptótico.

Feng et al (2008), avaliou o efeito protetor do ferulato de etila (1 μ M) sobre mitocôndrias hepáticas e cerebrais isoladas de células de camundongo submetidas a isquemia-reperfusão. O efeito foi avaliado através do consumo de oxigênio, TBARS e pesquisa de grupos carbonílicos. O ferulato de etila na concentração de 1 μ M apresentou efeito protetor da mitocôndria submetida a isquemia-reperfusão através da diminuição da peroxidação lipídica e protéica bem como pela estabilização da membrana mitocondrial.

Antinflamatório e antirreumático

Os possíveis mecanismos envolvidos na resposta antiinflamatória observada do ferulato de etila relaciona-se a sua atividade antioxidante e a ativação da via do Nrf-2 e inibição do NF- κ B (SULTANA, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que fitoquímicos com capacidade antioxidante desempenham papel fundamental na inativação da via de sinalização do NF- κ B através da expressão de complexos enzimáticos desintoxicantes tais como catalase, sistema glutathiona peroxidase/ glutathiona S-transferase e quinona oxi-redutase (SURH, 2008). A indução das enzimas antioxidantes, ou detoxificação de fase II, representa um dos mais importantes componentes dos mecanismos de defesa celular e, dessa forma, a variedade de tóxicos eletrofílicos e oxidativos podem ser eliminados das células antes da lesão genômica do DNA (NGUYEN; NIONI; PICKETT, 2009; BANERJEE, 2012; LUGRIN et al, 2014).

Nesse sentido, Islam et al (2009), observou que quando tratados com ferulato de etila (1, 10, 20, 40 e 60 μ M), fibroblastos NIH 3T3 submetidos a

estresse por H₂O₂ e macrófagos ativados por LPS havia redução significativa da produção de radicais livres com concomitante inibição da ativação do Nf-kB. Nazaré et al (2014) observou diminuição significativa na ação da xantina oxidase em neutrófilos humanos ativados por Zymosan submetidos a ferulato de etila a 10 e 100 uM. Neste mesmo estudo, os autores desenvolveram e caracterizaram uma emulsão com perfil de liberação prolongada do ferulato, 25% de liberação após 8 horas, interessante ferramenta para aplicações tópicas.

Apenas um estudo avaliou a atividade antiinflamatória do ferulato de etila *in vivo*. Neste estudo diversos modelos foram utilizados como o de screening de drogas antiinflamatórias, edema de pata induzido por carragenina, bolsa de ar subcutânea ativada por carragenina e monoartrite induzida por ACF (Adjuvante completo de Freund). Os animais foram tratados com ferulato de etila 25, 50 e 100 mg/kg *v.o.* Em todos os modelos testados houve melhora significativa nos aspectos inflamatórios analisados como nas concentrações de Tnf- α , Il-1B, MPO, contagem total de leucócitos, produção de NO₂ e de TBARs além de aumento da atividade da catalase, glutathiona e SOD nos animais (CUNHA et al, 2016). Outro aspecto interessante analisado no trabalho é a atividade condroprotetora apresentada pelo ferulato de etila no modelo de inflamação crônica induzida por ACF.

Em suma, há evidências de que o ferulato de etila exerça ação antiinflamatória através de mecanismos relacionados a sua atividade antioxidante, inibição da ativação do Nf-kB, iNOS, diminuição na concentração de citocinas pro-inflamatórias (KIKUZAKI et al, 2002; SULTANA et al, 2005; PERLUIGI et al, 2006; DI DOMENICO et al, 2009; ISLAM et al, 2009; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016).

Outros Efeitos

Antiproliferativo - Células endoteliais A10 foram induzidos com leptina 100 ng/mL. As culturas celulares foram tratadas com ferulato de etila (1-100 uM). O ferulato de etila reduziu a proliferação e migração celular induzidas pela leptina através do aumento da expressão das proteínas ciclina D1, p21, β -catenina e

diminuição da expressão de p27 incluindo a inibição da fosforilação da p44/42 MAPK e MMP-9 (TSAI et al, 2015).

Protetor solar – Cloquet et al (2008) produziram um creme protetor solar em base O/A contendo ferulato de etila como bloqueador solar em diferentes concentrações. O bloqueador solar contendo 10% de ferulato de etila apresentou poder bloqueador máximo de UVA e UVB.

Antimutagênico - Melanócitos humanos foram previamente tratados com ferulato de etila e posteriormente submetidos a radiação UVB (50 J/m²). Os melanócitos foram avaliados quanto a viabilidade, presença de EROs, presença de apoptose, HSP-70, HO-1, PARP e iNOS. O ferulato de etila nas concentrações 25 e 50 uM aumentou a viabilidade de melanócitos submetidos ao UVB através da diminuição da concentração de ROS, aumento da expressão de HSP-70 e HO-1 e diminuição da expressão de iNOS (DI DOMENICO et al, 2009). Interessante ressaltar que o efeito aqui observado pode ser justificado pela ação protetora relatada por Cloquet et al (2008).

Prospecção Tecnológica

A partir dos dados coletados nas bases de patentes INPI, USPTO, WIPO e EPO foi realizada análise inicial dos pedidos de patentes depositados nas bases de acordo com os esquemas de busca citados anteriormente. Constatou-se então que apenas as pesquisas realizadas com o termo “ferulic acid ethyl ester” retornou resultados de patentes sendo, trinta e uma (31) no WIPO, quatro (4) na USPTO e dez (10) no EPO. As pesquisas realizadas na base do Instituto Nacional de Patentes e Propriedade Intelectual não encontraram patentes depositadas ou concedidas **Figura 4**. Das 45 patentes encontradas 28 foram excluídas por estarem duplicadas em diferentes bases de patentes, totalizando então 17 patentes incluídas na prospecção das quais cinco (05) referem-se a patentes para fins terapêuticos.

Como discutido anteriormente, concomitante a prospecção tecnológica também foi realizada a prospecção científica utilizando termos idênticos para ambas. Com base na análise comparativa, pedidos/depósitos de patentes versus publicações científicas (**Figura 5**), as publicações acerca do ferulato de etila

iniciam-se em 2001 ao passo que as primeiras patentes foram pedidas/depositadas apenas em 2008. Após este ano os picos de publicação e de pedidos/depósitos de patentes não coalesceram quanto a temática. Desta forma, enquanto as quatro patentes apresentadas em 2008, pico máximo de patentes sobre o ferulato de etila, reivindicaram métodos para síntese de substâncias a base de ferulato de etila (HUANG; TAN, 2008; ZHU et al, 2008; JIN et al, 2008; WANG et al, 2008), os três artigos publicado no mesmo ano relataram atividade antioxidante (CALABRESE et al, 2008), neuroprotetora (FENG et al, 2008) e fotoprotetora (CLOQUENET et al, 2008) da mesma substância.

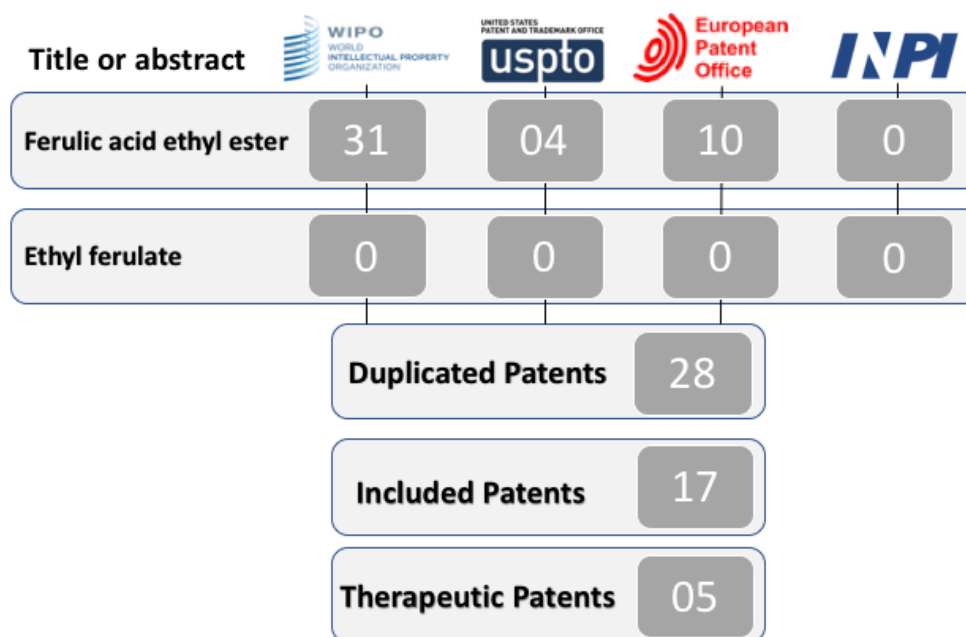


Figura 4 – Estratégia de busca e resultados encontrados em prospecção tecnológica sobre ferulato de etila.

Das patentes analisadas, dez (10) são de origem chinesa, duas (02) de origem francesa, e as outras cinco (05) são da Alemanha, República da Coreia, Japão, Suíça e Estados Unidos respectivamente (**Figura 6**). Tal achado pode ser justificado pelo fato de a China ser o maior produtor mundial de arroz (Wang et al, 2014) cuja casca é fonte importante de ferulato de etila (Zhang et al, 2010). Além disso, a China tem se consagrado cada vez mais como produtora de conhecimento e desenvolvimento de tecnologia principalmente pela implantação

de multinacionais dos ramos farmacêutico, eletrônica e alimentar e implementação de programas de subsídio a pesquisa (FISCH; BLOCK; SANDNER, 2014).

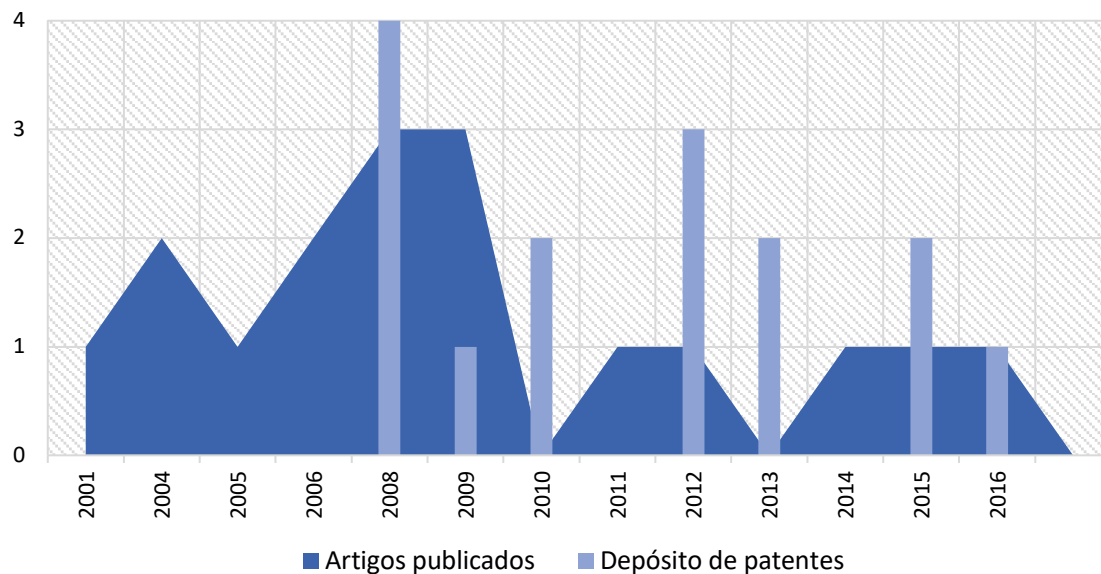


Figura 5 – Relação entre a quantidade de patentes depositadas e artigos científicos publicados entre os anos de 2002 e 2016.

Todavia, deve-se destacar o fato de nenhuma patente ter sido encontrada na base de patentes do Brasil, o INPI, embora este seja um país com largo cultivo de grãos como milho e arroz, o que pode sugerir a ausência de pesquisa expressiva acerca deste derivado fenilpropanoide ou ainda a não proteção patentária aos possíveis produtos a serem desenvolvidos como resultados de pesquisas brasileiras, já divulgadas através de publicações científicas (NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al., 2016).

Além disso, dentre os mercados farmacêuticos emergentes como China e Brasil, considera-se que a adesão da China ao TRIPS (*Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights*, o qual entrou em vigor em 1995 no âmbito da Organização Mundial do Comércio) teve efeitos muito mais positivos e harmoniosos para o país quando comparado ao Brasil, já que a China já havia aplicado mudanças em sua legislação de Propriedade Industrial antes mesmo de assinar o acordo, a fim de atrair investimentos estrangeiros e incentivar o acesso chinês às novas tecnologias. Assim, o país previa a proteção de produtos e processos em todos os setores de sua economia desde 1992, ao

passo que o Brasil reestruturou sua política em Propriedade Industrial apenas em 1996, através da Lei de Patentes (Lei nº 9279/1996). Foi neste contexto e através de uma atitude do governo chinês voltada para alavancar a inovação, que o país aumentou seu nível de patentes intelectuais de forma diferente de outros países em desenvolvimento (AKKARI et al., 2016).

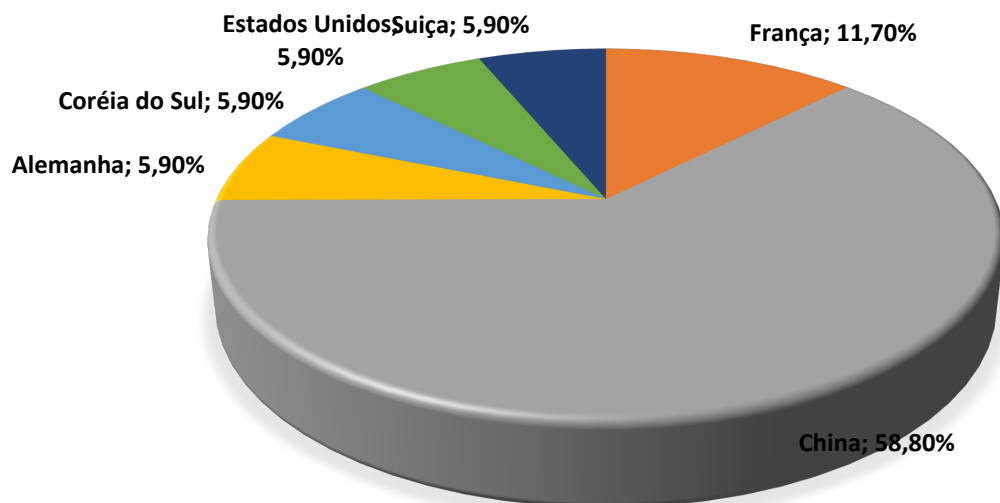


Figura 6 - Distribuição do número de patentes em função do país de origem da tecnologia.

No tocante à Classificação Internacional de Patentes (CIP), sete (07) das patentes analisadas estão relacionadas a área C12P, cujos produtos referem-se à aplicação bioquímica; cerveja; álcool; vinho; vinagre; microbiologia; enzimologia; engenharia genética ou de mutação. Além destas, duas patentes estão relacionadas à área C07C (Compostos acíclicos ou carbocíclicos), que inclui produtos em Química Orgânica, que se aplica à agricultura; silvicultura; pecuária; caça; captura em armadilhas; pesca, nove patentes referem-se a área A61K, destinada à aplicação em ciência médica ou veterinária e higiene, respectivamente e uma patente relacionada a área C07D cujos produtos referem-se a compostos heterocíclicos (**Figura 7**).

Concernente às reivindicações realizadas nas patentes acessadas, 11 delas exploraram o ferulato de etila para síntese de outras substâncias como o

ácido ferúlico, fosfoglicerídeo do ácido ferúlico, ácido feruláico glicerídico, palmitoil ferulato de etila, glicerol ferulado, acil glicerídico ferúlico e acyl aleoyl glicerídeo ferúlico (WO2009/056070; CN102943095; JP2012205539; CN102516079; CN101392275; CN101219953; CN101215587; CN101200738; CN101200737; EP2886657; EP2213666). Uma patente reivindicou método de produção de extrato de folhas de bambu rico em ferulato de etila (KR20130071918); outra patente reivindicou um processo de síntese do ferulato de etila (CN102516079); uma outra patente reivindica a utilização do ferulato de etila em associação com um ou mais alquil ferulatos na formulação de cosméticos com atividade antimicrobiana (WO2015/090634); uma outra relaciona composições farmacêuticas contendo agonistas PPAR e ativadores Nrf-2 incluindo o ferulato de etila (WO2013/092269); a patente WO2007/112828 reivindica o uso de diversos xantatos associados a ciclodextrinas para tratamento de várias doenças; a patente US20170231967 reivindica formulações farmacêuticas contendo inibidores de Bach1 e ativadores de Nrf-2 incluindo o ferulato de etila para tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso central. Por fim, a patente WO2017013239 reivindica a utilização de ativadores Nrf-2 para o tratamento de infecções por micobactérias (**Quadro 1**).

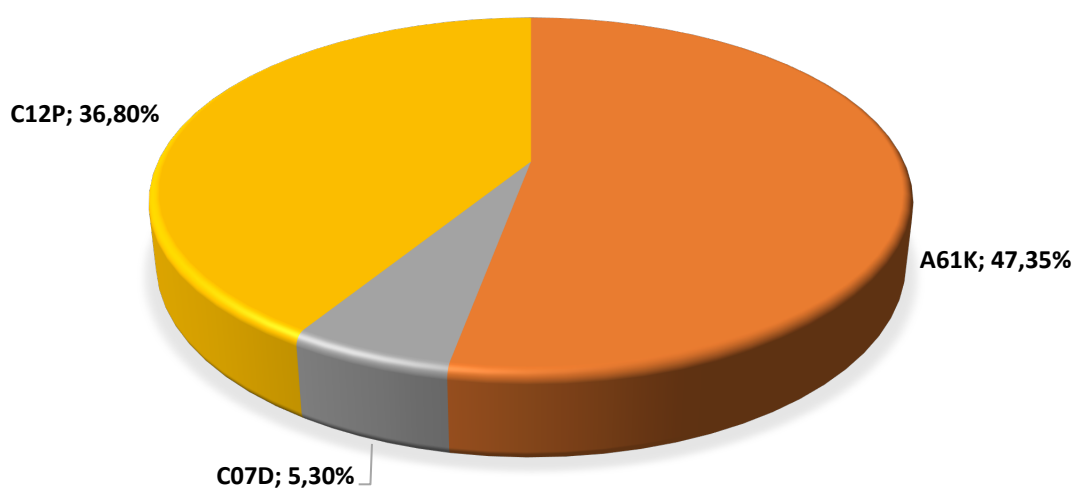


Figura 7 – Percentual de ocorrência dos documentos patentários de acordo com a Classificação Internacional de Patentes. Legenda: A61K - Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. C07C - Compostos

acíclicos ou carbocíclicos. *C07D* - Compostos heterocíclicos. *C12P* - Processos de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica.

Ainda com destaque para a classificação A61K, relacionada às preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas, o ferulato de etila é citado na patente de Bonay, Deramaudt e Collin (2016), dentre outros ativadores do fator de transcrição nuclear Nrf2, para tratamento de infecções por micobactérias em pacientes com HIV, imunodeprimidos e com doença renal terminal. A atividade ativadora de Nrf2 foi também reivindicada por Colin (2017), cuja patente protege um método de tratamento de esclerose múltipla, psoríase, asma, doença intestinal inflamatória e artrite através de composição farmacêutica de agonistas de receptores proliferadores peroxissomais (PPAR) e ativadores Nrf-2.

Além disso, o ferulato de etila foi considerado por Attucks (2016), no desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo inibidores de Bach1 e ativadores de Nrf-2, para tratamento de doenças como esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica e psoríase.

Outro interessante achado nesta prospecção foi a evidente participação de universidades como detentoras das patentes e, de forma particular, universidades chinesas. Dessa forma, das patentes relacionadas ao ferulato de etila, 50% destas foram depositadas por tais instituições. O interesse crescente na transferência de tecnologia em universidades ao redor do mundo conduziu a um aumento no número de patentes depositadas nos últimos anos, sobretudo na China, o que representa uma evolução no âmbito da pesquisa científica acadêmica, visto proporcionar o incentivo ao desenvolvimento de produtos inovadores com grande potencial em solucionar carências da sociedade em geral (Fisch et al, 2014).

De acordo com a prospecção científica realizada em concomitância na base de dados *Web of Science*, dois artigos suportam a utilização do ferulato de etila em formulações cosméticas por suas características protetoras a radiação UVB (CLOQUENET et al, 2008; DI DOMENICO et al, 2009). Na base de dados pesquisada não há evidências sobre a atividade antimicrobiana requerida por

uma das patentes analisadas (WO2017013239). Os demais efeitos comprovados para o ferulato de etila estão elencados na **Figura 4**.

Fato que pode teorizar a ação antimicrobiana do ferulato de etila reclamada pela patente WO2017013239 é a ação sobre a via Nrf-2 e a indução da enzima NADPH oxidase, uma das responsáveis principais pela produção e liberação de radicais livres por células polimorfonucleares e fágicas (BABIOR, 2004; JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011; KVIETYS; GRANGER, 2012; KALYANARAMAN, 2013).

De acordo com as publicações científicas analisadas, pôde-se observar que a comprovação das atividades anti-inflamatória (NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), neuroprotetora (Abdul; Butterfield, 2005; Sultana et al, 2005; Joshi et al, 2006; Perluigi et al, 2006; Sultana, 2012), antioxidante (Calabrese et al, 2008; Bolling et al, 2008; Shahidi; Chandrasekara, 2010; Bolling et al, 2011; Qiu et al, 2014) e vasculoprotetora (Tsai et al, 2015; Cheng, 2015; Cheng et al, 2014), do ferulato de etila, estão relacionadas às reivindicações das patentes supracitadas, classificadas na categoria A61K, tais como preparações para tratamento de esclerose múltipla, psoríase, asma, doença intestinal inflamatória e artrite (Colin, 2017).

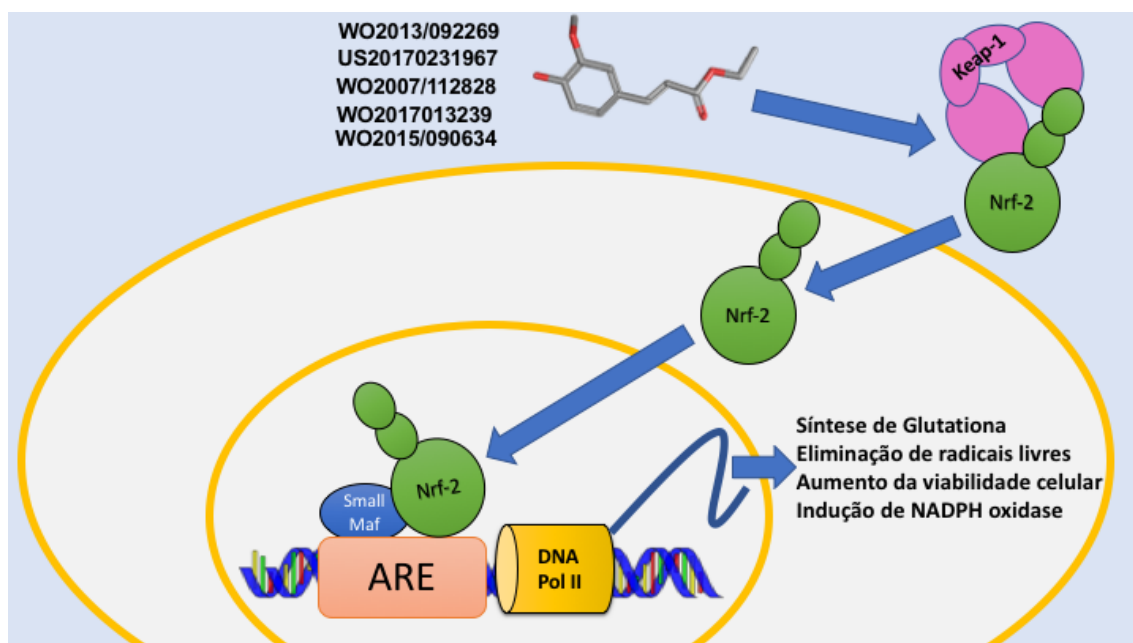


Figura 8 – Patentes terapêuticas e possível via de ação para a atividade reclamada associada ao ferulato de etila.

Visivelmente as patentes com finalidades terapêuticas elencadas nesta prospecção baseiam-se nos achados concernentes a atividade antioxidante e ativadora da via do Nrf-2 discutidas anteriormente na prospecção científica (**Figura 8**). Deve-se ressaltar ainda que a patente depositada por Amtmann e Eberhard (2013) protege formulações para tratamento de Alzheimer, doenças virais, tumorais, cardiovasculares, e doenças autoimunes, como os reumatismos. Todavia, tal documento abrange produtos com compostos xantados (derivados alquílicos ou arílicos do ácido ditiocarbônico) e ciclodextrinas, sendo o ferulato de etila citado apenas no referencial teórico da referida publicação, como exemplo de substância detentora de algumas destas atividades.

Assim, a análise das patentes depositadas frente às publicações científicas demonstra a aplicabilidade promissora do ferulato de etila em inovação tecnológica na área médico-farmacêutica e nutracêutica, ao passo que o interesse em novas vias de síntese deste composto demonstra a grande possibilidade de otimização da cadeia industrial de produção que o envolve.

Quadro 1 – Patentes e reivindicações relacionadas ao ferulato de etila e suas aplicações.

Número da Patente	Inventores	Título da Patente	Reinvindicações	Ano de Depósito
WO2015/090634	Wolfgang Beilfuss Klaus Weber Peter Oltmanns Sabine Herweg Sarah Erichsen Carsten Bungenstock	Composition comprising ferulic acid ethyl ester and aryl alkanol	Composição contendo ferulato de etila na sua forma trans, cis ou mistura racêmica com concentração variando de 1% a 30% e de 70% a 95% de um, dois ou três aryl alkanols em forma de emulsão água/óleo ou óleo/água para uso tópico com ação antimicrobiana.	2014

WO2013/ 092269	Kahrs Bjoern Colin	Pharmaceutical compositions comprising glitazones and Nrf2 activators	Método de tratamento de esclerose múltipla, psoríase, asma, doença intestinal inflamatória e artrite através de composição farmacêutica de agonistas de PPAR e ativadores Nrf-2 (incluindo o ferulato de etila).	2012
WO2007/ 112828	Eberhard Amtmann	Associations of xanthogenates and cyclodextrins, and their use	Formulações farmacêuticas contendo xantados e ciclodextrinas para tratamento de Alzheimer, doenças virais, tumoriais, cardiovasculares, e doenças autoimunes como reumatismos, esclerose múltipla, alopecia areata, lúpus eritematoso, acidente vascular encefálico, edema pulmonar, ou para uso como radioprotetor.	2006
WO2009/ 056070	Jiaming Li Guangwei He Yonghai Zhao Fengshi Ma Yong He Qiang Wu Feng Li	4-((3, 5, 6- trimethylpyrazine-2-yl) methoxyl) benzoic acid and its derivatives	Utilização do ferulato de etila para síntese do 4-((3, 5, 6- trimethylpyrazine-2-yl) methoxyl) benzoic acid e seus derivados	2007
KR20130 071918	Um Byung Hun Shang Ya Fang (+5)	Method for extracting bambusoideae's leaves using subcritical solvents	Método para extração de substâncias incluindo o ferulato de etila das folhas de bambu.	2011
CN10294 3095	Yang Tiankui Yang Hongli (+1)	Enzymatic synthesis method of ferulic acid phospho glyceride	Utilização do ferulato de etila para a síntese enzimática ferulic acid glycerophospholipid	2012

JP201220 5539	Uenishi Kanji Azuma Naoki (+1)	Method of manufacturing ferulic acid containing fraction	Método para produção de ácido ferúlico incluindo etapa de fermentação por bactérias ácido-láticas em material vegetal.	2011
CN10251 6079	Kai Tang Chuanjie Xiong	Novel ferulic acid deriv ative, its application and synthetic method	Método para a síntese de um novo derivado do ácido ferúlico com a utilização do ferulato de etila	2011
CN10139 2275	Yingkun Cheng Rui Fei (+3)	Method for synthesizing ferulic acid glyceride in surfactant modified organic solvent	Método para síntese do ácido ferúlico glicérido utilizando reação catalisada por lipase de <i>Candida rugosa</i> entre ferulato de etila e triglicéridos	2009
CN10121 9953	Zhengmei Huang Guohong Tan	Production and application of palmitoyl ferulic acid et hyl ester	Método para produção de palmitoil ferulato de etila através da reação entre ferulato de etila e ácidos graxos de cadeia longa.	2008
CN10121 5587	Limin Zhu Yan Zheng (+2)	Solvent-free system biological catalysis fast synthesis method for feruloylated glycerol	Método rápido para a síntese de ácido ferúlico glicérido através da reação entre ferulato de etila e glicerol sem adição de solvente	2008
CN10120 0738	Qingzhe Jin Shangde Sun (+3)	Enzymatical method for synthesizing water- soluble ferulic acyl glyceride	Método para síntese de feruloil glicérido utilizando o ferulato de etila através de reação enzimática	2007

CN10120 0737	Xingguo Wang Shangde Sun (+3)	Enzymatical method for synthesizing oil- soluble ferulic acyl oleoyl glyceride	Método de síntese enzimática de feruloil oleil glicerídeo através do ferulato de etila	2007
US20170 231967	Otis Clinton Attucks	Bach1 Inhibitors in Combination with Nrf2 Activators and Pharmaceutical Compositions Thereof	Formulações farmacêuticas contendo inibidores de Bach1 e ativadores de Nrf-2 incluindo o ferulato de etila para tratamento de doenças como esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica e psoríase	2014
WO20170 13239	Marcel Bonay Thérèse Deramautd	Nrf2 activators for the treatment of mycobacterial infections	Utilização de ativadores Nrf2 dentre eles o ferulato de etila para tratamento de infecções por micobactérias em pacientes com HIV, imunodeprimidos, doença renal terminal.	2015
EP28866 57	Laura Nyström Aline Schär	Enzymatic synthesis of phenolic acid esters and steryl phenolates	Método para obtenção de um ácido fenólico esterificado utilizando o ferulato de etila.	2013
EP22136 66	Yonghai Zhao Fengshi Ma Yong He Qiang Wu Feng Li	Ligustrazine aromatic acid ether derivative, its preparation method, pharmaceutical composition, and application	Método para síntese de derivado etil ester do ligustrazine para tratamento de doença cerebrovascular e cardiovascular.	2007

Conclusão

De acordo com os dados apresentados até aqui, pode-se afirmar que o desenvolvimento de tecnologia relacionado ao ferulato de etila ainda é muito incipiente sob o ponto de vista que a maioria das patentes abordam a síntese de compostos ou a extração e síntese do próprio ferulato de etila, e que, apenas cinco patentes atribuem tecnologia e aplicabilidade a tal substância. Dessa forma, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas e de tecnologias que contribuam para a aplicabilidade desta substância com amplas referências farmacológicas e nutracêuticas.

Referências

ABDUL, H. M.; BUTTERFIELD, D. A. Protection against amyloid β -peptide (1–42)-induced loss of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by tricyclodecan-9-xanthogenate (D609) and ferulic acid ethyl ester: Implications for Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**. Vol. 1741, pp. 140–148, 2005.

AKKARI, Alessandra Cristina Santos; MUNHOZ, Igor Polezi; TOMIOKA, Jorge; DOS SANTOS, Neusa Maria Bastos Fernandes; DOS SANTOS, Roberto Fernandes. Pharmaceutical innovation: differences between Europe, USA and 'pharmerging' countries. **Gest. Prod.** vol.23 no.2 São Carlos Apr./June 2016 Epub June 14, 2016.

ANSELMINI, Cecilia; CENTINI, Marisanna; ANDREASSI Marco; BUONOCORE, Anna; LA ROSA, Caterina; FACINO, Roberto Maffei; SEGA, Alessandro; TSUNO, Fumi. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 35, p. 1241–1249, 2004.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, vol. 16, p. 42–47, 2004.

BANERJEE, R. Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 287, p. 4397–4402, 2012.

BOLLING, Bradley W.; JI, Li Li; LEE, Chen-Hsien; PARKIN, Kirk L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. P. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. **Annals New York Academic Sciences**. vol. 1259, p. 19–25, 2012.

CALABRESE, Vittorio; Calafato, Stella; PULEO, Eduardo; CORNELIUS, Carolin; SAPIENZA, Maria; MORGANTI, Pierfrancesco; MANCUSO, Cesare. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 358–363, 2008.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural. Regen. Res.**, vol. 7, n. 5, pp. 376–385, 2012.

CLOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Interest of ferulic acid ethyl ester in photoprotective creams: Measure of efficacy by in vitro method. **Nat Prod Res**. Vol. 22, n. 16, pp. 1467–1471, 2008.

CUNHA, F. V. M.; GOMES, B.S.; SOUSA NETO, B.; FERREIRA, A. R.; SOUSA, D. P.; MARTINS, M. C. C.; OLIVEIRA, F. A. Ferulic acid ethyl ester diminished Complete Freund's Adjuvant-induced incapacitation through antioxidant and anti-inflammatory activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. Vol. 389, pp. 117–130, 2016.

DI DOMENICO, F.; PERLUIGI, M.; FOPPOLI, C.; BLARZINO, C.; COCCIA, C.; DE MARCO, F.; BUTTERFIELD, D. A.; CINI, C. Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. **Free Radic Res.** Vol. 43, n. 4, pp. 365-375, 2009.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology.** vol. 37(Suppl 1), p. S34–S45, 2007.

FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G. N.; RADI, E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **J. Neurologic. Sci.**, vol. 322, n. 1-2, pp. 254-262, 2012.

FENG, Y.; LU, Y. W.; XU, P. H.; LONG, Y.; WU, W. M.; LI, W.; WANG, R. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia–reoxygenation: Relationship to their antioxidant activities. **Biochim Biophys Acta.** Vol. 1780, pp. 659–672, 2008.

FISCH, C. O.; HASSEL, T. M.; SANDNER, P. G.; BLOCK, J. H. University patenting: a comparison of 300 leading universities worldwide. **J Technol Transf,** vol. 40, p. 318–345, 2015.

FISCH, C.; BLOCK, J.; SANDNER, P. Chinese university patents: Quantity, quality, and the role of subsidy programs. SSRN Working Paper, 2014.

GARRIDO, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, M.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; POURALI, S.; SASO, L.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity. **Biochim.** Vol. 94, pp. 961-967, 2012.

HOSODA, Asao; OZAKI, Yoshihiko; KASHIWADA, Ayumi; MUTOH, Michihiro; WAKABAYASHI, Keiji; MIZUNO, Kazuhiko; Nomuraa, Eisaku; Taniguchi, Hisaji. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on

cyclooxygenase-2 promoter activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 10, p. 1189–1196, 2002.

ISLAM, Shafiqul; YOSHIDA, Hiroshi; MATSUKI, Naoaki; ONO, Kenichiro; NAGASAKA, Reiko; USHIO, Hideki; GUO, Ying; HIRAMATSU, Toshiyuki; HOSOYA, Takamitsu; MURATA, Takahisa; HORI, Masatoshi; OZAKI, Hiroshi. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- κ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **J Pharmacol Sci**, vol. 111, p. 328 – 337, 2009.

JIANG, F.; ZHANG, Y; DUSTING, G. J. NADPH Oxidase-mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacological Reviews**, vol. 63, p. 218–242, 2011.

JOSHI, Gururaj; PERLUIGI, Marzia; SULTANA, Rukhsana; AGRIPPINO Ravagna; CALABRESE, Vittorio D.; BUTTERFIELD, Allan. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe²⁺/H₂O₂: Insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, vol. 48, p. 318–327, 2006.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, vol. 01, p. 244–257, 2013.

KIKUZAKI, Hiroe; HISAMOTO, Masashi; HIROSE, Kanae; AKIYAMA, Kayo; TANIGUCHI, HISAJI. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 2161-2168, 2002.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol.** vol. 24, n. 04, pp. 325-340, 2015.

KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, vol. 53, n. 1, p. 15-25, 2007.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 11, p. 823-835, 2011.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 52, p. 556–592, 2012.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R.; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**. Vol. 395, n. 02, p. 203–230, 2014.

NAZARÉ, A. C.; FARIA, C. M. Q. G.; CHIARI, B. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; CORRÊA, M. A. ISAAC, V. L. B.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Ethyl ferulate, a component with anti-inflammatory properties for emulsion-based creams. **Mol.** Vol. 19, pp. 8124-8139, 2014.

NENADIS, Nikolaos; ZHANG, Hong-Yu; TSIMIDOU, Maria Z. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 51, p. 1874-1879, 2003.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. Oxidative stress signaling pathway and its activation by the Nrf2 - Antioxidant Response Element. **Journal of Biology and Chemistry**. Vol. 284, p. 13291-13295, 2009.

NIEDZIELSKA, E.; SMAGA, I.; GAWLIK, M.; MONICZEWSKI, A.; STANKOWICZ, P.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Mol. Neurobiol.**, vol, 53, n. 6, pp. 4094-4125, 2016.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 61, n. 02, p. 255-265, 2011.

PERLUIGI, Marzia; JOSHI, Gururaj; SULTANA, Rukhsana; CALABRESE, Vittorio; DE MARCO, Carlo; COCCIA, Raffaella; CINI, Chiara; BUTTERFIELD, Allan. In Vivo Protective Effects of Ferulic Acid Ethyl Ester Against Amyloid- β Peptide 1–42-induced Oxidative Stress. **Journal of Neuroscience Research**, vol. 84, p. 418–426, 2006.

QIU, R.; WANG, J.; PARKIN, K. L. Isolation and identification of cytoprotective agents from nonpolar extracts of buckwheat flour. **Food Res Internat.** Vol. 66, pp. 86–92, 2014.

SÁ, R. C. S, ANDRADE, L. N, OLIVEIRA, R. R. B., SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, vol. 19, p. 1459-1480, 2014.

SCAPAGNINI, Giovanni; BUTTERFIELD, Allan; COLOMBRITA, Claudia; SULTANA, Rukhsana; PASCALE, Alessia; CALABRESE, Vittorio. Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, Vol. 6, n. 5, p. 811-818, 2004.

SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochem Rev.** vol. 09, n. 01, pp. 147-170, 2010.

SON, Sopheak; LEWIS, Betty A.. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 468-472, 2002.

SULTANA, Rukhsana; RAVAGNA, Agrippino; MOHMMAD-ABDUL, Hafiz; CALABRESE, Vittorio; BUTTERFIELD, D. Allan. Ferulic acid ethyl ester protects

neurons against amyloid β -peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity:relationship to antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, vol. 92, p. 749–758, 2005.

SULTANA, Rukhsana. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1822, p. 748–752, 2012.

SURH, Y. NF- κ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, vol. 17, n. S1, p. 269-272, 2008.

TSAI, Y. C.; LEE, Y. M.; HSU, C. H.; LEU, S. Y.; CHIANG, H. Y.; YEN, M. H.; CHENG, P. Y. The effect of ferulic acid ethyl ester on leptin-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells. **Experiment Mol Med**. Vol. 47, pp. 1-9, 2015.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, vol. 03, n 1, p. 2–20, 2010.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUKA, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomed. Pharmacoth.**, vol. 78, n. 03, pp. 39-49, 2016.

ZHANG, Li-Wen; AL-SUWAYEHB, Saleh A.; HSIEHC, Pei-Wen; FANGA, Jia-You. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 399, p. 44-51, 2010.

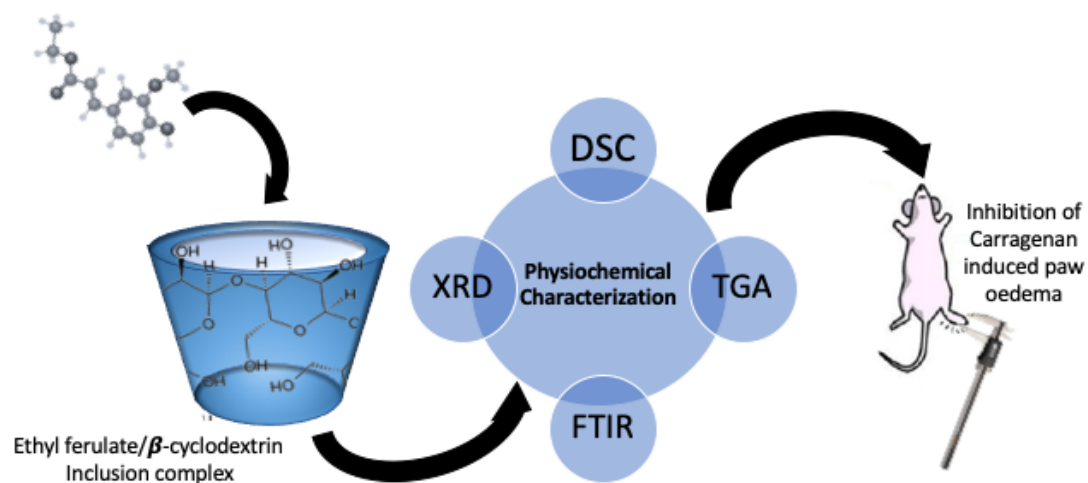
CAPÍTULO 2

Desenvolvimento tecnológico e caracterização de complexos de inclusão contendo ferulato de etila

Food Chemical and Toxicology

Fator de Impacto: 3,99

Qualis: A2



CAPÍTULO 2

Desenvolvimento tecnológico e caracterização de complexos de inclusão contendo ferulato de etila

Francisco Valmor Macedo Cunha¹, Damião Pergentino de Sousa², Francisco de Assis Oliveira³, Lívio César Cunha Nunes⁴

1 Doutorando em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio). Mestre em Farmacologia.

2 Doutor em Ciências. Professor da Universidade Federal da Paraíba.

3 Doutor em Farmacologia. Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí.

4 Doutor em Ciências Farmacêuticas. Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí.

Resumo

Introdução: O ferulato de etila é um fenilpropanóide com atividades antioxidante, antiinflamatória e neuroprotetora. Entretanto, possui baixa solubilidade em água o que compromete a absorção no trato gastrointestinal, diminui a biodisponibilidade e compromete a reprodutibilidade dos efeitos in vivo.

Objetivo: desenvolver e caracterizar complexo de inclusão de B-ciclodextrina com ferulato de etila e testar em modelo experimental inflamatório in vivo.

Material e Métodos: Complexos de inclusão de ferulato de etila e B-ciclodextrina foram obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização e spray drying. Os complexos obtidos foram avaliados quanto ao teor de ferulato de etila, estabilidade, perfil de dissolução, pesquisa de interações químicas através de FT-IR, caracterizado por análise térmica, DRX e FTIR e avaliação de atividade antiinflamatória in vivo através de modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. **Resultados:** Os complexos de inclusão obtidos resultaram em aumento da solubilidade e estabilidade comparativamente ao ferulato de etila isolado. Além disso, os complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray drying apresentaram maior eficácia farmacológica comparativamente ao ferulato de etila 100 mg/kg v.o e o complexo obtido por

spray drying apresentou efeito anti-inflamatório significativamente melhor que a indometacina (10 mg/kg) da segunda a quarta hora. **Conclusão:** Os sistemas binários entre ferulato de etila e β -ciclodextrina resultou em aumento da solubilidade, melhorou o perfil de dissolução do ativo, aumentou a estabilidade e a eficácia farmacológica em modelo inflamatório in vivo.

Palavras-chave: ferulato de etila; ciclodextrina; inflamação; dissolução

Abstract

Introduction: Ethyl ferulate is a phenylpropanoid with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities. However, it has low solubility in water which compromises the absorption in the gastrointestinal tract, decreases the bioavailability and compromises the reproducibility of the effects in vivo. **Objective:** to develop and characterize the inclusion complex of β -cyclodextrin with ethyl ferulate and to test in an experimental inflammatory model in vivo. **Material and Methods:** Inclusion complexes of ethyl ferulate and β -cyclodextrin were obtained by physical mixing, blending, lyophilization and spray drying. The complexes obtained were evaluated for ethyl ferulate content, stability, dissolution profile, chemical interactions through FT-IR and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity through carrageenan-induced paw edema model in rats. **Results:** The inclusion complexes obtained result in increased solubility and stability compared to isolated ethyl ferulate. In addition, the complexes obtained by malaxage, lyophilization and spray drying had a better pharmacological effect compared to ethyl ferulate 100 mg / kg and the complex obtained by spray drying presented a significantly better anti-inflammatory effect than indomethacin (10 mg / kg) from the second to the fourth hour tested. **Conclusion:** Binary systems between ethyl ferulate and B-cyclodextrin resulted in increased solubility, improved dissolution profile of the active, increased stability and pharmacological potency in an in vivo inflammatory model.

Key words: ethyl ferulate; cyclodextrin; inflammation; dissolution

Introdução

O ferulato de etila é um fenilpropanóide, classe vasta de metabólitos secundários do metabolismo das plantas que possui ampla comprovação científica de suas atividades antioxidantes, antibacterianas e antiinflamatórias (KORKINA et al, 2011). O ferulato de etila, a exemplo, possui ação antioxidante (KIKUZAKI et al, 2002; ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; PERLUIGI et al, 2006; CALABRESE et al, 2008; FENG et al, 2008; ISLAM et al, 2009; BOLLING et al, 2011; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), anti-inflamatória (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; PERLUIGI et al, 2006; ISLAM et al, 2009; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), neuroprotetora (SCAPAGNINI et al, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; FENG et al, 2008; GARRIDO et al, 2012), antiapoptótica (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004), antimutagênica (DI DOMENICO et al, 2009), antirreumática e condroprotetora (CUNHA et al, 2016) e antiproliferativa (TSAI et al, 2015). Entretanto, suas características lipofílicas limitam a aplicabilidade na indústria alimentícia e farmacêutica devido a baixa solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (KORKINA et al, 2011; KFOURY et al, 2014; TUREK; STINZING, 2012).

Substâncias pouco hidrossolúveis com baixa taxa de dissolução proporcionam baixa biodisponibilidade oral e consiste em um dos maiores desafios no desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Para ser farmacologicamente ativa, uma droga precisa de características tanto de hidrossolubilidade para que seja absorvida e distribuída adequadamente quanto lipossolubilidade para que consiga permear as membranas biológicas (CHAUDHARY; PATEL, 2013).

Diversas estratégias tem sido utilizadas a fim de melhorar a hidrossolubilidade de compostos como solubilização com sistemas surfactantes, formação de complexos hidrossolúveis, utilização de pró-fármacos e formação de sais solúveis da molécula-alvo (DESHMUKH et al, 2007; PINNAMANENI; DAS; DAS, 2002; PATIL et al, 2010). A utilização de ciclodextrinas naturais e de suas derivadas sintéticas desempenham um papel importante no desenvolvimento de formulações devido seu efeito do aumento da solubilidade,

taxa de dissolução, estabilidade química e consequente absorção de uma droga (LOFTSSON; BREWSTER; MASSON, 2004).

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por pontes α -1,4 contendo seis (alfa), sete (β) ou oito (gama) unidades de glicopiranosose, o que lhes conferem estrutura tridimensional com interior lipofílico e o exterior hidrofílico possibilitando o encapsulamento de ativos lipofílicos e justificando seu amplo uso industrial (LOFTSSON; MASSON, 2001; CRINI, 2014; MONTEIRO; FIGUEIRAS, 2016). Ciclodextrinas naturais e sintéticas tem sido utilizadas para obter sistemas de liberação imediata, os quais são rapidamente dissolvidos no trato gastrointestinal, aumento a biodisponibilidade oral de drogas pouco solúveis através da formação de complexos (CHORDYIA; SENTRIKUMARAN, 2012).

Estudos mostram aumento significativo da solubilidade e melhora do perfil de dissolução através da complexação de vários fenilpropanóides como o estragol, isoeugenol, eugenol, trans-anetol, ácido caféico, curcumina e ácido ferúlico com ciclodextrinas naturais e sintéticas. (JANTARAT et al, 2014; KFOURY et al, 2014). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi desenvolver complexo de inclusão de B-ciclodextrina com ferulato de etila afim de melhorar a solubilidade em água, o perfil de dissolução e estabilidade e como consequência prover incrementos na biodisponibilidade deste ativo.

Materiais e Métodos

Ferulato de etila, obtenção e solução

A obtenção do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato) ficou sob a responsabilidade do professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

Diagrama de solubilidade de fases

O diagrama de solubilidade de fases foi produzido de acordo com o estabelecido nos estudos de Higuchi e Conors (1965), onde adicionou-se quantidades em excesso ferulato de etila em soluções com concentração crescente de β CD (0, 4, 6, 8 e 10 mM). As amostras foram postas sob agitação

em banho-maria por 72 horas à temperatura de 28°C. Em seguida, foram filtradas em membranas de 0,22 µm e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® (UVmini – 1240) no modo varredura entre os comprimentos de onda 200 e 400 nm, utilizando água purificada como branco. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a constante de associação fármaco-ciclodextrina ($K_{1:1}$) foi calculada para a porção linear do diagrama assumindo uma estequiometria 1:1, utilizando a equação: $K_{1:1}$

$$K_{1:1} = \frac{\text{slope}}{S_0 \times (1 - \text{slope})}$$

Onde S_0 corresponde a solubilidade do ferulato de etila na ausência de B-ciclodextrina e o slope é a inclinação da reta do diagrama de solubilidade de fases.

Preparação dos complexos de inclusão

Os complexos de inclusão binários entre o ferulato de etila e a β-ciclodextrina foram preparados na proporção molar de 1:1 de acordo com o resultado obtido no diagrama de solubilidade de fases. Para produção dos complexos pelo método de mistura física, quantidades adequadas de ferulato de etila e B-ciclodextrina foram adicionados em gral de porcelana e submetidos a homogeneização por 20 minutos com auxílio de pistilo. Em seguida, a amostra foi tamisada em malha de 250 µm e armazenada em dessecador de vidro sob vácuo (SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

Complexo também foi obtido por malaxagem que consistiu na mistura das mesmas proporções utilizadas para a mistura física com adição de solvente etanol/ água (1:1 v/v). Os componentes foram misturados em gral de porcelana com auxílio de pistilo durante 20 minutos até obtenção de uma pasta homogênea. O produto final foi submetido a estufa por 48 horas à temperatura de 50 °C (SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

Solução de ferulato de etila e B-ciclodextrina foi obtida através da diluição da mistura em solução etanol/água (1:1 v/v). Os complexos foram obtidos a partir desta solução por dois métodos: liofilização e spray dried. Na liofilização a solução foi previamente submetida a rotaevaporação para retirada do etanol e

posteriormente submetida a liofilização por 48 horas. Para o spray dried, a solução foi pulverizada em spray-dry (Mini Spray Dryer B290 – Büchi®), com temperatura de entrada de 75 °C, aspensão de 70% e injeção da amostra a 3 ml/min.

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em equipamento Agilent Cary 630 FTIR® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada – ATR (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Foi utilizado o método ATR com 64 scans e 8 scans de background. A resolução utilizada foi de 4 cm⁻¹ na faixa de 4000 – 650 cm⁻¹, pela técnica de pastilhas de KBr.

Análise Térmica

A análise térmica foi realizada através da caracterização tanto do fármaco quanto dos complexos de inclusão pelas técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). O TG e DSC foram realizados em equipamento Shimadzu®, modelo SDT Q600, em atmosfera inerte de argônio e fluxo de 50 mL/min. A massa da amostra utilizada foi de 20,0 mg (± 0,2) para o ferulato de etila, β-ciclodextrina, complexos e mistura física, acondicionadas em cadinho de alumínio, sob aquecimento de 40 a 600 °C na razão de aquecimento de 10 °C/min. Antes dos ensaios, a calibração do equipamento foi verificada através da análise de amostras de oxalato de cálcio.

As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados(LIMAV) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Difratograma em Raios X

A difração em raios-X foi obtida em difratômetro Shimadzu®, modelo XRD-6000, equipado com ânodo de cobre, usando voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 5 – 75° a uma

velocidade de digitalização de 2°/min. Utilizaram-se suportes de vidro com fina camada de material em pó sem solvente. A análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Estudos de dissolução

Os estudos de dissolução foram realizados de acordo com as especificações da Food and Drugs Administration para os estudos de dissolução de fármacos pouco solúveis (DRESSMAN et al., 1998). Utilizou-se aparato pá a 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O meio do ensaio foi 900 mL de ácido clorídrico (0,01 M), a fim de simular o suco gástrico. As amostras analisadas foram encapsuladas com o equivalente a 10 mg de ferulato de etila e os tempos de análise foram de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Após filtração, as concentrações das amostras, em triplicata, foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 325 nm (SOBRINHO; SOARES et al., 2011).

Determinação do conteúdo de ferulato de etila nos complexos

Para determinação do conteúdo de ferulato de etila presente nos complexos obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização de spray dried, uma mesma alíquota de cada complexo foi pesada e diluída em etanol/água 1:1 v/v em balão volumétrico de 10 mL, foram postos em agitação em banho de sonicação por 10 minutos e em seguida foram filtrados em membranas de 0,22 μm . Em seguida as concentrações foram obtidas por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 325 nm. Com base na curva padrão obtidas do ferulato de etila a 325 nm e na massa de ferulato utilizada para produção de cada complexo, foi realizado o cálculo da quantidade de ferulato presente no complexo e do percentual perdido no processo de complexação.

Determinação da estabilidade dos complexos

Para o cálculo da estabilidade dos complexos, alíquotas iguais dos complexos obtidos por diferentes métodos foram pesadas, diluídas em etanol/água 1:1 v/v e submetidas a leitura por espectrofotometria UV-Vis no comprimento de onda de 325 nm no dia 0, 15, 30, 60 e 90 dias após a produção dos complexos. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Para o controle do estudo de estabilidade do complexo foi utilizada solução com concentração conhecida de ferulato de etila em etanol/água (1:1 v.v).

Animais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar fêmeas, pesando entre 180 e 220 gramas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de claro e escuro de 12h com ração padrão (Labina – Purina®) e água *ad libitum*. Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas e separados por grupos de 6 animais. Os protocolos experimentais foram realizados apenas após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais da Universidade Federal do Piauí (CEE/UFPI, Parecer N° 082/14) (**APÊNDICE A**).

Efeito dos complexos de inclusão de ferulato de etila com β -CD obtidos através de mistura física, malaxagem, liofilização e spray dryer sobre o edema de pata induzido por carragenina

Ratos Wistar foram divididos em seis grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo, ferulato de etila 100 mg/kg (CUNHA et al, 2016), indometacina (10 mg/kg), complexos de inclusão de FE e β -CD obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização e spray dryer em quantidade suficiente para garantir igual dose do ativo isolado (100 mg/kg) e, após 1h, receberam a carragenina. O volume das patas foi registrado por paquimetria (Digimess®) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 e 5 h) após a

administração intraplantar de carragenina. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre o diâmetro antero-posterior e o inicial da pata (WINTER et al., 1962).

Análise Estatística

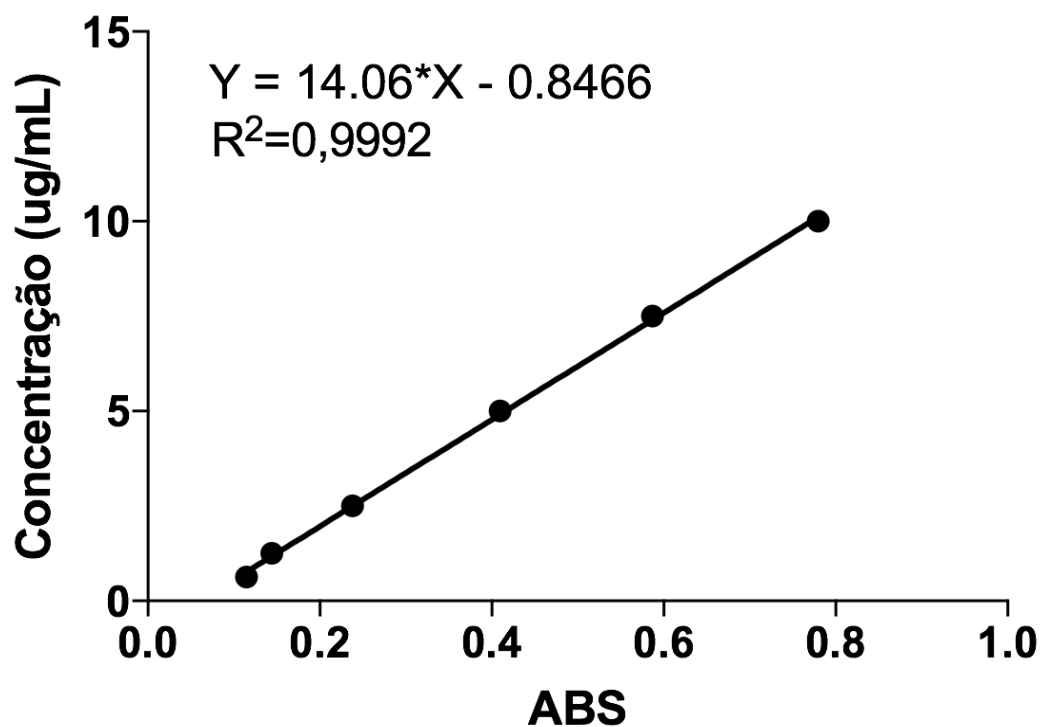
Para análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni entre grupos com mais de uma variável independente. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Com base em varreduras em espectrofotômetro UV-Vis observou-se que o ferulato de etila possui pico máximo de absorvância as 325 nm. Com base nisso, foi construída curva de calibração neste comprimento de onda para as análises que se sucederiam seguindo a equação da reta apresentada na **figura 1** R^2 de 0,9992.

O método de solubilidade de fases consiste na observância do aumento da solubilidade do molécula pouco solúvel, ferulato de etila, quando adicionada em mesma quantidade em diferentes soluções com concentrações crescentes de ciclodextrina (CHAUDHARY; PATEL, 2013). De acordo com os estudos de Higuchi e Connors (1965), o perfil apresentado para o ferulato de etila foi o A_L correspondente a proporção estequiométrica de 1:1 para a produção de complexos de inclusão. Os perfis de solubilidade de fase do tipo A são característicos de aumentos significativos na solubilidade na substância complexada (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2009). Neste estudo, o ensaio de solubilidade de fases resultou em incremento de solubilidade ao ferulato de etila de 283,33%. Kfoury et al (2014) avaliou a habilidade de ligação de vários fenilpropanóides (trans-anetol, estragol, isoeugenol, eugenol, ácido p-cumárico, ácido caféico e ácido ferúlico) e observou que em todos a proporção estequiométrica foi de 1:1.

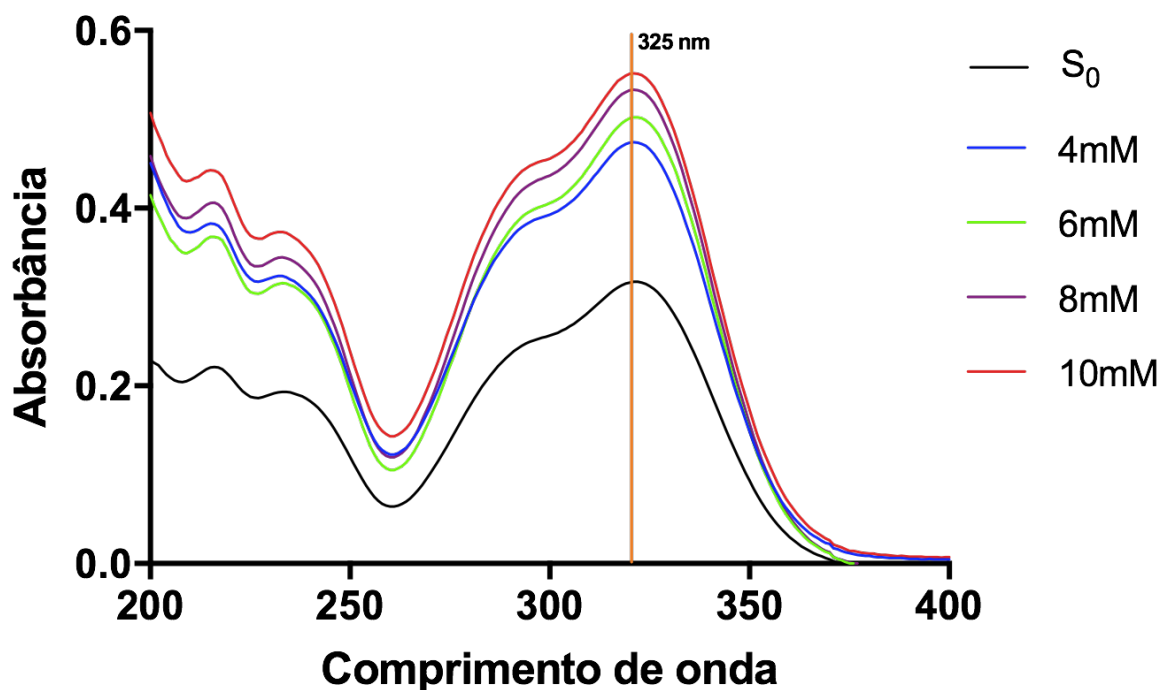
Figura 1 – Curva de calibração do ferulato de etila a 325 nm obtido através de espectrofotometria UV-Vis.



O incremento de solubilidade pode ser observado na **Figura 2** onde, nas mesmas condições, soluções contendo β -ciclodextrina em diferentes concentrações resultam em aumento da absorbância do ferulato de etila a 325 nm à medida em que há aumento na concentração de β -CD. O mesmo pode ser observado na **Figura 3** que representa o diagrama de solubilidade de fases para o ferulato de etila e β -CD.

A constante de estabilidade (K_c), determinada através do diagrama de solubilidade, descreve a força de associação entre a ciclodextrina e a molécula alvo, cujos valores variam entre 0 e 10^5 M^{-1} e mais comumente entre 50 e 2000 M^{-1} com valor médio de 129, 490 e 366 M^{-1} para α -, β - e γ -ciclodextrina, respectivamente. Desta forma, quanto maior o valor de K_c encontrado, maior será a força e estabilidade na ligação entre os componentes do complexo (CONNORS, 1977; STELLA; RAJEWSKI, 1997; STELLA et al., 1999).

Figura 2 – Espectros de varredura em UV-Vis de soluções com diferentes concentrações de β -CD contendo ferulato de etila.

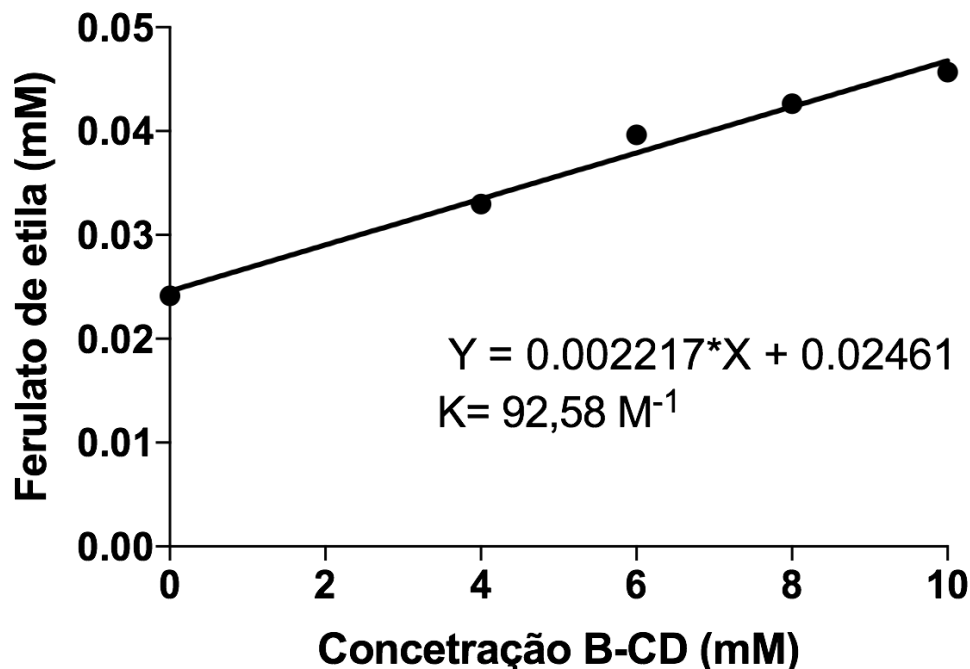


De acordo com o diagrama de solubilidade de fases, a constante de estabilidade obtida para o sistema binário entre ferulato de etila e β -ciclodextrina foi de $92,58 \text{ M}^{-1}$, indicando a existência de interação entre os componentes deste sistema. É importante salientar que os perfis de solubilidade de fase e valor de K_c dentro dos limites aceitáveis não implicam em indicativo de formação de complexos de inclusão fazendo-se necessárias análises mais sofisticadas para tal assertiva (LOFTSSON et al, 2005). Dentre estes procedimentos para análises de complexos, pode-se citar a análise de infravermelho com transformada de Fourier, análises calorimétricas e ressonância nuclear magnética.

A técnica espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é amplamente utilizada no estudo de complexos sólidos de fármacos-ciclodextrinas (CD) (SPRICIGO et al., 2008). Esta é uma técnica útil para identificar quais modos vibracionais do fármaco e da CD estão sendo perturbados durante o processo de inclusão, sugerindo as interações entre estas moléculas no estado sólido. Alterações nas bandas características da molécula hóspede, tais como desaparecimento, alargamento, variações na intensidade do

pico e/ou mudanças no seu número de onda podem ser indicativos de formação de complexo (CORTI et al, 2007; LYRA et al, 2010; MURA, 2015).

Figura 3 – Diagrama de solubilidade de fases do ferulato de etila em soluções com diferentes concentrações de β -CD.



Para realização da avaliação dos espectros IV, selecionou-se as principais bandas do ferulato de etila que não aparecem na B-ciclodextrina (**Figura 4**). Desta forma, a avaliação comparativa foi realizada em observância as bandas do ferulato de etila 1164 cm^{-1} referente ao estiramento C-O característico dos ésteres, o pico de 1630 cm^{-1} referente a vibração da C=C conjugada a ligação C=O e o pico de 3079 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H de alcanos. Na β -CD foram observadas bandas de absorção de 3351 cm^{-1} (estiramento O-H), 2918 cm^{-1} (estiramento C-H), 1162 cm^{-1} (estiramento C-O), 1033 cm^{-1} (estiramento C-O-C).

A análise dos espectros de IV permitem a constatação da ausência do pico 3079 cm^{-1} tanto na mistura física quanto nos complexos obtidos por liofilização, malaxagem ou spray drying. Além disso pode-se observar a atenuação do pico de 1630 cm^{-1} na mistura física e deslocamento do mesmo pelos demais métodos de obtenção de complexos. Outro aspecto importante é a atenuação da banda compreendida entre 1000 e 1300 cm^{-1} característico dos

ésteres e que compreende o pico de 1164 cm^{-1} o qual passa a predominar o aspecto do pico observado na β -CD em todos os métodos avaliados (**Figura 5**). Os dados apresentados pela análise de IV sugerem que essas ocorrências podem ser o resultado da restrição das vibrações de estiramento da molécula hóspede causada pela inclusão na cavidade do CD e / ou sugerir um enfraquecimento das ligações interatômicas como consequência de um ambiente modificado em torno dessas ligações na complexação (MURA, 2015).

Os ensaios de dissolução permitem prever o comportamento —in vivo” de uma formulação em desenvolvimento. Para isto, devem-se utilizar meios de dissolução que se assemelhem às condições fisiológicas, levando em consideração a condição *sink*, presença de tensoativos e a influência no padrão de motilidade no processo. (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

Na caracterização térmica do ferulato de etila, verifica-se a presença de dois picos endotérmicos: o primeiro refere-se ao ponto de fusão do composto correspondente a 57.91°C e o segundo corresponde a temperatura de degradação (265.24°C) uma vez que há perda de massa associada a este evento endotérmico como pode ser observado pelas curvas de TGA e DTG (**Figura 6**). Tal análise térmica permite concluir que não há presença de diferentes formas polimórficas para o ferulato de etila.

A técnica de DSC indica a formação de complexos de inclusão com base nas alterações de características da molécula hóspede tais como ponto de fusão, ponto de ebulição, temperatura de degradação bem como as modificações na entalpia relacionada a estes processos (FIGUEIRAS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). Desta forma, como base nos termogramas de DSC obtidos depreende-se que houve a formação de complexos de inclusão entre o ferulato de etila e B-Ciclodextrina uma vez que houveram mudanças significativas na energia necessária bem como nas faixas de temperatura de fusão e degradação da molécula hospede isolada. Diante disso, a mistura física apresentou aumento do ponto de fusão para 74.86°C (Entalpia = 196.8 J/g) e temperatura de degradação de 326.35°C (Entalpia = 225.5 J/g), o complexo obtido por malaxagem apresentou ponto de fusão de 78.35°C (Entalpia = 297.7 J/g) e temperatura de degradação de 325.82°C (Entalpia = 378.9 J/g), complexo de inclusão obtido por liofilização ponto de fusão de 200.58°C (Entalpia = 105.7 J/g) e temperatura de

degradação de 324.08°C (Entalpia = 515.4 J/g) e no complexo obtido por spray dried o ponto de fusão foi de 298.14°C (Entalpia = 4515 J/g) e temperatura de degradação de 325.08 °C (Entalpia = 199.8 J/g).

Figura 4 - Espectro de infravermelho do ferulato de etila (1), β -CD (2), mistura física (3) e complexos de inclusão obtidos por malaxagem (4) spray-drying (5) e liofilização (6).

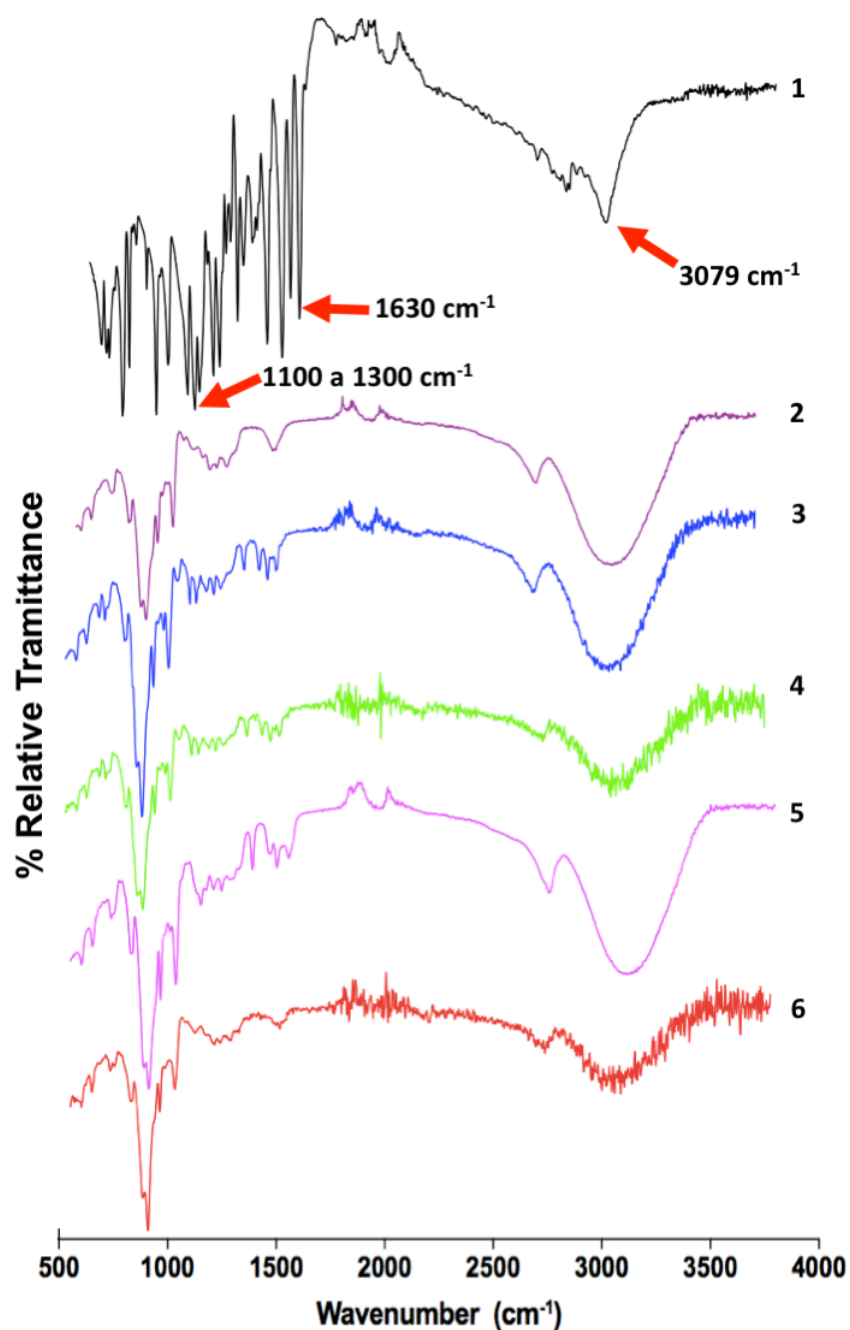


Figura 5 - Espectro de infravermelho do ferulato de etila (1), β -CD (2), mistura física (3) e complexos de inclusão obtidos por malaxagem (4) spray-drying (5) e liofilização (6) mostrando possíveis sítios de interação entre ferulato de etila e B-ciclodextrina.

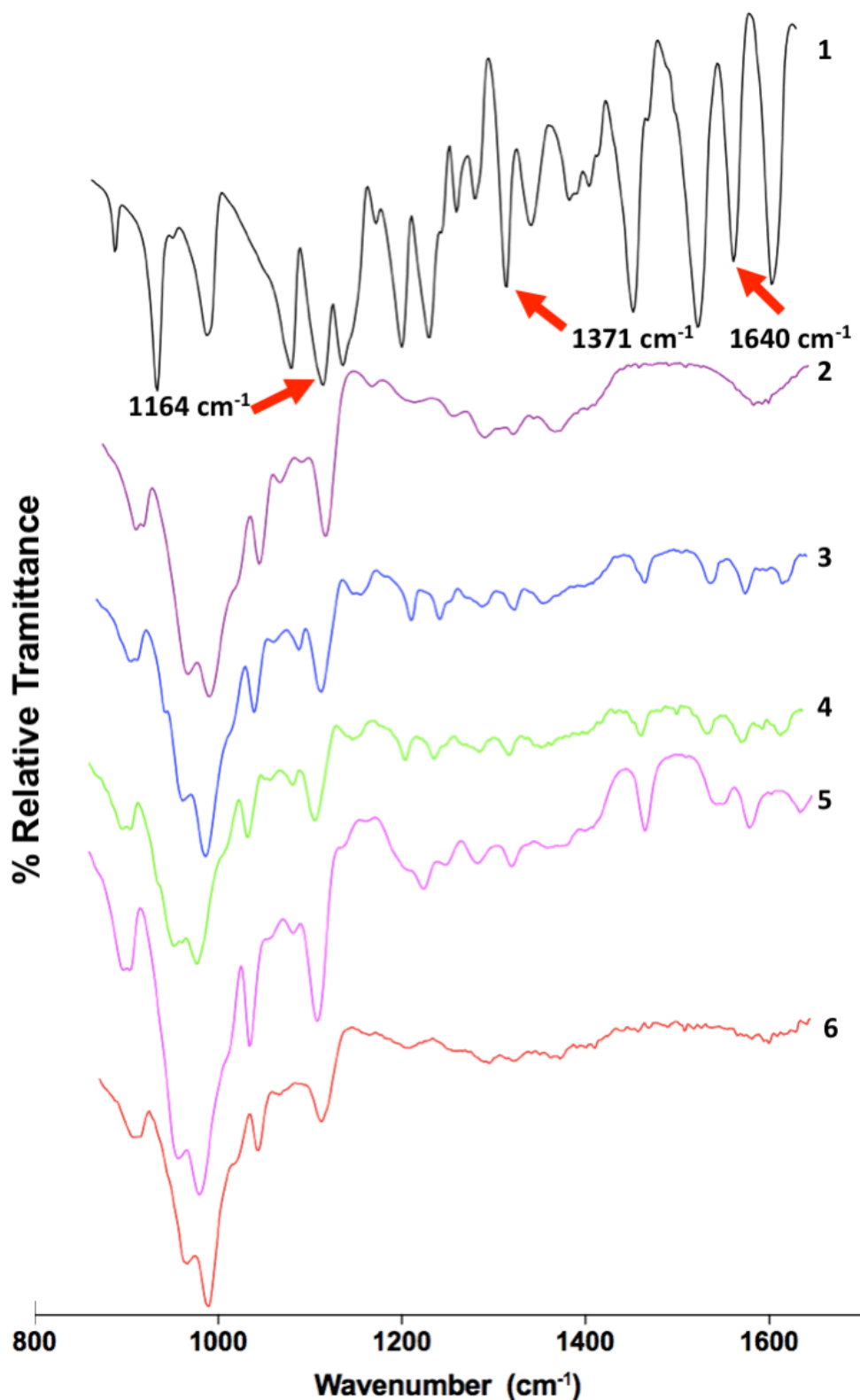
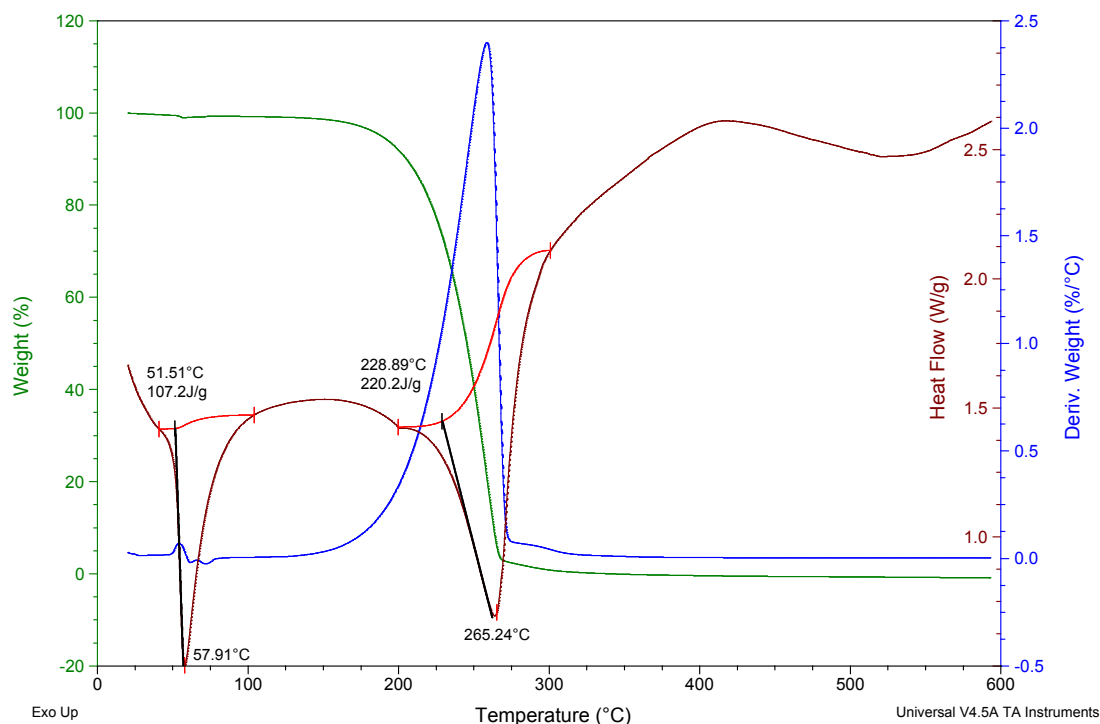


Figura 6 – Curvas de DSC, TGA e DTG do ferulato de etila obtido na razão de 10°C/min.



Outro aspecto importante na análise de termogramas para determinação da formação de complexos de inclusão, é o desaparecimento do pico endotérmico característico a 120 °C na β -CD, indicativo da saída de água na forma de vapor da cavidade hidrofóbica. A ausência de tal pico indica que as moléculas de água foram deslocadas pelas moléculas de ferulato de etila.

A análise termogravimétrica é uma forma complementar a análise da formação de complexos de inclusão uma vez que na possível formação do complexo, a temperatura de degradação da molécula hospede acontecerá em temperaturas superiores a da molécula livre indicando proteção da molécula hóspede pela molécula de hospedeira (TAKAHASHI, 2009). Tal achado pode ser observado devido as alterações nas temperaturas de fusão e de degradação com destaque para os complexos obtidos por liofilização e spray dried os quais apresentaram temperatura de degradação de 324.08°C e 325.08°C, respetivamente em comparação com 265.24°C do composto isolado o que demonstra que a complexação do ferulato de etila em β -CD resultou em aumento da estabilidade térmica.

Figura 7 – Curvas de DSC de β -ciclodextrina, ferulato de etila, mistura física e complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray dried.

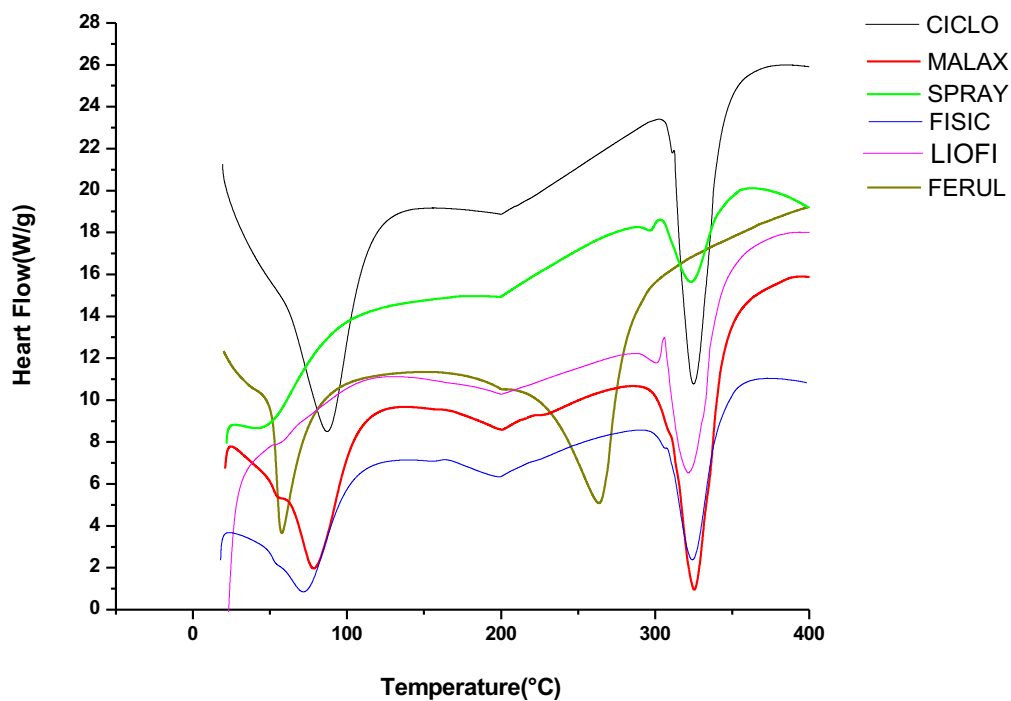
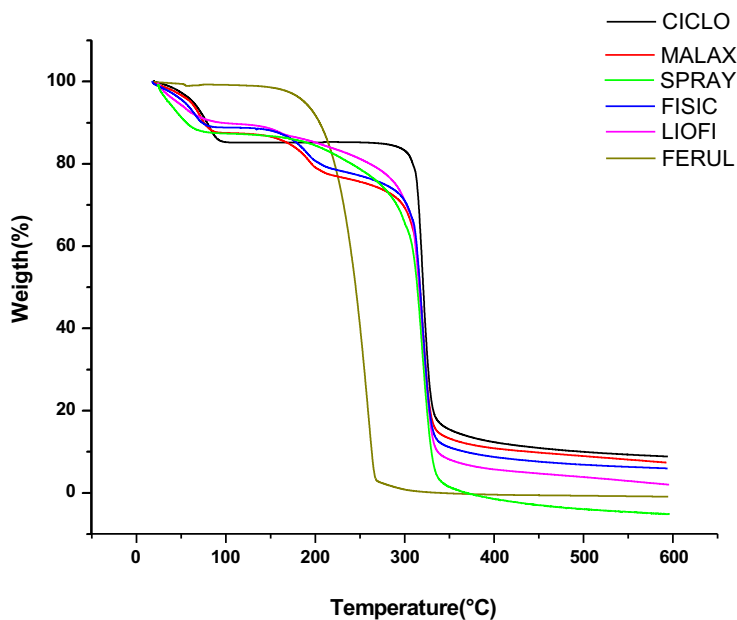


Figura 8 – Curvas de TGA da β -ciclodextrina, ferulato de etila, mistura física e complexos obtidos por malaxagem, liofilização e spray dried.



Entretanto, para definição da formação de complexos de inclusão, a utilização de análises térmicas não são suficientes e há a necessidade da utilização de técnicas espectroscópicas como a difração de raios X. A análise do processo de complexação por DRX avalia o desaparecimento ou mudança dos picos característicos (FREITAS et al., 2012). A mistura física e malaxagem exibem picos característicos da difração do ferulato de etila sobrepostos ao perfil da β -CD, enquanto que o complexo obtido por spray-drying apresentou tais picos de forma reduzida ou quase inexistentes, indicando que o processo de complexação neste último tenha sido mais efetivo (**Figura 9**).

Na **Figura 10**, observa-se que o ferulato de etila quando submetido ao estudo de dissolução após uma hora atinge sua concentração máxima correspondendo a 13,75% de percentual dissolvido. De maneira diferente, ao avaliar-se a mistura física observa-se que a mesma apresenta 55,46% de liberação após 15 minutos, 81,88% aos 20 minutos e atinge 100% de liberação após uma hora de início do ensaio. Já o sistema binário feito por malaxagem apresentou 78,95% de liberação após 15 minutos e atingiu 100% de liberação após 30 minutos de início do ensaio. Os sistemas binários obtidos por spray drying e liofilização apresentaram perfis de dissolução semelhantes com 81,9% e 74,55% de liberação após 15 minutos, respectivamente e 100% de liberação após 20 e 30 minutos para o sistema obtido por spray drying e liofilização, respectivamente. Levando-se em consideração o uso clínico por via oral para que ocorra a absorção de um fármaco no intestino delgado durante um período de 1 – 2 horas, a dissolução do medicamento deve estar completa em 15 a 30 minutos. Desta forma, preconiza-se que 85% de fármaco esteja dissolvido após 15 minutos no meio simulado com pH gástrico (SOARES-SOBRINHO et al., 2010).

Figura 9 - Difratoograma de raios X do ferulato de etila, β -CD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física, malaxagem e spray-dried.

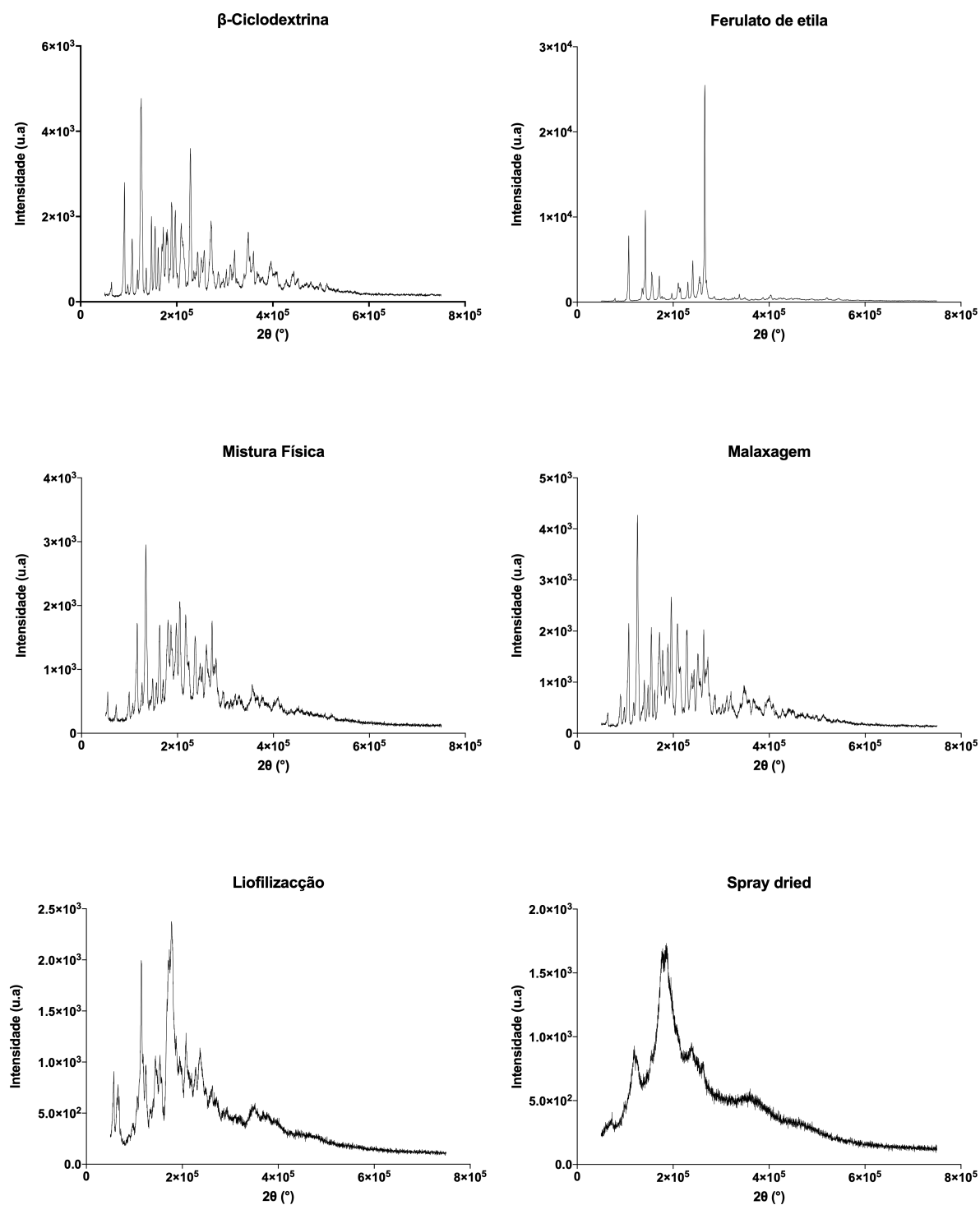
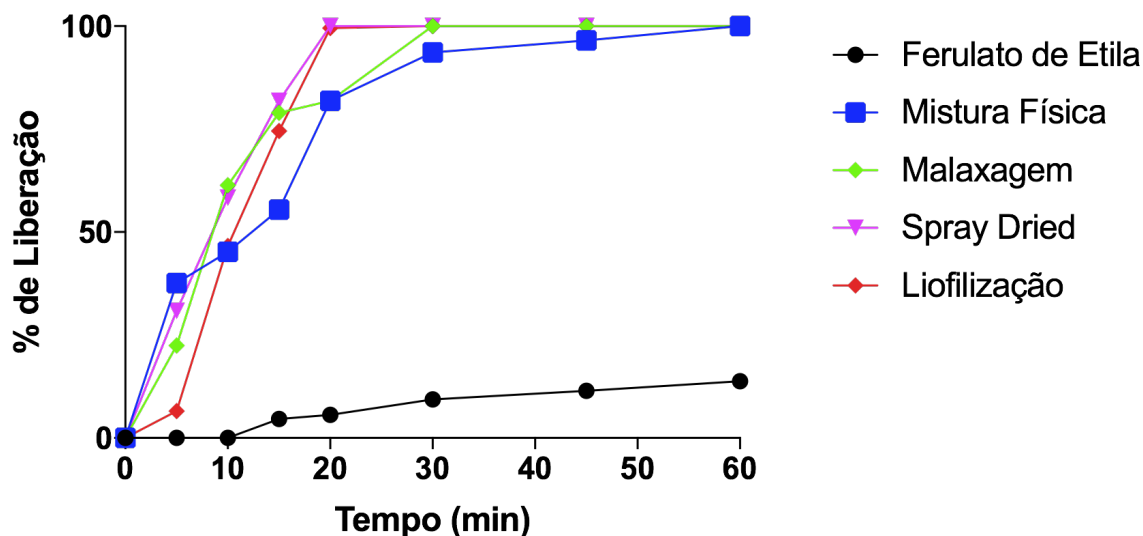


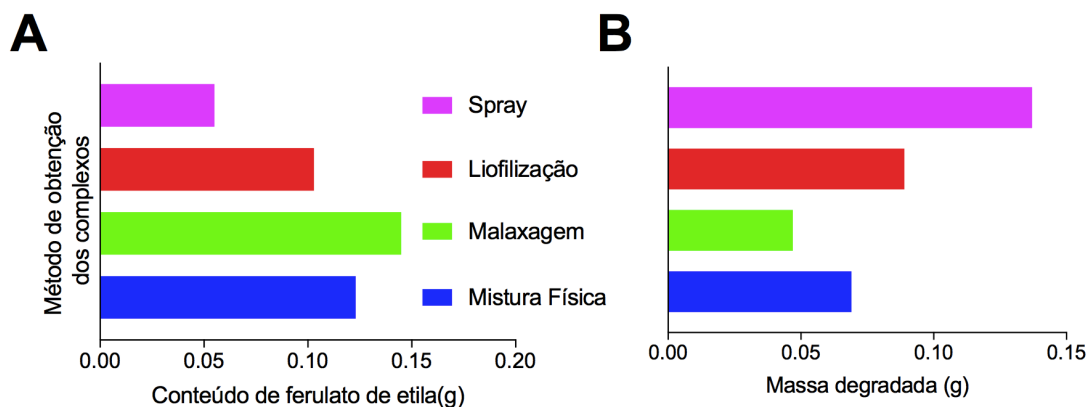
Figura 10 – Perfil de liberação do ferulato de etila, mistura física e complexos de inclusão obtidos por malaxagem, spray dried e liofilização.



Durante o processo de produção de complexos de inclusão e ao fim do mesmo é difícil inferir a quantidade real de substância hospede uma vez que as afirmações de proporções molares advem de estudos e cálculos teóricos. Há portanto, a necessidade de determinar a quantidade real do ativo no complexo para definição das quantidades de complexo necessárias para uma dose definida de ativo. Neste estudo, o método com maior conteúdo de ativo foi a malaxagem com 0,145 g de ferulato de etila para cada 1 g de complexo, seguido da mistura física (0,123 g) e liofilização (0,103 g). O menor conteúdo foi encontrado nos complexos obtidos por spray drying e, portanto, foi o método com maior quantidade de ferulato de etila degradado durante o processo de complexação (0,137 g para cada 1 g de complexo) seguido pelo método de liofilização com 0,089 g de ferulato de etila degradados no processo de produção dos complexos. Os resultados aqui encontrados corroboram com os de Jantar et al (2014) que ao avaliar diferentes métodos para produção de complexos de inclusão contendo curcumina, observou que a metodologia empregada no processo influía significativamente no conteúdo final da molécula hospede. Isso possivelmente se dá pelo fato de ambos os processos, spray-drying e liofilização, possuírem etapas de aquecimento favorecendo a volatilização e degradação de

compostos voláteis e com baixo ponto de ebulição a exemplo da substância alvo deste estudo (**Figura 11**).

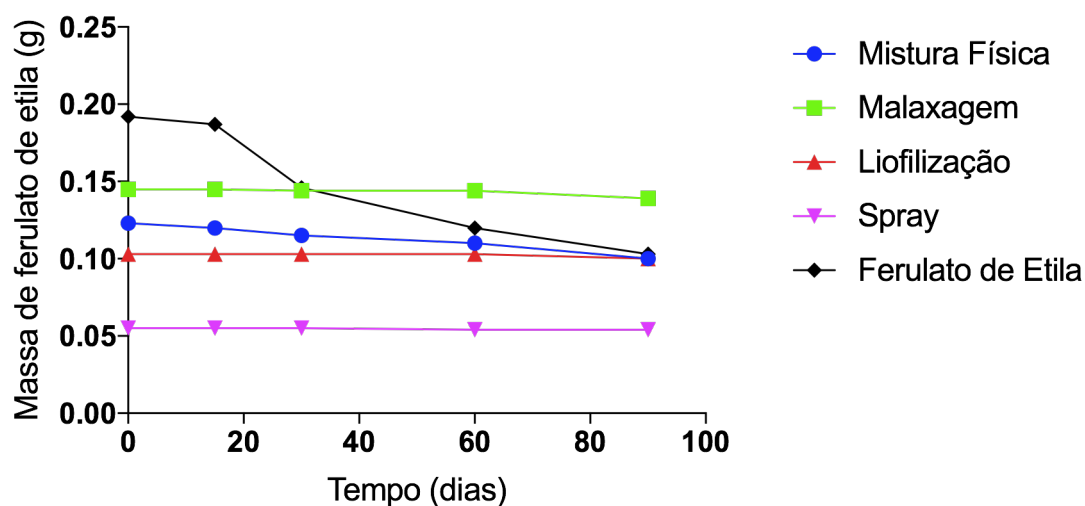
Figura 11 – Conteúdo (A) e massa degradada (B) de ferulato de etila nos complexos obtidos por spray drying, liofilização, malaxagem e mistura física.



Por fim, com o intuito de avaliar o efeito da complexação sobre a estabilidade do ferulato de etila, as amostras foram avaliadas durante 90 dias e, a intervalos regulares, alíquotas foram retiradas para avaliar o teor de ferulato de etila nos complexos. Como pode ser observado na figura 7, a solução contendo apenas ferulato de etila apresentou declínio na concentração do ativo de 48% em 90 dias ao passo que dentre os sistemas binários com β -CD apenas a mistura física demonstrou declínio significativo na massa de ferulato de etila (10% em 90 dias). Os demais sistemas binários obtidos por liofilização e spray drying apresentaram boa estabilidade. A exemplo deste estudo, Jantar et al (2014) também observou em seu estudo o aumento da estabilidade da curcumina complexada em CD por diferentes métodos comparativamente a substância isolada ou em mistura física (**Figura 12**).

A fim de verificar a eficácia dos sistemas binários de ferulato de etila e β -CD obtidos por diferentes métodos sobre o processo inflamatório, realizou-se a avaliação da capacidade inibidora da formação de edema de pata em ratos cuja inflamação fora induzida por carragenina, um agente inflamógeno clássico (WINTER et al, 1962).

Figura 12 – Avaliação da estabilidade do ferulato de etila em complexos de inclusão obtidos por diferentes métodos.

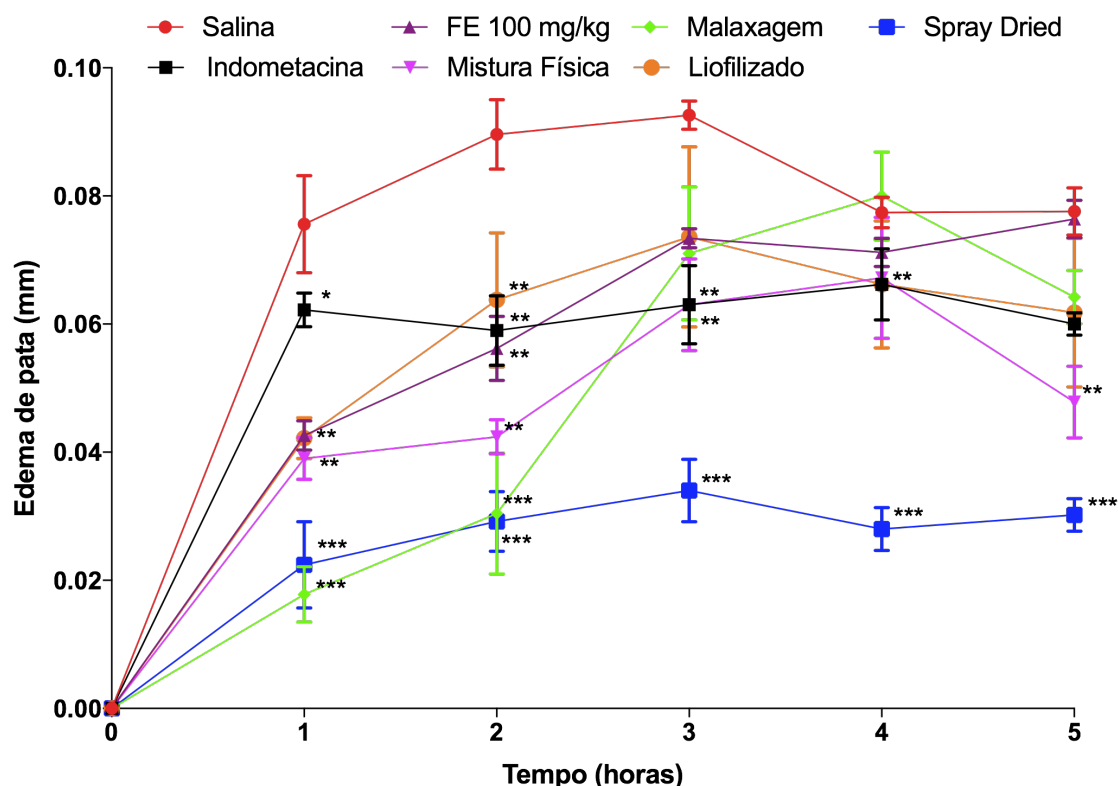


Dentre os modelos experimentais, a indução do edema de pata por carragenina tem sido o modelo de escolha para triagem de drogas com atividade anti-inflamatória desde sua descrição por Winter, Risley e Nuss (1969). A injeção de carragenina produz um edema inflamatório bifásico pela liberação de bradicinina, histamina e serotonina até a primeira hora após a indução (KIRCHHOFF et al, 1990) seguida da produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), infiltração neutrofílica, indução da COX-2 e estresse oxidativo da primeira a sexta hora após a indução (GARRELLY; BUREAU; LABREQUE, 1991; SALVEMINI et al, 1996; NANTEL et al, 1999).

Com base nos resultados experimentais obtidos, pôde-se constatar maior efetividade na inibição da formação do edema (**Figura 13**) no grupo de animais tratados pelo complexo de inclusão obtido pelo método de spray dried em todas as horas comparativamente ao grupo tratado com solução salina ($p < 0,001$) e indometacina até a 4 hora ($p < 0,01$). Os animais tratados com complexo obtido por malaxagem experimentaram redução do edema até a 2 hora após indução. Estes resultados podem estar relacionados ao perfil de dissolução dos sistemas binários obtidos (**Figura 10**), onde o perfil de liberação do complexo obtido por spray dried apresenta liberação de 100% do fármaco em menor tempo. Este resultado também pode indicar a formação de complexos de inclusão de β -CD e ferulato de etila devido a semelhança no perfil de liberação entre a liofilização e o spray dried mas diferentes perfis de resposta farmacológica no modelo

estudado. Além disso, apesar de menor concentração final de ferulato de etila no complexo, como mostrado na **Figura 12**, o complexo obtido por spray dried apresentou melhores resultados na redução de edema podendo indicar que o aumento da solubilidade e o equilíbrio estabelecido em meio aquoso entre o fármaco incluso no complexo e livre em solução promoveu melhora farmacocinética propiciando melhor ação farmacológica no modelo testado. De fato, as ciclodextrinas tem a capacidade de melhorar a biodisponibilidade de substancias com baixa solubilidade em água mas com boa permeabilidade em solução, classe II de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutico (SOAKHAM et al, 2018).

Figura 13 – Efeito de complexos de inclusão de ferulato de etila obtidos por mistura física, malaxagem, liofilização e spray dryer sobre o edema de pata induzido por carragenina.



Em estudo realizado por Cunha et al (2016), animais com edema induzido por edema de pata apresentaram menor formação de edema quando tratados com ferulato de etila 100 mg/kg v.o. Neste estudo, embora os resultados

apresentados por Cunha et al (2018) tenham sido reproduzidos, os resultados apresentados demonstram aumento da eficácia farmacológica do ferulato de etila complexado em β -CD uma vez que em mesma dose de fármaco, o efeito apresentado pelo complexo foi significativamente maior em todos os tempos analisados.

A exemplo dos achados deste estudo em que houve maior efetividade farmacológica associada a melhora da solubilidade, diversos compostos de origem natural tiveram suas propriedades melhoradas com o auxílio do processo de complexação com β -CD como o resveratrol (LI et al., 2011), ácido rosmarínico (CELIK et al., 2011), ácido ferúlico (MONTI et al., 2011), ácido cumárico (STRAŽIŠAR; ANDRENŠEK; ŠMIDOVNIK, 2008), ácido caféico (DIVAKAR; MAHESWARAN, 1997) dentre outros (PINHO et al, 2014).

Conclusão

Com base nos resultados apresentados até aqui podemos inferir que a produção de sistemas binários entre ferulato de etila e B-ciclodextrina resultou em aumento da solubilidade, melhorou o perfil de dissolução do ativo, aumentou a estabilidade e como consequência resultou em aumento da eficácia farmacológica em modelo inflamatório in vivo. Com base nos dados há fortes indícios de formação dos complexos de inclusão de acordo com os resultados de FTIR, DSC e TG que mostram interação entre o ferulato de etila e β -ciclodextrina.

Referências

ABDUL, H. M.; BUTTERFIELD, D. A. Protection against amyloid β -peptide (1–42)-induced loss of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by tricyclodecan-9-xanthogenate (D609) and ferulic acid ethyl ester: Implications for Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**. Vol. 1741, pp. 140–148, 2005.

BOLLING, Bradley W.; JI, Li Li; LEE, Chen-Hsien; PARKIN, Kirk L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone

reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

CALABRESE, Vittorio; Calafato, Stella; PULEO, Eduardo; CORNELIUS, Carolin; SAPIENZA, Maria; MORGANTI, Pierfrancesco; MANCUSO, Cesare. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 358–363, 2008.

CELIK, S. E.; OZYÜREK, M.; TUFAN, A. N.; GÜÇLÜ, K.; APAK, R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, vol. 78, n. 5, pp. 1615–24, 2011.

CHORDYIA, M. A.; SENTRIKUMARAN, K. Cyclodextrin In Drug Delivery: A Review. **Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.**, vol. 1, n. 1, pp. 19-29, 2012.

CLOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Interest of ferulic acid ethyl ester in photoprotective creams: Measure of efficacy by in vitro method. **Nat Prod Res**. Vol. 22, n. 16, pp. 1467–1471, 2008.

CONNORS, K. A. The stability of cyclodextrin complexes in solution. **Chem. Rev.** vol. 97, pp. 1325-1357, 1997.

CORTI, G.; CAPASSO, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. Physical–chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **J. Pharm. Biomed. Analys.**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.

CUNHA, F. V. M.; GOMES, B.S.; SOUSA NETO, B.; FERREIRA, A. R.; SOUSA, D. P.; MARTINS, M. C. C.; OLIVEIRA, F. A. Ferulic acid ethyl ester diminished Complete Freund's Adjuvant-induced incapacitation through antioxidant and anti-

inflammatory activity. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** Vol. 389, pp. 117–130, 2016.

DESHMUKH, S. S.; POTNIS, V.V.; SHELAR, D.B.; MAHAPARALE, P. R. Studies on inclusion complexes of ziprasone hydrochloride with B cyclodextrin and hydroxypropyl B cyclodextrin. **Indian Drugs**, vol.44, pp.677-682, 2007.

DI DOMENICO, F.; PERLUIGI, M.; FOPPOLI, C.; BLARZINO, C.; COCCIA, C.; DE MARCO, F.; BUTTERFIELD, D. A.; CINI, C. Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. **Free Radic Res.** Vol. 43, n. 4, pp. 365-375, 2009.

DIVAKAR, S.; MAHESWARAN, M. Structural studies on inclusion compounds of β -cyclodextrin with some substituted phenols. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, vol. 27, n. 02, 113–126., 1997.

FENG, Y.; LU, Y. W.; XU, P. H.; LONG, Y.; WU, W. M.; LI, W.; WANG, R. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia–reoxygenation: Relationship to their antioxidant activities. **Biochim Biophys Acta.** Vol. 1780, pp. 659–672, 2008.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K.A. Advances in analytical chemistry and instrumentation. **Interscience**, New York, v. 4, p. 117-212, 1965.

HOSODA, Asao; OZAKI, Yoshihiko; KASHIWADA, Ayumi; MUTOH, Michihiro; WAKABAYASHI, Keiji; MIZUNO, Kazuhiko; Nomuraa, Eisaku; Taniguchi, Hisaji. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 10, p. 1189–1196, 2002.

ISLAM, Shafiqul; YOSHIDA, Hiroshi; MATSUKI, Naoaki; ONO, Kenichiro; NAGASAKA, Reiko; USHIO, Hideki; GUO, Ying; HIRAMATSU, Toshiyuki;

HOSOYA, Takamitsu; MURATA, Takahisa; HORI, Masatoshi; OZAKI, Hiroshi. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- κ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **J Pharmacol Sci**, vol. 111, p. 328 – 337, 2009.

JANTARAT, C.; SIRATHANARUN, P.; RATANAPONGSAI, S.; WATCHARAKAN, P.; SUNYAPONG, S.; WADU, A. Curcumin-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation Methods: Effect of Common Solvent Evaporation, Freeze Drying, and pH Shift on Solubility and Stability of Curcumin. **Tropic. J. Pharmaceutic. Res.**, vol. 13, n. 8, pp. 1215-1223, 2014.

JOSHI, Gururaj; PERLUIGI, Marzia; SULTANA, Rukhsana; AGRIPPINO Ravagna; CALABRESE, Vittorio D.; BUTTERFIELD, Allan. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe²⁺/H₂O₂: Insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, vol. 48, p. 318–327, 2006.

KFOURY, M.; LANDY, D.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GEORGES, H.; FOURMENTIN, S. Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. **Beilstein J. Org. Chem.** Vol. 10, pp. 2322–2331, 2014.

KIKUZAKI, Hiroe; HISAMOTO, Masashi; HIROSE, Kanae; AKIYAMA, Kayo; TANIGUCHI, HISAJI. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 2161-2168, 2002.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V. DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 11, pp. 823-835, 2011.

LI, X.; LI, H.; LIU, M.; LI, G.; LI, L.; SUN, D. From guest to ligand – A study on the competing interactions of antitumor drug resveratrol with β -cyclodextrin and bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, vol. 521, n. 1-2, pp. 74–79, 2011.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E.; MASSON, M. Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery. **Am J Drug Deliv**, vol. 2, pp. 1-15, 2004.

LYRA, M. A.; MARQUES, D.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Rev. Ciênc. Farmac. Básic. Aplic.**, v. 31, n. 2, p. 117-124, 2010.

MONTEIRO, D. S.; FIGUEIRAS, A. R. R. Cyclodextrin as Potential Therapeutic Agents. **Bol. Inform. Geum.**, vol. 7, n. 4, pp.33-48, 2016

MONTI, D.; TAMPUCCI, S.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAINO, V.; CENTINI, M.; ANSELMINI, C. Permeation and Distribution of Ferulic Acid and Its α -Cyclodextrin Complex from Different Formulations in Hairless Rat Skin. **AAPS PharmSciTech**, vol. 12, n. 2, 2011.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **J Pharm Biomed Anal.**, vol. 10, n. 113, pp. 226-238, 2015.

NAZARÉ, A. C.; FARIA, C. M. Q. G.; CHIARI, B. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; CORRÊA, M. A. ISAAC, V. L. B.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Ethyl ferulate, a component with anti-inflammatory properties for emulsion-based creams. **Mol.** Vol. 19, pp. 8124-8139, 2014.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N.S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International journal of pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131-150, 2000.

PATIL, J. S.; PANDYA, N. R.; MARAPUR, S. C.; SHIRALASHETTI, S. S. Influence of method of preparation on physicochemical properties and in vitro drug release profile of nimodipine–cyclodextrin inclusion complexes: A comparative study. **Int J Pharmacy Pharmaceutical Sci**, vol. 2, pp. 71-81, 2010.

PERLUIGI, Marzia; JOSHI, Gururaj; SULTANA, Rukhsana; CALABRESE, Vittorio; DE MARCO, Carlo; COCCIA, Raffaella; CINI, Chiara; BUTTERFIELD, Allan. In Vivo Protective Effects of Ferulic Acid Ethyl Ester Against Amyloid- β Peptide 1–42-induced Oxidative Stress. **Journal of Neuroscience Research**, vol. 84, p. 418–426, 2006.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydr Polym**. Vol. 101, n. 1, pp. 121-35, 2014.

PINNAMANENI, S.; DAS, N.; DAS, S. K. Formulation approaches for orally administered poorly soluble drugs. **Pharmazie**, vol. 57, pp. 291-300, 2002.

SAOKHAM, P.; MUANKAEW, C.; JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, vol. 23, pp. 1-15, 2018.

SCAPAGNINI, Giovanni; BUTTERFIELD, Allan; COLOMBRITA, Claudia; SULTANA, Rukhsana; PASCALE, Alessia; CALABRESE, Vittorio. Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, Vol. 6, n. 5, p. 811-818, 2004.

SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochem Rev**. vol. 09, n. 01, pp. 147-170, 2010.

SOARES-SOBRINHO, J.L. et al. A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: physicochemical characterization, thermal stability,

and compatibility of benznidazole. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

SOBRINHO, J.L.S. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1534-1538, 2011.

SON, Sopheak; LEWIS, Betty A.. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 468-472, 2002.

SPRICIGO, R.; BOTELHO, K. C.; CONSIGLIERI, V. O.; SERRA, C. H. Obtenção e Avaliação de Complexos de Inclusão de Furosemida com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β - ciclodextrina: Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 27, n. 5, p. 645-53, 2008.

STELLA, V. J.; RAO, V. M.; ZANNOU, E. A.; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 3-16, 1999.

STRAŽIŠAR, M., ANDRENŠEK, S., & ŠMIDOVNIK, A. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. **Food Chemistry**, vol. 110, n. 3, pp. 636–642, 2008.

SULTANA, Rukhsana; RAVAGNA, Agrippino; MOHMMAD-ABDUL, Hafiz; CALABRESE, Vittorio; BUTTERFIELD, D. Allan. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β -peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity:relationship to antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, vol. 92, p. 749–758, 2005.

SULTANA, Rukhsana. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1822, p. 748–752, 2012.

TSAI, Y. C.; LEE, Y. M.; HSU, C. H.; LEU, S. Y.; CHIANG, H. Y.; YEN, M. H.; CHENG, P. Y. The effect of ferulic acid ethyl ester on leptin-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells. **Experiment Mol Med**. Vol. 47, pp. 1-9, 2015.

TUREK, C.; STINZING, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. **Food Research International**, vol. 46, n. 1, pp. 341-353, 2012.

CAPÍTULO 3

**Desenvolvimento tecnológico de
nanoemulsão para vetorização do ferulato
de etila por via tópica**

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsão para vetorização do ferulato de etila por via tópica

Francisco Valmor Macedo Cunha¹, Arthur Sérgio Avelino de Medeiros², Alaine Maria dos Santos Silva³, Damião Pergentino de Sousa⁴, Francisco de Assis Oliveira⁵, Arnóbio Antônio da Silva Júnior³, Lívio César Cunha Nunes¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio). Universidade Federal do Piauí – UFPI.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

⁴ Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Resumo

Introdução: A utilização de formas farmacêuticas para aplicação tópica tem aumentado nos últimos anos devido a busca por formas de tratamento com menos efeitos adversos e colaterais. O ferulato de etila é um fenilpropanóide com atividades antioxidante, antiinflamatória derivado do óleo essencial de várias plantas. As nanoemulsões tem sido a tecnologia de escolha para aplicação de substancia hidrofóbicas de forma tópica propiciando ambiente favorável a pele e perfil de liberação controlado. **Objetivo:** Desenvolver, otimizar, caracterizar e testar em modelo de edema de pata induzido por carragenina nanoemulsão para vetorização de ferulato de etila por via tópica. **Material e Métodos:** Diagrama de fases pseudo-ternário foi desenvolvido com variações nas concentrações de surfactantes (Tween 80, Span 80), óleo (óleo de soja) e água. Os sistemas foram obtidos por ultrassonicação e foram avaliados quanto aos aspectos macroscópicos bem como tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Ao melhor sistema obtido foi incorporado ferulato de etila a 1%, 2.5% e 5%. A melhor nanoemulsao foi então avaliada quanto a estabilidade,

pesquisa de interações químicas através de FT-IR, avaliação de permeação in vitro através de célula de Franz, teste de irritação cutânea e avaliação de atividade antiinflamatória in vivo através de modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. **Resultados:** Dos sistemas obtidos, as melhores características de tamanho de partícula, PDI e estabilidade foi obtido com a proporção de 2.5% de óleo e 10% de tensoativo e 1% de ferulato de etila. A análise por FT-IR não revelou interação entre os componentes da nanoemulsão. O ensaio de liberação in vitro confirmou o perfil de liberação controlado, 26% de liberação do ativo após 6 horas de ensaio. A nanoemulsão obtida não apresentou sinais de irritação cutânea e foi efetiva na redução do edema ($p < 0,01$) da terceira a quinta hora no ensaio de edema de pata em ratos. **Conclusão:** A nanoemulsão desenvolvida apresentou boa estabilidade, perfil de liberação controlado e foi efetiva na redução da inflamação no modelo testado.

Palavras-chave: ferulato de etila; nanoemulsão; permeação in vitro

Abstract

Introduction: The use of pharmaceutical forms for topical application has increased in recent years due to the search for forms of treatment with fewer adverse and side effects. Ethyl ferulate is a phenylpropanoid with antioxidant, anti-inflammatory activities derived from the essential oil of several plants. Nanoemulsions have been the technology of choice for application of hydrophobic substances in a topical manner providing a favorable skin environment and controlled release profile. **Aim:** To develop, optimize, characterize and test in a model of paw edema induced by carrageenan nanoemulsion for the vectorization of topical ethyl ferulate. **Material and Methods:** Pseudo-ternary phase diagram was developed with variations in the concentrations of surfactants (Tween 80, Span 80), oil (soybean oil) and water. The systems were obtained by ultrasound and were evaluated for macroscopic aspects as well as particle size, polydispersity index and zeta potential. The best system obtained was 1%, 2.5% and 5% ethyl ferulate. The best nanoemulsion

was then evaluated for stability, search for chemical interactions through FT-IR, evaluation of in vitro permeation through Franz cell, skin irritation test and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity through induced paw edema model by carrageenan in rats. **Results:** From the obtained systems, the best characteristics of particle size, PDI and stability were obtained with the proportion of 2.5% of oil and 10% of surfactant and 1% of ethyl ferulate. FT-IR analysis revealed no interaction between nanoemulsion components. The in vitro release assay confirmed the controlled release profile, 26% release of the active after 6 hours of assay. The nanoemulsion obtained showed no signs of skin irritation and was effective in reducing edema ($p < 0.01$) from the third to fifth hour in the para edema test in rats. **Conclusion:** The developed nanoemulsion presented good stability, controlled release profile and was effective in reducing inflammation in the model tested.

Key words: ethyl ferulate; nanoemulsion; in vitro permeation

Introdução

Atualmente há interesse global da descoberta e desenvolvimento de drogas derivadas de fontes naturais devido a sua promessa de benefícios terapêuticos e menos efeitos adversos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005; GOHEL et al, 2014). Os óleos essenciais são líquidos oleosos, voláteis, aromáticos e de ocorrência natural podendo ser obtidos de várias partes de plantas, especialmente das partes aéreas. São derivados do metabolismo das plantas onde funcionam como substâncias defensoras contra patógenos, repelentes de insetos (BAKKALI et al, 2008; GOSSLAU et al, 2011).

O ferulato de etila, um fenilpropanóide presente no óleo essencial de diversas plantas e especialmente na casca do arroz, possui ação anti-inflamatória (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; PERLUIGI et al, 2006; ISLAM et al, 2009; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016), antioxidante (KIKUZAKI et al, 2002; ABDUL; BUTTERFIELD, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; PERLUIGI et al, 2006; CALABRESE et al, 2008; FENG et al, 2008; ISLAM et al, 2009; BOLLING et al, 2011; NAZARÉ et al, 2014; CUNHA et al, 2016),

antiapoptótica (ABDUL; BUTTERFIELD, 2004), neuroprotetora (SCAPAGNINI et al, 2004; SULTANA et al, 2005; JOSHI et al, 2006; FENG et al, 2008; GARRIDO et al, 2012), antimutagênica (DI DOMENICO et al, 2009), antirreumática e condroprotetora (CUNHA et al, 2016) e antiproliferativa (TSAI et al, 2015) documentadas na literatura internacional.

Para biocompostos hidrofóbicos, a baixa solubilidade em água é o maior fator limitante para seu uso em diferentes aplicações na indústria alimentar e farmacêutica (KORKINA et al, 2011; TUREK; STINZING, 2012; POUNEH et al, 2013 KFOURY et al, 2014). Diversas estratégias tem sido traçadas para melhorar a hidrossolubilidade de compostos tais como gotículas, nanoemulsões, lipossomas e micelas poliméricas (BAJERSKI et al, 2016). Dentre as formulações tópicas, as nanoemulsões são geralmente utilizadas para aumentar a solubilidade, estabilidade e bioatividade de fitoquímicos devido sua alta estabilidade cinética (SARI et al, 2015).

Nanoemulsões são sistemas com dispersão isotrópica compostas por água, óleo e surfactantes/co-surfactantes, geralmente transparentes e apresentam diâmetro médio de gotículas entre 20-200 nm (HARWANSH; MUKHERJEE; BAHADUR; BISWAS, 2015). Estas aplicações relacionam-se a natureza lipofílica das nanoemulsões que carregam drogas insolúveis ou pouco solúveis em água. Formulações tópicas nanoemulsionadas proporcionam vantagens únicas como dispersão de fases óleo em água (O/A) que permitem aumentar a solubilidade de drogas lipofílicas na fase oleosa e a fase continua provê um ambiente favorável a pele (GUPTA et al, 2016; SINGH et al, 2017).

Nanoemulsões têm sido utilizadas em muitas formas farmacêuticas para via tópica, ocular, intravenosa, intranasal e oral (GUPTA et al, 2016; SINGH et al, 2017). As nanoemulsões têm sido aplicadas com sucesso nas áreas farmacêutica e cosmética devido sua habilidade de carrear substâncias apolares em dispersões óleo/água nanométricas (ZEEB et al, 2014). Outra interessante característica destes sistemas é que as gotículas são preparadas com lipídios biocompatíveis e biodegradáveis, e, portanto, possuem baixa toxicidade aguda e crônica (JAISWAL; GIDWANI; VYAS, 2014).

Tal experiência tem sido realizada com inúmeros fármacos anti-inflamatórios com resultados positivos e diminuição de efeitos adversos tais

como hidrocortisona, dexametasona, indometacina, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e piroxicam (LOFTSSON; MASSON, 2001). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver, otimizar e caracterizar nanoemulsão para vetorização de ferulato de etila por via tópica.

Materiais e Métodos

Materiais

O óleo de soja (Sigma Aldrich, EUA) foi o tipo de óleo utilizado neste estudo. Tween[®] 80 (*Polyoxyethylene (20) sorbitan*, Synth, Brasil) e Span[®] 80 (*Sorbitan monooleate*, Sigma Aldrich, EUA) foram os surfactantes utilizados. O ferulato de etila, foi obtido por via sintética e fornecido pelo professor Damião Pergentino de Sousa, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba.

Determinação da proporção de surfactantes

Água destilada, Tween[®] 80 e Span[®] 80 foram adotados como fase aquosa e mistura de surfactantes, respectivamente. Cada formulação preparada continha 5 gramas de massa e o EHL foi fixado em 12. Para determinação da proporção entre surfactantes foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{EHLs}=\text{EHLX}\cdot\text{X}+\text{EHL}\cdot\text{Y}$$

Onde EHLX representa o EHL do Tween[®] 80, X representa a fração de Tween[®] 80, EHL Y representa o EHL do Span[®] 80 e Y, a fração de Span[®] 80. Cada mistura de surfactante foi adicionada a fase oleosa.

Diagrama de fase pseudo-ternário

Após a determinação das proporções de surfactantes, o diagrama de fase foi plotado. Todos os sistemas foram preparados pelo mesmo procedimento: surfactantes foram solubilizados na fase oleosa, seguido do acréscimo da fase

aquosa. Proporções de óleo e surfactantes variaram nos sistemas como mostrado nas tabelas 1 e 2. Os sistemas foram submetidos a sonicação (Vibra-Cell VCX-134 ATFT, 40 KHz, Sonics, EUA) durante 4 pulsos de 2 minutos intercalados por 1 minuto de repouso a uma amplitude de 60% do total. Ao final da sonicação, as amostras foram avaliadas quanto a aparência.

Tabela 1 – Proporção surfactante/óleo usados no diagrama de fases com óleo fixo a 5%.

Proporção surfactante/óleo	Peso inicial de óleo (g)	Peso inicial de surfactante (g)
0,5	0,25	0,125
1	0,25	0,25
2	0,25	0,5
3	0,25	0,75
4	0,25	1

Tabela 2 – Proporção surfactante/óleo usados no diagrama de fases com surfactante fixo a 10%.

Proporção surfactante/óleo	Peso inicial de óleo (g)	Peso inicial de surfactante (g)
4,0	0,125	0,5
1,3	0,375	0,5
1,0	0,5	0,5
0,6	0,75	0,5
0,5	1	0,5
0,4	1,25	0,5

Otimização das condições de produção de nanoemulsão

A fim de otimizar o sistema de produção das nanoemulsões, foi avaliado o efeito de diferentes amplitudes (25%, 50%, 60%, 75% e 100%) e temperaturas (25°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C). Para tal avaliação, utilizou-se o sistema não translúcido composto por 5% de óleo e 5% de tensoativo.

Avaliação do tamanho das partículas e do potencial zeta

O tamanho médio das partículas e o potencial zeta foi medido através de DLS (*dynamic light scattering*) (NanoZS, Malvern Instruments, Malvern, U.K.) 24 horas após a produção das emulsões. As amostras foram diluídas 100 vezes em água destilada antes da análise. As análises foram realizadas a 25°C, 30 segundos para aclimatação, e três baterias de leitura para cada amostra constituída por 13 corridas cada. Foram tomados os valores de tamanho médio das partículas, PDI (índice de polidispersão) e potencial zeta. As análises foram realizadas em triplicatas e os dados apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

Incorporação do ferulato de etila em nanoemulsão

Após a otimização e avaliação das características das emulsões obtidas, o sistema constituído por 2,5% de óleo e 10% de tensoativo foi escolhido para incorporação do ferulato de etila. Inicialmente, optou-se pelas concentrações de 1%, 2.5% e 5% de ferulato de etila em sistemas de 5 gramas de massa final. As proporções de óleo e tensoativo foram mantidas e a proporção do fármaco foi retirada da massa de água como demonstrado na tabela 3. Os sistemas foram sonicados durante 4 pulsos de 2 minutos intercalados por 1 minuto de repouso a uma amplitude de 60% do total em temperatura ambiente. As amostras foram observadas quanto ao aspecto macroscópico e postas em repouso. Após 24 horas, foram mensurados tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta.

Tabela 3 – Composição dos sistemas para incorporação do ferulato de etila.

% ferulato de etila	Peso inicial ferulato de etila (g)	Peso inicial de óleo (g)	Peso inicial de tensoativo (g)	Peso inicial de água (g)
1%	0,05	0,125	0,5	4,325
2.5%	0,125	0,125	0,5	4,25
5%	0,25	0,125	0,5	4,125

Doseamento do ferulato de etila incorporado em nanoemulsão

Para o doseamento do ferulato de etila, alíquotas de 1 e 2 mL das nanoemulsões nas concentrações de 5% e 2.5%, respectivamente, foram inicialmente diluídos para 50 mL com concentração final de 10000 ug/mL. A nanoemulsão de 1% foi diluída em 10 mL pela adição de 1 mL do sistema a uma concentração de 10000 ug/mL. As diluições dos 3 sistemas foram então utilizadas para produção de triplicatas, numa concentração final de 5 ug/mL. As triplicatas de cada sistema foram então lidas em espectrofotômetro UV-VIS no modo varredura (200-400 nm), para identificação das absorbâncias no pico de 325 nm e determinação da concentração através da curva padrão do ferulato de etila.

Espectroscopia por Infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

As interações entre os componentes dos sistemas foi avaliada através da técnica FTIR –ATR (SHIMADZU IR Prestige 21, Tokyo, Japan). Foram utilizados 20 scans com resolução de 4 cm^{-1} entre 4000 e 700 cm^{-1} para os compostos puros (ferulato de etila, Tween 80, Span 80 e óleo de soja), e para os sistemas nanoemulsionados produzidos.

Estudos de estabilidade

As nanoemulsões incorporadas com ferulato de etila a 1% e a nanoemulsão sem o ferulato de etila foram armazenadas por um ano ao abrigo da luz. As amostras foram tomadas 24 horas após a produção dos sistemas (considerado dia 0), depois a cada mês até o quarto mês, aos seis meses e com 1 ano para avaliação do tamanho das partículas e do potencial Zeta. A mensuração foi realizada a 25°C usando os parametros descritos anteriormente. Todas as análises foram realizadas em triplicata e representadas com média \pm desvio padrão (DP).

Estudo de liberação in vitro

Ensaio de liberação in vitro foi realizado através do sistema de células de difusão estática de Franz (Crown Scientific, Sommerville, USA) sob condições

controladas de temperatura a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. No compartimento doador foi adicionado 3.0 mL de cada um dos sistemas coloidais produzidos (Nanoemulsão de ferulato de etila 1%, 2.5% e 5%) e hermeticamente seladas e separadas do compartimento receptor por um filtro sintético de acetato de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ (previamente hidratado em tampão fosfato por 24h). O compartimento receptor foi preenchido com 11,0 mL de solução tampão fosfato ajustada para pH 7,4, que permaneceu sob agitação magnética a 360 rpm durante toda o experimento. Em intervalos específicos, alíquotas de 2,0 mL foram removidas e analisadas por espectrofotometria UV a 325 nm previamente validadas. O mesmo volume de solução tampão era recolocado no sistema a cada retirada de alíquotas para análise para manter as condições do coletor. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média \pm desvio padrão (DP).

Animais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar fêmeas, pesando entre 180 e 220 gramas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, a temperatura de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo de claro e escuro de 12h com ração padrão (Labina – Purina®) e água *ad libitum*. Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas e separados por grupos de 6 animais. Os protocolos experimentais foram realizados apenas após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais da Universidade Federal do Piauí (CEE/UFPI, Parecer N° 082/14).

Efeito da nanoemulsão de FE sobre o edema de pata induzido por carragenina

Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via tópica, com a nanoemulsão branca, ferulato de etila 1% em etanol, diclofenaco dietilamônio (10 mg/kg) e nanoemulsão contendo ferulato de etila 1% e, após 1h, receberam a carragenina. O volume das patas foi registrado por paquimetria (Digimess®) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 e 5

h) após a administração intraplantar de carragenina. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre o diâmetro antero-posterior e o inicial da pata (WINTER et al., 1962).

Avaliação da irritabilidade cutânea em ratos

A irritação cutânea foi avaliada em ratos albinos, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com livre acesso a água e a ração. Uma única dose de 100uL da nanoemulsão e de ferulato de etila foi aplicada na face dorsal da orelha esquerda, mantendo a orelha direita como controle. O aparecimento de eritema, irritação, comportamento característico de coceira foi avaliado durante 6 dias (BABOOTA et al, 2007).

Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni entre grupos com mais de uma variável independente. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A produção de uma nanoemulsão inicia-se pela escolha de seus componentes, desta forma no intuito da produção de nanoemulsão que carresse o ferulato de etila, um composto lipofílico, através da pele, o primeiro passo para a produção deste sistema foi a escolha do óleo a ser utilizado uma vez que apenas a droga solubilizada pode permear a pele como maior facilidade (AISWARYA; REZA; RAJAN, 2015). Recentemente, atenção especial tem sido dada aos óleos vegetais e estes têm sido preferidos devido sua segurança e biocompatibilidade além da diversidade de benefícios que podem agregar as nanoemulsões ações hidratante, protetora da radiação solar e repelente (BAJERSKI et al, 2016). Neste sentido, optou-se pela utilização do óleo de soja pela sua biocompatibilidade, baixo custo e fácil acesso além do sucesso de sua

aplicação na produção de nanoemulsões de candetazana, piroxicam, docetaxel, fisetina e clotrimazol (GAO et al, 2011; RAGELLE et al, 2012; BORHADE et al, 2012; MOTAWEA et al, 2016; VERMA et al, 2016).

A escolha e adição do emulsificante é a etapa seguinte no desenvolvimento de uma nanoemulsão. Este componente é crítico para a criação de gotículas devido o decréscimo da tensão superficial propiciando ao mesmo tempo melhora da estabilidade devido interações eletro repulsivas (GUPTA et al, 2016). No geral, o emulsificante utilizado é um surfactante, mas proteínas e lipídios também tem sido utilizados. Neste estudo, utilizou-se a mistura de surfactantes entre tween 80 e span 80, ambos tem sido amplamente utilizados no desenvolvimento de nano dispersões especialmente pelo fato de possuírem em sua estrutura molecular grandes regiões polares. Este fato está associado ao aumento da estabilidade nas gotículas em decorrência da diminuição da coalescência entre as mesmas (MONTEIRO et al, 2012; SINGH et al, 2017).

A avaliação da influência das variações nas proporções dos constituintes das nanoemulsões está representado na tabela 4, figura 1 e Figura 2. Dentro do desenho experimental desenvolvido neste estudo e valor de EHL definido, partiu-se da proporção de óleo de 5% e variou-se a proporção de tensoativo (Span 80 e Tween 80). Dentre os sistemas nanoemulsionados gerados após análise de PDI, tamanho de partículas e potencial zeta, a nanoemulsão constituída por 5% de óleo e 10% de mistura de tensoativos apresentou melhores características (Tabela 1).

O passo seguinte foi a otimização do percentual de óleo para produção da nanoemulsão. Desta forma, fixou-se a proporção de tensoativo a 10%, melhor percentual de tensoativo no teste anterior, e variou-se a proporção de óleo. Nesta segunda análise, foram produzidas duas nanoemulsões transparentes como pode ser observado na **figura 2**. Com base nos resultados encontrados nesta análise, a nanoemulsão constituída por 2,5% de óleo e 10% de tensoativo foi a escolhida para carrear o ferulato de etila por possuir menor tamanho de partícula.

Tabela 4 – Composição, tamanho de partículas, potencial de polidispersão e potencial zeta dos sistemas nano emulsionados desenvolvidos.

Óleo (%)	Tensoativo (%)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
5	2,5	204	0,34	-20,2
5	5	312	0,43	-21,5
5	10	200,6	0,272	-20,2
5	15	276,1	0,39	-21,4
5	20	274,2	0,39	-20,7
2,5	10	62,15	0,28	-19,7
7,5	10	94,09	0,28	-20,1
10	10	123,7	0,23	-18,9
15	10	217	0,38	-20,2
20	10	212	0,26	-20,3
25	10	236	0,34	-20,4

As proporções de óleo, surfactantes e água para cada um dos sistemas desenvolvidos estão representados no diagrama de fase pseudo-ternário (DFPT), método clássico para demonstração dos sistemas de equilíbrio das fases formadas por mais de dois componentes, a exemplo das NE (**Figura 1**). O diagrama de fase pseudo-ternário permite identificar quais as proporções dos componentes produz sistemas com maior estabilidade (LAWRENCE; RESS, 2000; SILVA et al, 2009). É interessante salientar que a mistura dos componentes de uma nanoemulsão nem sempre resultarão em sistemas de dispersão homogêneos (FORMARIZ, 2004). Nos DFPT apresentados, todas as proporções de misturas performadas resultaram em nanoemulsoes óleo em água (O/A), ideal para carrear drogas lipofílicas como é o caso do ferulato de etila, embora nem todas tenham apresentado estabilidade e transparência.

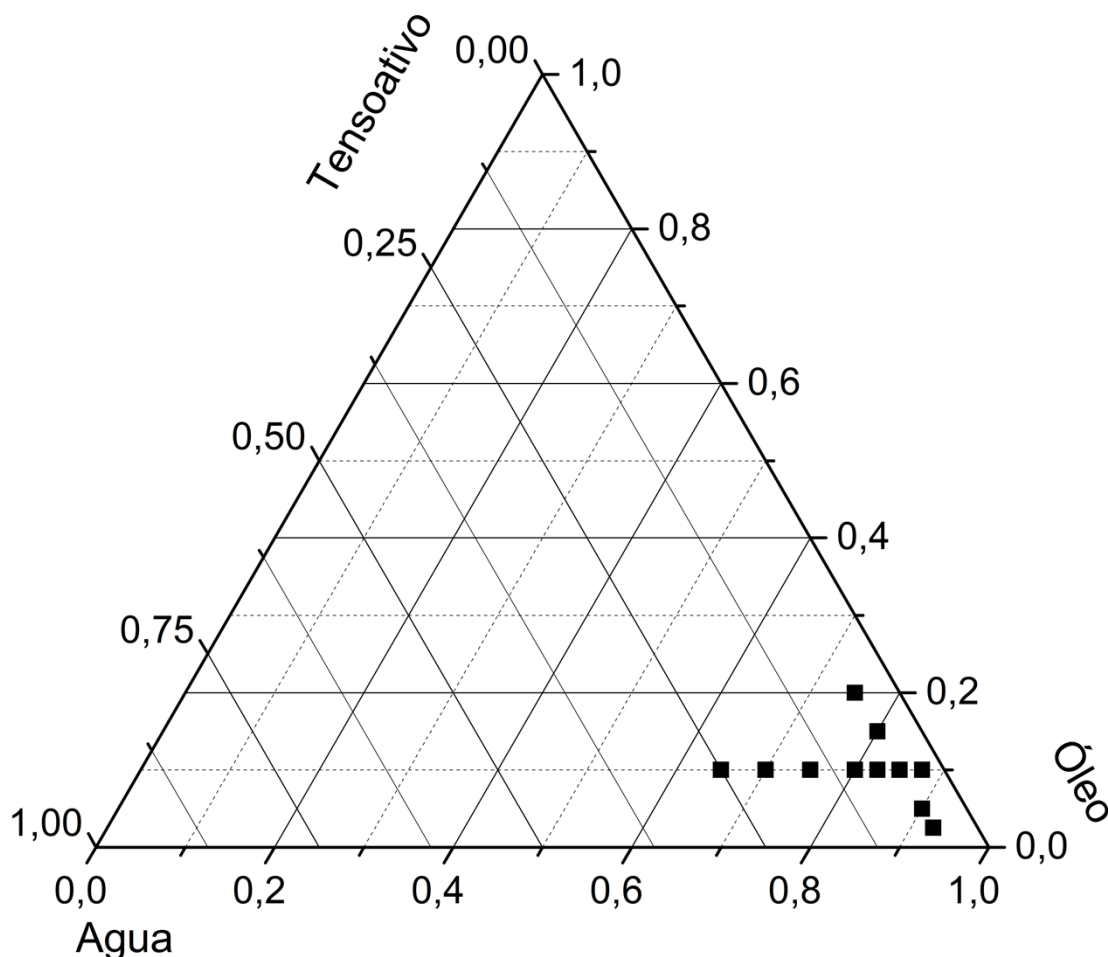


Figura 1 – Diagrama de fases pseudo-ternário envolvendo óleo de soja estabilizado com mistura de surfactantes Span 80 e Tween 80 em EHL = 12.

Nanoemulsões são definidas como dispersões nanométricas instáveis termodinamicamente. Isso, em suma, significa que é necessária a aplicação de fonte de energia disruptiva externa para a quebra e produção de gotículas nanoemulsionadas (QADIR et al, 2016). Desta forma, com o vislumbre de aplicação industrial, o método de ultrasonicação foi o escolhido para este estudo. O efeito de produção de gotículas por este método dá-se pela produção de ondas de som em altas frequências que por sua vez formam bolhas de cavitação que ao implodir, geram ondas de choque reduzindo o tamanho das partículas (GOGATI; KOBATI, 2009; LEONG; WOOSTER; KENTISH, 2009).

A fim de verificar a influência de condições de produção de nanoemulsões sobre as características de tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, lançou-se mão de um dos sistemas desenvolvidos não translúcidos constituído por 5% de óleo de 5% de tensoativo. Desta forma, pode-

se constatar que a utilização de baixas amplitudes (25%) do ultrasonicador geraram gotículas maiores que as encontradas nos sistemas agitados a frequências acima de 50% da amplitude. Entretanto, as gotículas produzidas não diminuíram de modo proporcional ao aumento da amplitude uma vez que os menores tamanhos de gotículas observados foram encontrados em frequências intermediárias (60 e 75%). O aumento da amplitude, no entanto, resultou em menor polidispersão das populações de gotículas nas nanoemulsões como pode ser observado pelos valores de PDI. Estes resultados corroboram em parte com aqueles apresentados em outros estudos em que afirmam que quanto maior a energia empregada pelo ultrasonicador, menor o tamanho das partículas obtidas (DONSI; FERRARI, 2016).

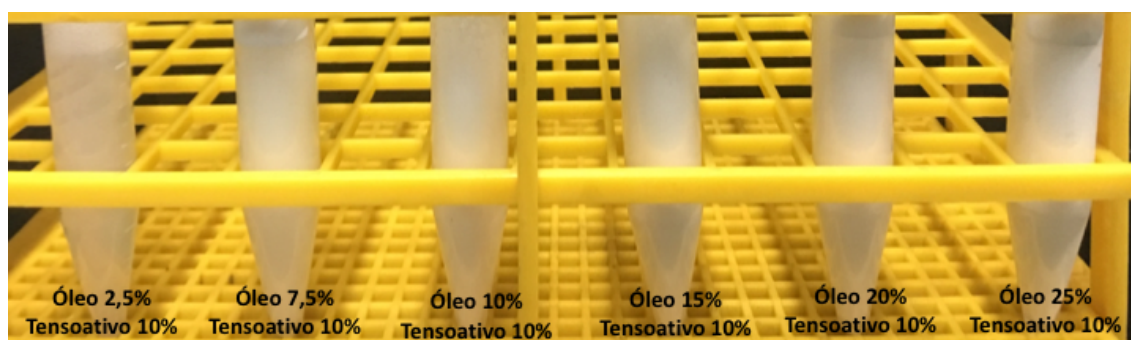


Figura 2 – Registros fotográficos dos sistemas nanoemulsionados com tensoativo fixo a 10% e variação da proporção de óleo de 2,5 a 25%.

A elevação da temperatura no sistema testado foi capaz de produzir nanoemulsões com gotículas menores e baixos índices de polidispersão (PDI). Entretanto, todos os sistemas desenvolvidos sob aquecimento neste estudo apresentaram baixa estabilidade e sofreram separação de fases. Na técnica de inversão de fases, para obtenção de nanoemulsões, após o aquecimento da mistura da nanoemulsão, é realizada rápido resfriamento. Esse processo garante produção de nanoemulsões com menor tamanho de partículas e com maior estabilidade a longo prazo (SINGH et al, 2017). Neste sentido, talvez a ausência da etapa de resfriamento rápido após o aquecimento dos sistemas tenha sido o fator catastrófico para a baixa estabilidade dos sistemas testados. O potencial zeta, entretanto, não foi influenciado pelas modificações de amplitude de ultrasonicação ou de temperatura dos sistemas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Efeito da amplitude de sonicação sobre as características dos sistemas nanoemulsionados.

Amplitude (%)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
25	200,9	0,452	-20,2
50	112,4	0,237	-21,5
60	100,9	0,246	-20,2
75	104,8	0,23	-21,4
100	152,5	0,071	-20,7

O Potencial Zeta foi outro parâmetro analisado nas dispersões desenvolvidas. Trata-se de uma medida da carga na superfície da nanoemulsão que fornece indícios de sua estabilidade a longo prazo bem como de interação com a matriz alvo. Como regra geral, os valores do potencial zeta de ± 30 mV são considerados bons indicadores de estabilidade a longo prazo. Nanoemulsões com valor de potencial zeta menores que os estabelecidos podem progredir para coalescência (KISLUKHIN et al, 2016; QADIR et al, 2016; SINGH et al, 2017). Neste sentido, as dispersões desenvolvidas neste estudo, com média de potencial zeta de -20 mV, estão na faixa esperada para nanoemulsões com boa estabilidade a longo prazo (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Tabela 6 – Efeito da temperatura de sonicação sobre as características dos sistemas nanoemulsionados.

Temperatura (°C)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
25	312	0,43	-19,8
40	99,3	0,24	-20,1
50	108,4	0,25	-20,3
60	110,5	0,37	-20,2
70	142,7	0,07	-19,9

Após a padronização da técnica, constituintes e definição do melhor sistema para incorporação do ferulato de etila, as dispersões foram montadas e acrescidas de 1%, 2.5% e 5% de ferulato de etila (m/m). A massa correspondente ao ferulato de etila foi retirada da massa de água para cada um dos sistemas acima. O acréscimo de ferulato de etila, substância oleosa, associada a retira da de água do sistema deve ter sido o fator principal para o aumento do tamanho das gotículas bem como para a baixa estabilidade apresentada pelos sistemas de 2.5% e 5% de FE (Tabela 7). O aumento da massa de óleo no sistema deve ter resultado em aumento da fase interna da dispersão culminando em aumento no tamanho das gotículas e associado à diminuição da fase externa por diminuição na proporção de água na dispersão, culminou em evento disruptivo na tensão superficial entre fases interna e externa favorecendo a separação de fase observada nos sistemas com ferulato 2.5% e 5% (DJEKIC et al, 2012; OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). Achados semelhantes relacionados ao aumento do tamanho das partículas após incorporação de fármacos lipofílicos foram relatados para dispersões de doxorubicina e benznidazol (FORMARIZ et al, 2006; FORMARIZ et al, 2008; FORMARIZ et al, 2010; STRECK et al, 2016)

Tabela 7 – Efeito da incorporação ferulato de etila sobre o tamanho das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta.

% Ferulato de etila	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1%	150,2	0,203	-18,2
2,5%	502,3	0,545	-20,5
5%	597,1	0,471	-19,5

As dispersões obtidas com incorporação de ferulato de etila foram analisadas através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. De acordo com a avaliação dos espectros infravermelhos representados na **Figura 3**, observa-se a presença de pico em 1164 cm^{-1} referente ao estiramento C-O característico dos ésteres, pico em 1630 cm^{-1} referente a vibração da C=C conjugada a ligação C=O e o pico de 3079 cm^{-1} referente ao

estiramento das ligações C-H de alcanos. Nos espectros infravermelhos do Span 80 e do Tween 80 podemos verificar presença de picos em 1739 e 1740 cm^{-1} , respectivamente, referentes a estiramentos de C=O. Na mesma faixa, o óleo de soja apresentou picos em 1743 cm^{-1} também em razão dos estiramentos C=O, e outro pico em 1159 cm^{-1} referente a estiramento de ligações C-O. A água apresentou seu espectro característico a 25°C, apresentando pico a 1640 cm^{-1} (COKER; REIMERS; WATTS, 1982). Na mesma faixa a mesma banda larga pode ser observada no espectro infravermelho do tween 80 justificável pelo grande número de ligações C-O presentes neste composto. Além disso pode-se observar a presença de picos na faixa entre 1630 e 1650 cm^{-1} em todos os compostos isolados analisados referentes a vibração da C=C conjugada a ligação C=O (**Figura 4**).

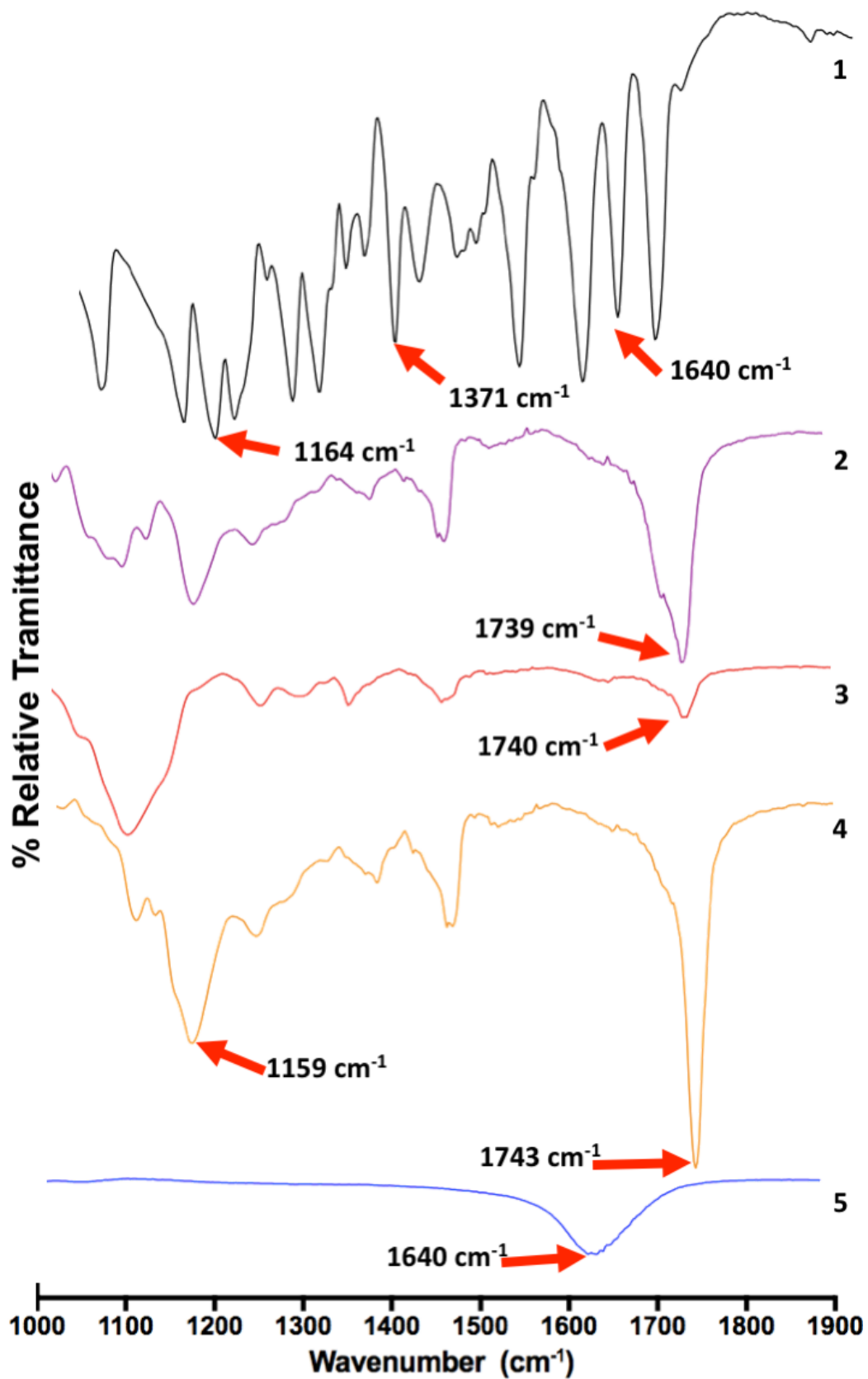


Figura 3 – Espectros infravermelhos dos componentes da nanoemulsão isoladamente. 1 – Ferulato de etila; 2 – Span 80; 3 – Tween 80; 4 – Óleo de soja; 5 – Água.

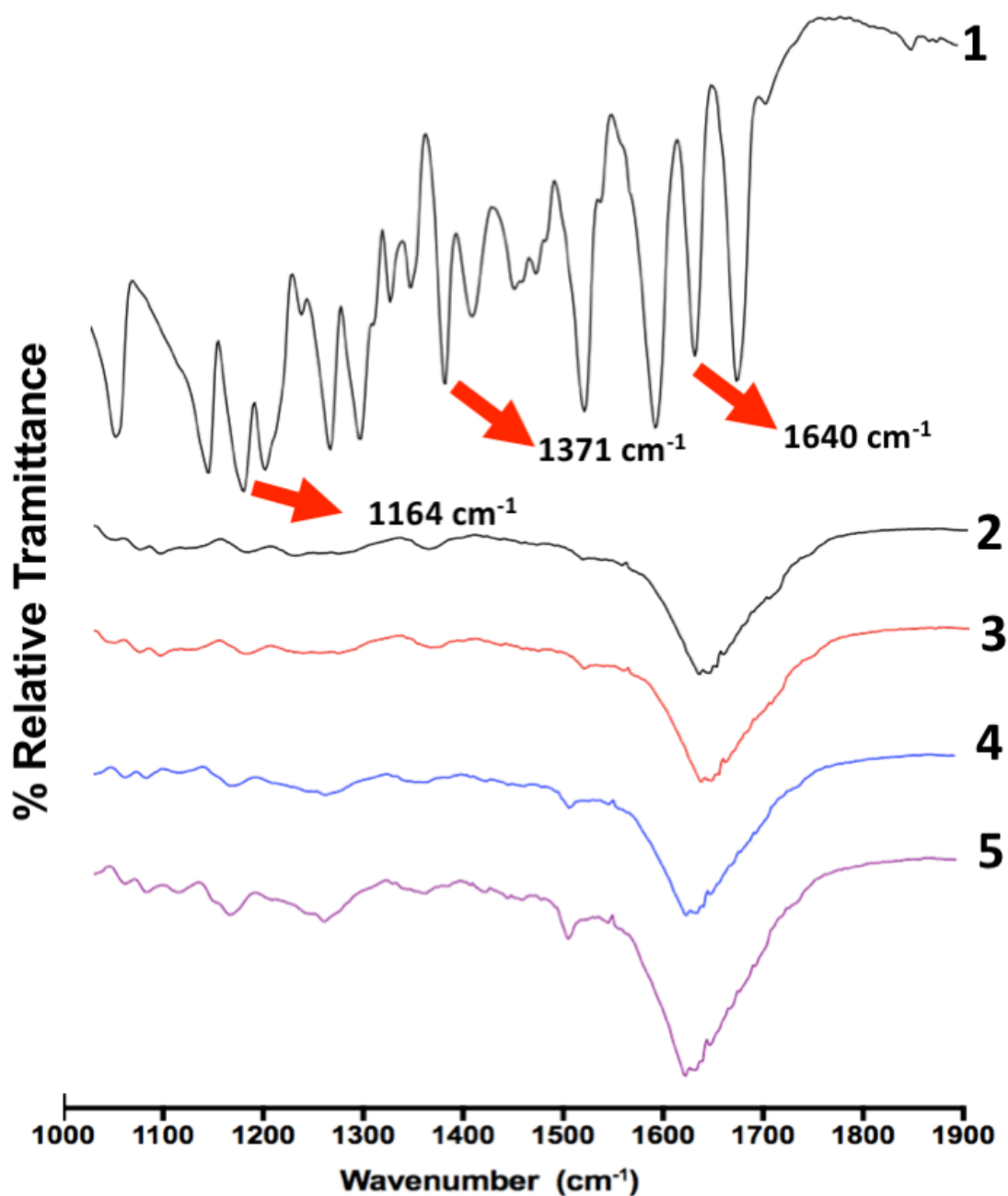


Figura 4 – Infravermelho com transformada de Fourier do ferulato de etila (1), nanoemulsão sem incorporação de droga (2) e as nanoemulsões com ferulato de etila incorporado a 1% (3), 2,5% (4) e 5% (5).

A banda de vibração FTIR observada no espectro das nanoemulsões em 1645 cm⁻¹ pode estar diretamente relacionada às características advindas do espectro da água, óleo de soja, span 80 e tween 80. Como pode ser observado na **Figura 4**, bandas do mesmo número de onda foram observadas nos espectros dos componentes isolados (**Figura 3**) e na nanoemulsão sem ferulato

de etila (**Figura 2**). No espectro de FTIR das nanoemulsões com ferulato de etila incorporado a 1%, 2% e 5%, os picos do ferulato de etila descritos desapareceram ou foram escondidos nos picos de do óleo de soja, tween 80, span 80 e água. Além disso, não foram observados novos picos ou desvios detectados neste espectro quando comparados com o espectro FTIR da nanoemulsão sem incorporação de ferulato de etila. Estes dados indicam que o ferulato de etila foi disperso molecularmente nas nanoemulsões investigadas, sem que haja interação química com os demais componentes da nanoemulsão (DORDEVIC et al, 2013).

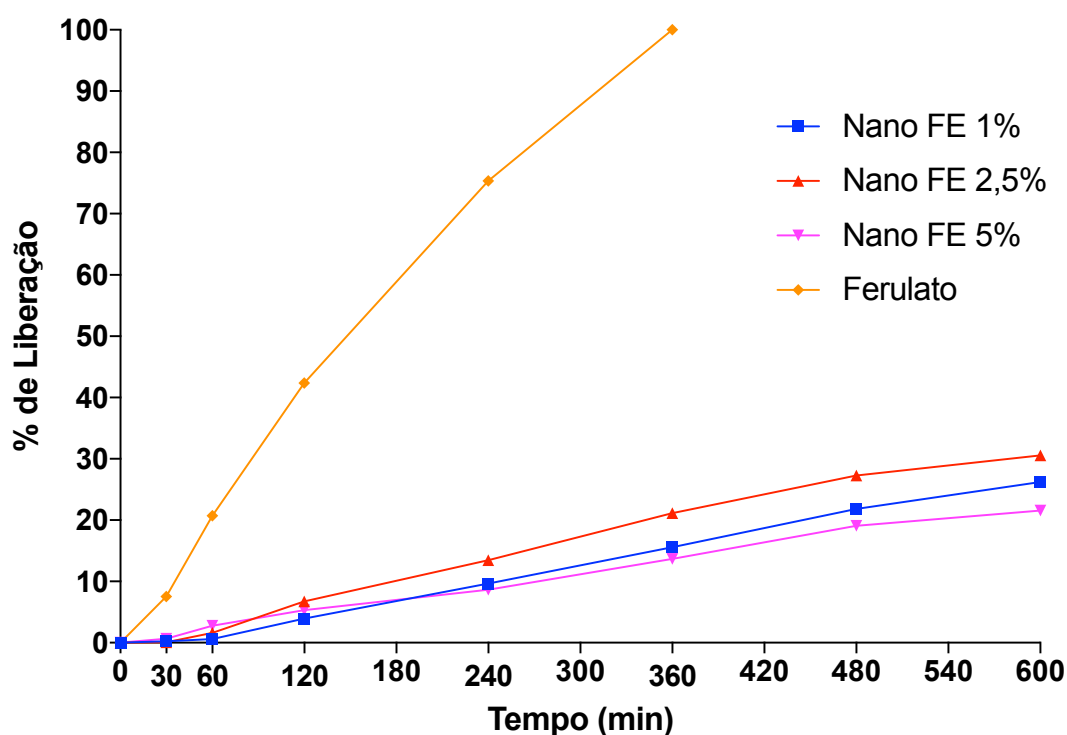
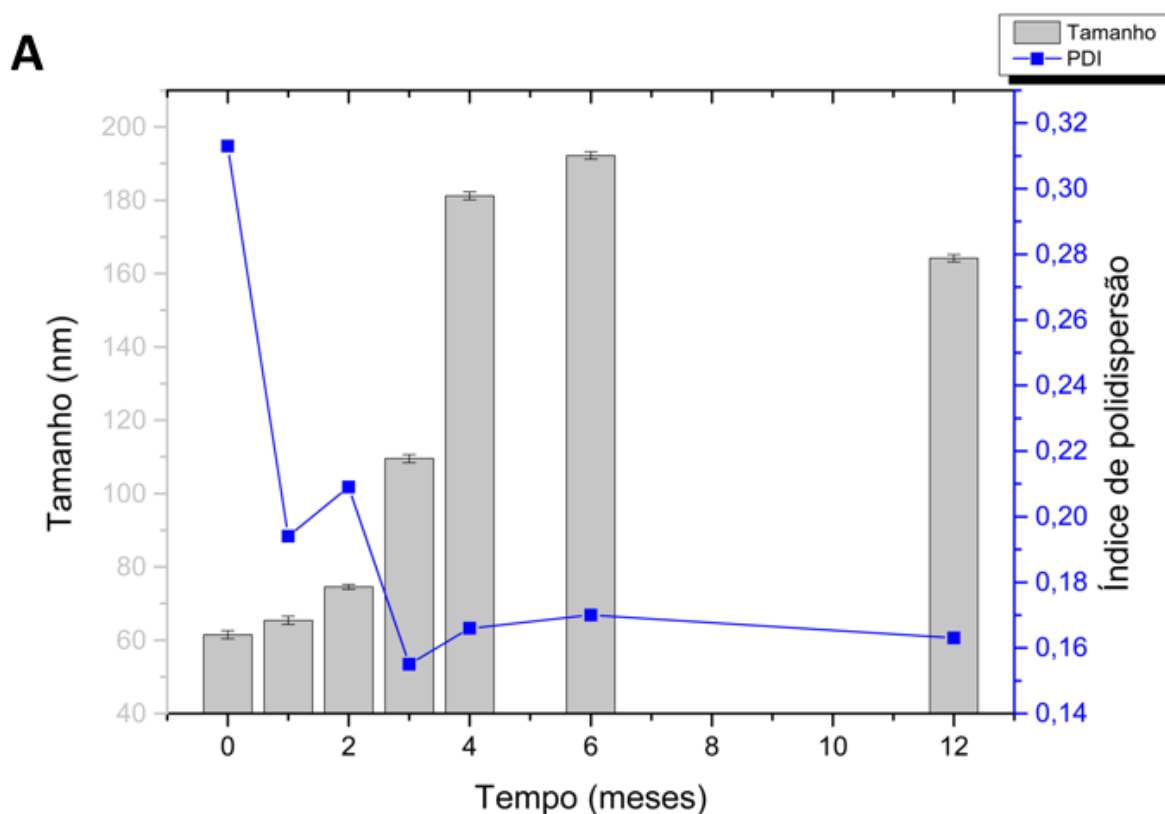


Figura 5 – Perfil de liberação *in vitro* de ferulato de etila, nanoemulsão contendo 1%, 2,5% e 5% de ferulato de etila.

Todos os sistemas nanoemulsionados com ferulato de etila apresentaram perfil de liberação controlado (**Figura 5**). Isso deve-se ao sucesso no processo de incorporação do ativo na nanoemulsão como demonstrados nos resultados anteriores (DOS SANTOS-SILVA et al, 2017). O perfil de liberação rápido apresentado pelo ferulato de etila era esperado uma vez que em estudos prévios foi demonstrada maior capacidade de penetração do ferulato de etila com taxa de absorção transdérmica de 22 a 51 vezes maior que o ácido ferúlico (ZHANG et al, 2010). Neste sentido, enquanto o ferulato de etila apresentou 100% de

liberação após seis de ensaio de permeação in vitro, os sistemas nanoemulsionados contendo 1%, 2.5% e 5% de ferulato de etila apresentaram respectivamente apenas 26%, 30% e 21% de liberação após as mesmas seis horas de ensaio.

Por fim, a estabilidade da nanoemulsão não incorporada com ferulato de etila e a nano emulsão com ferulato de etila 1% foram avaliadas por 12 meses em temperatura ambiente e ao abrigo da luz (Figura 6). A análise dos resultados nos permite observar que embora tenha havido aumento no tamanho das partículas dos dois sistemas (com e sem ferulato de etila) em nenhum momento avaliado as gotículas sobrepuseram a escala manométrica). Além disso, houve uma diminuição do índice de polidispersão indicando maior homogeneidade entre as populações de gotículas na nanoemulsão. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos para nanoemulsões contendo óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (GUNDEL et al, 2018).



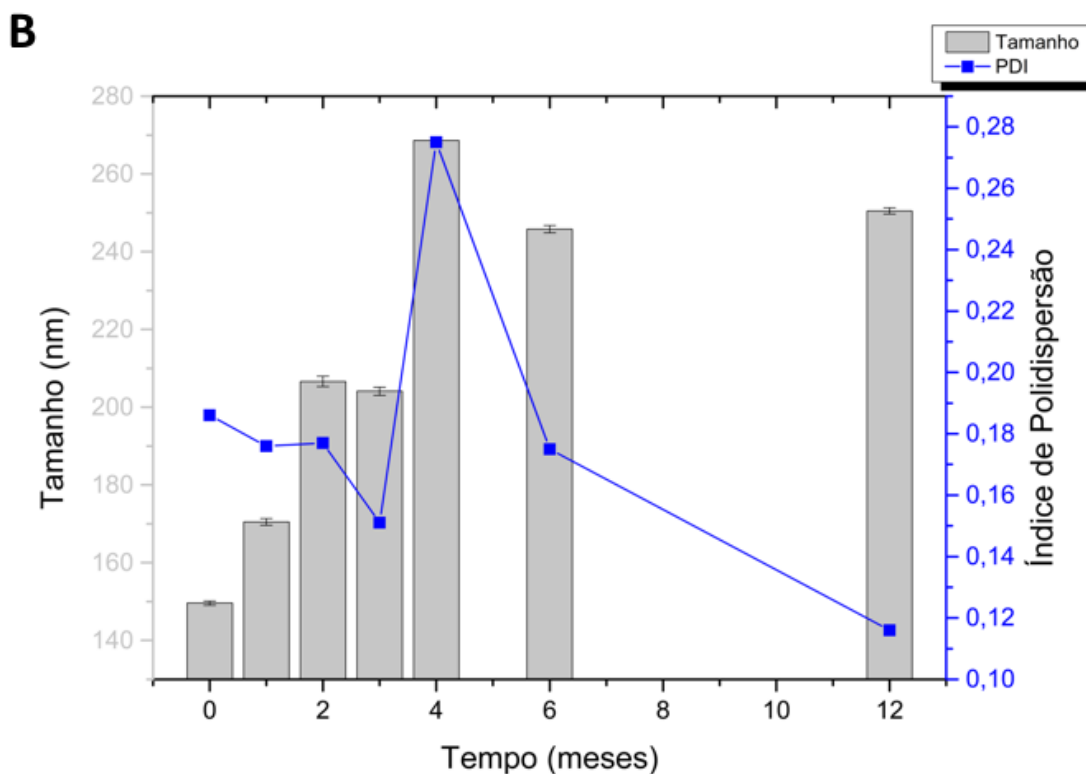


Figura 6 – Estabilidade de nanoemulsões A) sem incorporação do ferulato de etila e B) com incorporação do ferulato de etila avaliados quanto ao tamanho das gotas e índice de polidispersão (PDI).

A fim de verificar a eficácia da nanoemulsão incorporada com ferulato de etila sobre o processo inflamatório, realizou-se a avaliação da capacidade inibidora da formação de edema de pata em ratos cuja inflamação foi induzida por carragenina, um agente inflamogênico clássico (WINTER et al, 1962).

Dentre os modelos experimentais, a indução do edema de pata por carragenina tem sido o modelo de escolha para triagem de drogas com atividade anti-inflamatória desde sua descrição por Winter, Risley e Nuss (1969). A injeção de carragenina produz um edema inflamatório bifásico pela liberação de bradicinina, histamina e serotonina até a primeira hora após a indução (KIRCHHOFF et al, 1990) seguida da produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), infiltração neutrofílica, indução da COX-2 e estresse oxidativo da primeira a sexta hora após a indução (GARRELLY; BUREAU; LABREQUE, 1991; SALVEMINI et al, 1996; NANTEL et al, 1999).

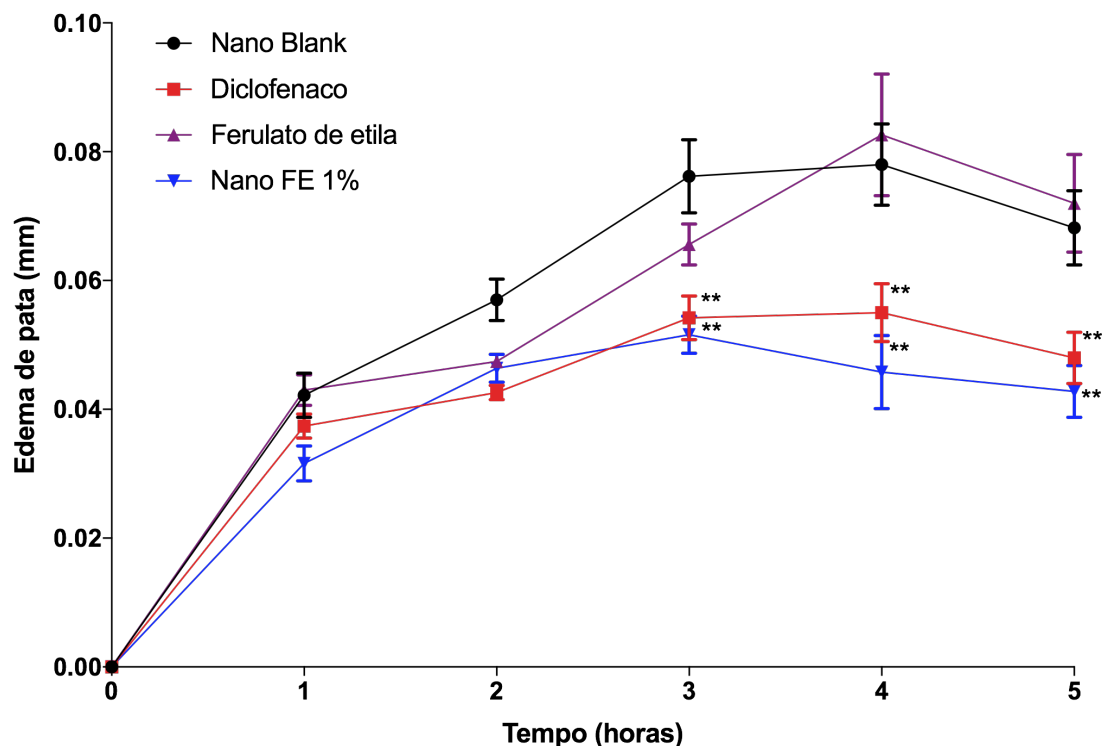


Figura 7 – Efeito de nanoemulsão incorporada com ferulato de etila sobre o edema de pata induzido por carragenina.

Os dados analisados para o edema de pata demonstraram haver inibição à formação do edema após a segunda hora nos grupos tratados com ferulato de etila, nanoemulsão contendo ferulato de etila e diclofenaco comparativamente ao grupo tratado com a nanoemulsão branca. Apenas o diclofenaco e a nanoemulsão contendo ferulato de etila foram capazes de inibir a formação do edema após 3, 4 e 5 horas comparativamente ao ferulato de etila e à nanoemulsão branca.

Resultados semelhantes foram encontrados para nanoemulsão contendo eugenol 1, 2 e 4% onde houve inibição significativa na formação de edema de pata elicitado por carragenina em ratos (ESMAEILI et al, 2015). EID et al (2014) avaliou o efeito de nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Swietenia macrophylla* em edema de pata induzido por carragenina e observou potencialização do efeito anti-inflamatório em detrimento a soluções contendo o óleo essencial. Os autores atribuem tal discrepância entre os resultados apresentados aos pequenos tamanhos de gotículas apresentados na

nanoemulsão o que propicia maior penetração através da pele do rato (EID et al, 2014).

Por fim, a fim de verificar a segurança para aplicação tópica de ferulato de etila e da nanoemulsão contendo ferulato de etila, foi realizado o teste de irritabilidade cutânea em orelha de ratos. Após cinco dias de observação não foram observados quaisquer sinais de irritação, eritema, edema ou prurido no local em nenhum dos grupos analisados (BABOOTA et al, 2007).

Conclusão

A suspensão nanoemulsionada óleo/água desenvolvida foi eficiente no aumento da solubilidade do ferulato de etila além de resultar em melhora do perfil de liberação avaliado por método *in vitro*, não apresentou sinais de irritação cutânea *in vivo* e foi eficiente na redução de edema no modelo testado. Além disso, as análises de IV-TF obtidas demonstraram a ausência de interação entre os constituintes da nanoemulsão obtida. A nanoemulsão obtida apresentou boa estabilidade uma vez que após um ano de sua produção ainda apresenta tamanho nanométrico.

Referências

AFONSO, V; CHAMPY, R; MITROVIC, D; COLIN, P; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, vol. 74, p. 324-329, 2007.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L. V. “**Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**”, 8º ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ANSEMI, C.; CENTINI, M.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; LA ROSA, C.; FACINO, R. M.; SEGA, A.; TSUNO, F.. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 35, p. 1241–1249, 2004.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharm.** Vol. 57, pp. 315–332, 2007.

BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; BENDER, E. A.; FREDDO, R. J.; BRUXEL, B.; HAAS, S. E. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 52, n. 3, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils--a review. **Food Chem Toxicol.** Vol. 46, pp. 446-475, 2008.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical pharmacology**, vol. 77, p. 1303-1315, 2009.

BAUEROVA, K; BEZEK, S. Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Etiopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Gen Physiol Biophys**, vol. 18, p. 15—20, 1999.

BOLLING, Bradley W.; JI, Li Li; LEE, Chen-Hsien; PARKIN, Kirk L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

BORHADE, V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: preformulation studies, formulation design and physi- cochemical evaluation, **Int. J. Pharm.** Vol. 431, 138–148, 2012.

CALABRESE, V.; CALAFATO, S.; PULEO, E.; CORNELIUS, C; SAPIENZA, M.; MORGANTI, P.; MANCUSO, C. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 358–363, 2008.

COKER, D. F.; REIMRES, J. R.; WATTS, R. O. The infrared absorption spectrum of water. **Aust. J. Phys.**, vol. 35, pp. 623-638, 1982.

CUZZOCREA, S; MAZZON, E.; Bevilaqua, C; COSTANTINO, G; BRITTI, D.; MAZZULLO, G; DE SARRO, A; CAPUTI, A. P. Cloricromene, a coumarine derivative, protects against collagen-induced arthritis in Lewis rats. **Br. J. Pharmacol.** Vol 131, p. 1399– 1407, 2000.

DA SILVA, S. G.; DE SOUZA, M. E.; QUATRIN, P. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; GÜNDEL, A.; OURIQUE, A. F. (2018). Nanoemulsions containing Cymbopogon flexuosus essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, vol. 118, pp. 268–276, 2018.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, vol 37, p. 201-204, 2000.

DEDON, Peter C.; TANNENBAUM, Steven R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 423, p. 12–22, 2004.

DENKO, C. W; WHITHOUSE, M. W. Experimental inflammation induced by naturally occurring microcrystalline calcium salts. **J Rheumatol.** Vol. 3, n. 1, p. 54-62, 1976.

DINARELLO, Charles A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, vol. 140, p. 935–950, 2010.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; FILIPIC, S.; AGBABA, D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity

and drug release characteristics of nonionic microemulsions. **Int. J. Pharm.** Vol. 433, pp. 25–33, 2012.

ĐORĐEVIĆ, S. M.; RADULOVIĆ, T. S.; CEKIĆ, N. D.; RANĐELOVIĆ, D.V.; SAVIĆ, M. M.; KRAJIŠNIK, D. R.; MILIĆ, J. R.; SAVIĆ, S. D. Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: physicochemical and pharmacokinetic performances. **J Pharm Sci.**, vol. 102, n. 11, pp. 4159-4172, 2013.

DOS SANTOS-SILVA, A. M., DE CALAND, L. B., DE S. L. OLIVEIRA, A. L. C., DE ARAÚJO-JÚNIOR, R. F., FERNANDES-PEDROSA, M. F., CORNÉLIO, A. M., & DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Designing structural features of novel benzimidazole-loaded cationic nanoparticles for inducing slow drug release and improvement of biological efficacy. **Materials Science and Engineering**, vol. 78, pp. 2017.

EID, A. M.; EL-ENSHASY, H. A.; NAGIB, R. A.; ELMARZUGI, A. Preparation, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of Swietenia macrophylla Nanoemulgel. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, vol. 7, n. 2, 2014.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 82, p. 70–77, 1959.

ESMAEILI, F.; RAJABNEJHAD, S.; PARTOAZAR, A. R.; MEHR, S. E.; FARIDI-MAJIDI, R.; SAHEBGHARANI, M.; SYEDMORADI, L.; RAJABNEJHAD, M. R.; AMANI, A. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**, vol. 21, n. 7, pp. 887-893, 2015.

ESSER, R. E; HILDEBRAND, A. R; ANGELO, R. A; WATTS, L. M; MURPHEY, M. D; BAUGH, L. Measurement of radiographic changes in adjuvant-induced

arthritis in rats by quantitative image analysis. **Arthritis Rheumvol.** 38, p.129–138, 1995.

FIALKOW, Lea; WANG, Yingchun; DOWNEY, Gregory P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 42, p. 153–164, 2007.

FORMAN, Henry Jay; TORRES, Martine. Redox signaling in macrophages. **Molecular aspects of Medicine**, vol. 22, p. 189-206, 2001.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; FRANZINI, C.M.; SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, vol. 63, pp. 287–295, 2008.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; EGITO, E.S.T.; TERRUGI, C.H.B.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; OLIVEIRA, A.G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, vol. 77, pp. 47–53, 2013.

FORMARIZ, T.P.; SARMENTO, V.H.V.; SILVA-JUNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V. & OLIVEIRA, A.G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids Surf. B.**, vol. 51, p 54-61, 2006.

GAO, F.; ZHANG, Z.; BU, H.; HUANG, Y.; GAO, Z.; SHEN, J.; ZHAO, C.; LI, Y. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: performance and mechanism, **J. Control. Release**, vol. 149, pp. 168–174, 2011.

GAUTAM, Raju; JACHAK, Sanjay M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, vol. 29, p. 767--820, 2009.

GERONIKAKI, Athina A.; GAVALAS, Antonios M. Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 9, p. 425-442, 2006.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Reviews. Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GOGATE, P.R.; KABADI, A.M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology, **Biochem. Eng. J.** vol. 44, pp. 60–72, 2009.

GOHEL, M.; SONI, T.; HINGORANI, L.; PATEL, A; PATEL, N. Development and Optimization of Plant Extract Loaded Nanoemulsion Mixtures for the Treatment of Inflammatory Disorder. **Cur. Res. Drug Discovery**, vol, 1, n. 2, pp. 29-38, 2014.

GOMES, R. P. **Atividade física no tratamento da artrite induzida por adjuvante de Freund: efeitos na nocicepção, edema e migração celular**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2008.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GRISHKO, V. I; HO, R; WILSON, G. L.; PEARSALL, A. W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 17, p. 107-113, 2009.

HENROTIN, Y; KURZ, B; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **OsteoArthritis and Cartilage**, vol. 13, p. 643-654, 2005.

HOSODA, A; OZAKI, Y; KASHIWADA, A; MUTOH, M; WAKABAYASHI, K; MIZUNO, K; N., E; Taniguchi, H. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 10, p. 1189–1196, 2002.

ISLAM, S; YOSHIDA, H; MATSUKI, N; ONO, K; NAGASAKA, R; USHIO, H; GUO, Y; HIRAMATSU, T; HOSOYA, T; MURATA, T; HORI, M; OZAKI, H. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- κ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **J Pharmacol Sci**, vol. 111, p. 328 – 337, 2009.

JANSSEN, J. W; HENSON, P. M. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. **Toxicologic Pathology**, vol. 40, p. 166-173, 2012.

JOSHI, G; PERLUIGI, M; SULTANA, R; AGRIPPINO R; CALABRESE, V D.; BUTTERFIELD, A. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe²⁺/H₂O₂: Insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, vol. 48, p. 318–327, 2006.

KEMELBEKOV, U. S. et al. Pharmacology and structures of the free base of the anaesthetic kazcaine and its complex with β -cyclodextrin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 68, p. 323–0, 2010.

KIKUZAKI, H; HISAMOTO, M; HIROSE, K; AKIYAMA, K; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem**. Vol. 50, p. 2161-2168, 2002.

KISLUKHIN, A. A.; XU, H.; ADAMS, S. R.; NARSINH, K.H.; TSIEN, R.Y.; AHRENS, E.T. Paramagnetic fluorinated nanoemulsions for sensitive cellular fluorine-19 magnetic resonance imaging, **Nat. Mater.** Vol.15, pp. 662–668, 2016.

KLEIN T., LONGHINI R., BRUSCHI M. L., MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurified extract of guaraná. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 23, n. 1, p: 186-193, 2013.

LAWRENCE, M.J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.**, vol. 45, p 89-121, 2000.

LAWRENCE, T; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int. J. Exp. Path.** vol. 88, p. 85–94, 2007.

LEE, H.P.; HUANG, S.Y.; LIN, Y. Y; WANG, H. M.; JEAN, Y. H.; WU, S. H.; DUH, C. Y.; WEN, Z. H. Soft coral-derived lemnalol alleviates monosodium urate-induced gouty arthritis in rats by inhibiting leukocyte infiltration and inos, cox-2 and c-fos protein expression. **Marine Drugs**, vol. 11, p. 99-113, 2013.

LEE, I-Ta; YANG, Chuen-Mao. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. **Biochemical Pharmacology**, vol. 84, p. 581–590, 2012.

LEONG, T.S.; WOOSTER, T.J.; KENTISH, S.E. ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification, **Ultrason. Sonochem.** Vol. 16, pp. 721–727, 2009.

LEVY, A. S. A; SIMON, O; SHELLY, J; GARDENER, M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. **BMC Pharmacology**, vol.6, n. 12, 2006.

LIMA, R.A.F. et al. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. **J Drug Target**, v. 20, p. 85–96, 2012.

MAHESH, G.; RAMKANTH, S; SALEEN, M. Anti-inflammatory drugs from medicinal plants: a comprehensive review. **International Journal of Review in Life Sciences**, vol. 01, p.01-10, 2010.

MOLLACE, V. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacological Reviews**, vol. 57, p. 217–252, 2005.

MONTEIRO, L.M.; LIONE, V.F.; DO CARMO, F.A.; DO AMARAL, L.H.; DA SILVA, J.H.; NASCIUTTI, L.E.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C.; DE SOUSA, V.P.; CABRAL, L.M. Development and characterization of a new oral dapsone nanoemulsion system: permeability and in silico bio-availability studies, **Int. J. Nanomedicine**, vol. 7, pp. 5175–5182, 2012.

MOSHAGE, H; KOK, B; HUIZENGA, J. R; JANSEN, P. L. Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: A Critical Evaluation. **Clin. Chem.** Vol. 41, p. 892-896, 1995.

MOTAWEA, A.; BORG, T.; TARSHOBY, M.; EL-GAWAD, A. B. D. Nanoemulsifying drug delivery system to improve the bioavailability of piroxicam, **Pharm. Dev. Technol.** Vol. 1-12, 2016.

NAGASAKA, Reiko; CHOTIMARKORN, Chatchawan; SHAFIQUL, Islamb; HORI, Masatoshi; OZAKI, Hiroshi; USHIO, Hideki. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 358, p. 615–619, 2007.

NATHAN, C; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, vol. 140, n. 3, p. 871–882, 2010.

NENADIS, Nikolaos; ZHANG, Hong-Yu; TSIMIDOU, Maria Z. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 51, p. 1874-1879, 2003.

NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S; ADWANIKAR, H; FU, Y; JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain**, vol. 3, n. 8, 2007.

NEWTON, Kim; DIXIT, Vishva M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, vol. 4, p. 01-19, 2012.

OCA-AVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, vol. 16, pp. 1-6, 2017.

OHKAWA h, OHISHI N, YAGI K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, vol. 95, p. 351-358, 1979.

PERLUIGI, Marzia; JOSHI, Gururaj; SULTANA, Rukhsana; CALABRESE, Vittorio; DE MARCO, Carlo; COCCIA, Raffaella; CINI, Chiara; BUTTERFIELD, Allan. In Vivo Protective Effects of Ferulic Acid Ethyl Ester Against Amyloid- β Peptide 1–42-induced Oxidative Stress. **Journal of Neuroscience Research**, vol. 84, p. 418–426, 2006.

RAGELLE, H.; CRAUSTE-MANCIET, S.; SEGUIN, J.; BROSSARD, D. SCHERMAN, D.; ARNAUD, P.; CHABOT, G.G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice, **Int. J. Pharm.** Vol. 427, pp. 452–459, 2012.

RASOOL, M; VARALAKSHMI, P. Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on MSU crystal-induced inflammation-an in vivo and in vitro study. **Chem.-Biol. Interact.** Vol. 164, n. 3, p. 174–180, 2006.

ROBERGE, C. J; DE MEDICIS, R; DAYER, J. M; ROLA-PLESZCZYNSKI, M; NACCACHE, P. H; POUBELLE, P. E. Crystal induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. **J. Immunol.** vol.152, p. 5485–5494, 1994.

ROBERTS, R. A.; SMITH, R. A.; SAFE, S.; SZABO, C; TJALKENS, R. B.; ROBERTSON, F. M. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, vol. 276, n. 85–94, 2010.

ROMITELLI, F; SANTINI, A. S; CHIERICA, E; PITOCCO, D et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B**, vol. 851, p. 257-267, 2007.

SALINAS, M. Comparison of manual and automated cell counts in EDTA preserved synovial fluid. Storage has little influence on the results. **Ann Rheum Dis**, vol. 56, p. 622-626, 1997.

SALVEMINI, D; LITTLE, J W.; DOYLE, T; NEUMANN, W. L. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 51, p. 951–966, 2011.

SCAPAGNINI, G; BUTTERFIELD, A; COLOMBRITA, C; SULTANA, R; PASCALE, A; CALABRESE, V. Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, Vol. 6, n. 5, p, 811-818, 2004.

SERHAN, C. N; BRAIN, S. D; BUCKLEY, C. D; GILROY, C. H; O'NEILL, M. P et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FAESB Journal**. vol. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SILVA, J. A.; LIMA DAMASCENO, B. P. G.; BORBA, V. F. C.; EGITO, E. S. T.; SANTANA, D. P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Rev. Bras. Farm.**, vol. 90, n. 3, pp. 245-249, 2009.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASUA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and application in drug delivery. **J. Control. Relea.**, vol. 252, pp. 28-49, 2017.

SINNHUBER, R. O; YO, T. C. 2-Thiobarbituric acid method for measurement of rancidity in fishery products. Quantitative determination of malondyaldehyde. **Food Technol**, vol. 12, n. 9, 1958.

SON, S; LEWIS, B. A.. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 50, p. 468-472, 2002.

STRECK, L.; SARMENTO, V. H.; MACHADO, P. R.; FARIAS, K. J.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Phase Transitions of Isotropic to Anisotropic Biocompatible Lipid-Based Drug Delivery Systems Overcoming Insoluble Benznidazole Loading. **Int J Mol Sci.** vol. 17, n. 7, 2016.

SULTANA, R; RAVAGNA, A; MOHMMAD-ABDUL, H; CALABRESE, V; BUTTERFIELD, D. A. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, vol. 92, p. 749–758, 2005.

SULTANA, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1822, p. 748–752, 2012.

TABAS, I; GLASS, C. K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. **Science**, vol. 339, n. 1, p. 166-172, 2013.

TAKAHARA, S; HAMILTON, B. H; NELL, J. V; OGURA, Y; NISHIMURA, E. T. Hypocatalasemia, a new genetic carrier states. **J Clin Invest**, vol. 29, p. 610–619, 1960.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: na objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, vol. 48, p. 421-427, 1992.

VERMA, P.; MEHER, J.G.; ASTHANA, S.; PAWAR, V.K.; CHAURASIA, M.; CHOURASIA, M.K. Perspectives of nanoemulsion assisted oral delivery of docetaxel for improved chemother- apy of cancer, **Drug deliv**. Vol. 23, pp. 479–488, 2016.

WINTER, C.A, RISLEY, E.A, NUSS, G.W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**. v.111, p.544-7, 1962.

WOODRUFF, T. M; STRACHAN, A. J; DRYBURGH, N.; SHIELS, I. A; REID, R. C; FAIRLIE, D. P; TAYLOR, S. M. Antiarthritic activity of an orally active c5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. **Arthritis & rheumatism**, vol. 46, n. 9, p. 2476–2485, 2002.

YU, Y; XIONG, Z; LV, Y; QIAN, Y; JIANG, S; TIAN, Y. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. **Skeletal Radiol**, vol. 35, p. 156–164, 2006.

YUAN, G; WAHLQVIST, M. L; HE, G; YANG, M; LI, D. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pac J Clin Nutr**, vol. 15, p. 143-152, 2006.



ZHANGA, L-W; AL-SUWAYEHB, S A.; HSIEHC, P-W; FANGA, J-Y. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 399, p. 44-51, 2010.

4. PERSPECTIVAS

- Realizar análise de travigravimetria (TG), ressonância nuclear magnética (RNM) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) nos sistemas binários obtidos com ferulato de etila e B-ciclodextrina.
- Desenvolver e caracterizar comprimidos contendo complexo de inclusão de ferulato de etila e B-ciclodextrina.
- Desenvolver e caracterizar emulgel contendo nanoemulsão 1% de ferulato de etila.
- Testar em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina e monoartrite induzida por Adjuvante Completo de Freund o complexo obtido BCD-FE e a nanoemulsão com ferulato 1%.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Comprovante de aprovação do Comitê de ética em Experimentação animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapl@ufpi.edu.br

Teresina, 24 de Novembro de 2014.

Ilma.

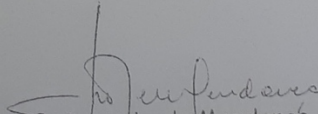
Profa. Dra. FERNANDA REGINA DE CASTRO ALMEIDA.
Departamento: Núcleo de Pesquisa em plantas Medicinais- CCS/UFPI

Senhora Pesquisadora,

Em reunião na presente data (24 de Novembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **082/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos e frações de plantas medicinais do Nordeste do Brasil e substâncias bioativas em modelos agudos e crônicos**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Novembro/2014 à Junho/2020, e serão usados 1552 Camundongos heterogênicos *swiss* (1480 machos e 72 fêmeas) e 1175 Ratos heterogênicos *wistar* (1090 machos e 85 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,



Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Anexo 1 – Publicação do capítulo 1

EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS
<https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1568410>



REVIEW



Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions

Francisco Valmor Macedo Cunha^a, Angélica Gomes Coelho^a, Pedro Simão da Silva Azevedo^a, Arnóbio Antônio da Silva Júnior^b, Francisco de Assis Oliveira^a and Lívio César Nunes^c

^aMedicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil; ^bLaboratory of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brazil; ^cFederal University of Piauí, Teresina, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Ethyl ferulate is a phenylpropanoid with anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective activities of natural and synthetic origin with potential uses in the nutraceutical and pharmaceutical industry. Therefore, the aim of this study was to investigate the current scenario regarding patents and scientific articles available involving the substance in question, regarding aspects such as quantity, areas of knowledge and depositor countries.

Areas covered: To do so, we conducted technological and scientific prospecting on the WIPO, EPO, USPTO and INPI and scientific databases in PubMed, Web of Science and Lilacs databases using the keywords 'ferulic acid ethyl ester' and 'ethyl ferulate' in English and Portuguese. A total of 16 articles and 17 patents of which 10 were Chinese and 11 claimed the use of ethyl ferulate or for the synthesis of other substances or synthetic methods of the same. Five of the patents selected claimed therapeutic applications related to the treatment of mycobacterial infections, use as a cosmetic and neuroprotective activity. The systematic review of the literature revealed antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, antimutagenic, antiapoptotic, antimutagenic and antiproliferative activities.

Expert opinion: The technological and scientific prospection highlighted ethyl ferulate, despite its known pharmacological activities, is little explored by the pharmaceutical and nutraceutical industries.

ARTICLE HISTORY

Received 14 December 2018
 Accepted 8 January 2019

KEYWORDS

Ethyl ferulate;
 biotechnology; natural product; antioxidant; anti-inflammatory activity

1. Introduction

The search for effective and devoid substances, at least in part, for adverse effects is continuous. Due to botanical diversity and the successful ethnopharmacological use of many of these plant species, the search for naturally occurring substances has been relatively successful [1]. The action through several effector ways and signaling to combat pathologies may be the main factor for the effectiveness of natural products [2].

Phenylpropanoids and their derivatives are among the most common active constituents of foods, aromas, fragrances, wines, essential oils, beers and various segments of traditional Chinese medicine [3,4]. In view of the numerous protective functions of phenylpropanoids in plants, these substances are of great interest especially for the development of medicinal products with antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antiviral, wound healing, antibiotic and sun protection (it protects against ultraviolet B) [4,5].

Ethyl ferulate (ethyl-3-hydroxy-4-methoxycinnamate) is a phenylpropanoid derived from ferulic acid widely present in plants and especially grains such as rice and maize (Figure 1) [6]. Despite the few antioxidant substituents on the aromatic ring and the alkyl side chain, it has good permeability in the biological membranes, thus justifying its better antioxidant profile in relation to ferulic acid [7].

Due to the presence of the ester function in ethyl ferulate, it has higher lipophilicity than its ferulic acid, giving it greater permeability in biological barriers [8]. The steric derivatives of ferulic acid exert a buffering activity of free radicals and preventive in the formation of the same, mainly through the increase in the expression of antioxidant proteins like glutathione. The mechanisms involved in such response relate to the activation of the Nrf-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) pathway and inhibition of NF-κB (Nuclear Factor κB) [8]. Other important effects related to anti-inflammatory activity include inhibition of NF-κB, COX-2 (Cyclooxygenase type 2) and iNOS (Inducible nitric oxide synthase) [9], induction of quinone reductase [10], increased expression of HO-1 (hemeoxygenase enzyme) and HSP-70 protein [11]. These actions favor to the ferulate several actions such as: anti-inflammatory [9,12–15], neuroprotective [16–20], antioxidant [9–15,17–19,21], antiapoptotic [12,22], antiarthritic and chondroprotective [15], sun protector [23] e antiproliferative [24].

In view of the above, the aim of this research was to perform a systematic review on the proven activities of ethyl ferulate and technological prospection on its applications. The article was divided into two main sections comprising systematic review and technological prospecting.

CONTACT Lívio César Nunes lvivocesar@hotmail.com Nunes - Postgraduate Program in Biotechnology - RENORBIO, Focal Point - Federal University of Piauí, Av. Nossa Senhora de Fátima s/n, Teresina, PI 64049-550, Brazil

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Anexo 2 – Submissão do Capítulo 2

Food and Chemical Toxicology

Caixa de Entrada - Google 00:40



Submission Confirmation

Para: francisco valmor, Valmor Macedo,

Responder A: Food and Chemical Toxicology

*** Automated email sent by the system ***

Full Length Article

Dear Valmor Macedo,

Your submission entitled "Ethyl ferulate/ β -Cyclodextrin inclusion complex inhibits oedema formation" has been received by Food and Chemical Toxicology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/fct/>.

Your username is: orfeuyeuridice@yahoo.com.br

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Food and Chemical Toxicology