

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FLÁVIA DE BRITO PEDROSO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *EX VIVO* EM
ERITRÓCITOS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO FERULATO
DE HEXADECILA**

PONTA GROSSA

2016

FLÁVIA DE BRITO PEDROSO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *EX VIVO* EM
ERITRÓCITOS DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO FERULATO
DE HEXADECILA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA

2016

- P372 Pedroso, Flávia de Brito
Desenvolvimento, caracterização e avaliação ex vivo em eritrócitos de nanocápsulas poliméricas contendo ferulato de hexadecila / Flávia de Brito Pedroso. Ponta Grossa, 2016.
80 f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-Oeste.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi
1. Ácido ferúlico. 2. Ferulato de hexadecila. 3. poli(ε-caprolactona). 4. nanocápsulas poliméricas. 5. Barreira hematoencefálica I. Farago, Paulo Vitor. II. Miyoshi, Edmar. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV.T

CDD : 615

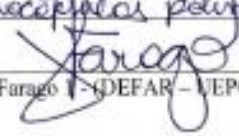
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 11/2016, DA MESTRANDA FLÁVIA DE
BRITO PEDROSO REALIZADA NO DIA 02 DE SETEMBRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

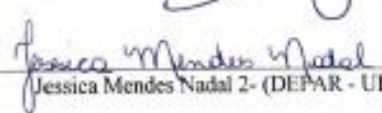
Aos dois dias de setembro de dois mil e dezesseis, às 09hs00min, na Sala M93C, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Paulo Vitor Farago reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Flávia de Brito Pedroso na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professora Doutora Jessica Mendes Nadal e a Professora doutora Daniela Maluf. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: Desenvolvimento e Estudo do Efeito de Nanocápsulas Poliméricas Contendo Ferulato de Hexadecila. Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se aprovando a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo em células de nanocápsulas poliméricas contendo ferulato de hexadecila


Paulo Vitor Farago 1- (DEFAR - UEPG)- Presidente


Jessica Mendes Nadal 2- (DEFAR - UEPG) - Titular


Daniela Maluf 3- (UFPR - CURITIBA) - Titular

Ponta Grossa, 02 de Setembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família
Pelo amor incondicional
Pela força e incentivo
Pela paciência e compreensão

Em especial
À minha avó Vilma, seu cuidado e
dedicação foram fundamentais
À minha mãe, meu suporte sempre
Ao meu amado marido
Ao meu filho, gerado e concebido
durante a realização deste mestrado

Razões da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pelos ensinamentos e principalmente pela confiança depositada em mim desde o início da realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edmar Miyoshi, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, pela paciência e disponibilidade.

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa, por terem gentilmente aceitado o convite em participar deste momento tão importante e pelas contribuições prestadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelas experiências e contribuições ao longo desta trajetória, mas especialmente pela convivência e todos os momentos que estivemos juntos.

Aos colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia, especialmente à Jéssica e ao José, pela amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica, Amanda, Lais, Maryana e Murilo, pelo comprometimento.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios, que sempre me atenderam com muito respeito.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

À todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste estudo.

Aos meus familiares e à minha sogra, pelo apoio e carinho e pelo auxílio nos momentos em que mais precisei. Obrigada... muito obrigada!

RESUMO

Vários tratamentos para desordens neurológicas são malsucedidos por não poderem atingir efetivamente o Sistema Nervoso Central (SNC). A presença da barreira hematoencefálica (BHE) dificulta esse acesso e muitas substâncias são incapazes de atravessá-la quando empregadas sem qualquer modificação química ou físico-química. O ácido ferúlico, um polifenol encontrado abundantemente na natureza e bem reconhecido por sua atividade antioxidante, antiinflamatória e anticâncer, é amplamente estudado e sua atividade neuroprotetora vem sendo descrita. Um dos principais problemas, que limita sua utilização clínica, é sua baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral, que pode ser contornado por alterações e/ou modificações em sua estrutura química e/ou pelo preparo de formulações à base de lipídeos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar um derivado lipossolúvel do AF, o ferulato de hexadecila (FH), e posteriormente obter nanocápsulas poliméricas como sistema de vetorização para sua potencial ação no SNC. O FH foi obtido por esterificação e sua caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e de ressonância magnética nuclear. A modificação estrutural não anulou a atividade *scavenger* frente aos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e ao HOCl. As nanocápsulas poliméricas, em concentração de 0 a 2,0 mg.mL⁻¹, foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial do polímero, utilizando poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e blendas com polietilenoglicol (PEG). Todas as formulações preparadas apresentaram partículas esféricas e de superfície lisa, como observado por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV), pH entre 5,75 e 6,04, tamanhos adequados, inferiores a 234 nm, índice de polidispersão inferior a 0,26, garantindo sua homogeneidade, e potencial zeta com valores negativos, entre -28 e -38 mV, sugerindo estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas. O processo de nanoencapsulação promoveu a amorfização do FH, comprovada por análise de difração de raios X, calorimetria exploratória diferencial (CED) e MEV, bem como o aumento de sua estabilidade térmica, verificado por termogravimetria e CED, e as análises efetuadas de IVTF demonstraram que não houve interação entre o FH e os polímeros utilizados. Os estudos de toxicidade em eritrócitos demonstraram que o FH, livre ou nas formulações de nanocápsulas com PCL-PEG, não apresentou ação hemolítica, mesmo com variações na dose testada e em função do tempo. Adicionalmente, apresentou ação protetora sobre a hemólise promovida pelo AAPH. A possível ação das formulações desenvolvidas sobre o SNC, considerando que possuem características adequadas para sua vetorização, deve ser investigada futuramente.

Palavras-chave: ácido ferúlico, ferulato de hexadecila, poli(ϵ -caprolactona), nanocápsulas poliméricas, barreira hematoencefálica, antioxidante, hemólise

ABSTRACT

Many neurological disorder treatments are unsuccessful because they can not effectively reach the central nervous system (CNS). The presence of the blood-brain barrier (BBB) hinders this access and a lot of substances are unable to pass through it when used without any chemical or physical-chemical modification. The ferulic acid, a polyphenol found abundantly in nature and well known for its antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activity, is widely studied and their neuroprotective activity has been described. One of the main problem, which limits its clinical use, is its low bioavailability when administered orally, it can be circumvented by changes in their structure and/or for preparing lipid-based formulations. In this way, the aim of this study was to synthesize a lipophilic derivative of AF, the hexadecyl ferulate (HF), and then get polymeric nanocapsules as vectoring system for its potential action in the CNS. The HF was obtained by esterification reaction and their structural characterization was performed by spectroscopy in the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance. The structural modification did not annul the scavenger activity against the DPPH[•], ABTS^{•+} and HOCl. The polymeric nanocapsules in concentration from 0 to 2.0 mg.mL⁻¹ were developed by interfacial deposition method of the polymer using poly (ϵ -caprolactone) (PCL), and blends with polyethylene glycol (PEG). All prepared formulations presented spherical and smooth surface, as observed by scanning electron microscopy (SEM) with field emission, pH between 5.75 and 6.04, proper sizes below 234 nm, polydispersity index below 0.26, ensuring homogeneity, and zeta potential with negative values between -28 and -38 mV, suggesting stability of the suspensions of polymeric nanocapsules. The nanoencapsulation process promoted the FH amorphization. This was verified by X-ray diffraction analysis, differential scanning calorimetry (DSC) and SEM. It also promoted the increasing thermal stability of the FH which was verified by thermogravimetry and DSC, and FTIR analysis demonstrated there was no interaction between HF and the used polymers. Toxicity studies in erythrocytes showed that HF, in free or nanocapsule formulations of PCL- PEG, showed no hemolytic action, even with variations in dose tested and function of time. Additionally, introduced protective effect on hemolysis promoted by AAPH. The possible action of the developed formulations of CNS, considering that they have appropriate characteristics for your vectorization, should be investigated in the future.

Keywords: hexadecyl ferulate, ferulic acid, poly(ϵ -caprolactone), polymeric nanocapsules, blood brain barrier, antioxidant, hemolysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: POTENCIAIS ROTAS PARA INFILTRAÇÃO E TRANSPORTE ATRAVÉS DA BHE	17
FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FERÚLICO	19
FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DO FERULATO DE HEXADECILA	21
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS POLIMÉRICAS	22
FIGURA 5: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA	29
FIGURA 6: ETAPAS DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	30
FIGURA 7: ESPECTRO IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA	41
FIGURA 8: ESPECTROS IVTF DO ÁCIDO FERULICO, ÁLCOOL CETÍLICO E FERULATO DE HEXADECILA	42
FIGURA 9: ESPECTRO RMN ^1H DO FERULATO DE HEXADECILA	45
FIGURA 10: ESPECTRO RMN ^{13}C DO FERULATO DE HEXADECILA	45
FIGURA 11: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O RADICAL DPPH $^{\bullet}$	46
FIGURA 12: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O RADICAL ABTS $^{+\bullet}$	47
FIGURA 13: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O HOCl	48
FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA NA REGIÃO DO UV-VIS.....	50
FIGURA 15: CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA	51
FIGURA 16: ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA, SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE PCL E DE BLENDS PCL-PEG.....	52
FIGURA 17: ELETROMICROGRAFIAS MEV DAS NANOCÁPSULAS PCL	56
FIGURA 18: ELETROMICROGRAFIAS MEV DAS NANOCÁPSULAS PCL-PEG	56
FIGURA 19: DIFRATOGRAMA DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM PCL.....	58
FIGURA 20: DIFRATOGRAMA DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM BLENDS PCL-PEG	58

FIGURA 21: ESPECTRO DE IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS NANOCÁPSULAS DE PCL	59
FIGURA 22: ESPECTRO DE IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS NANOCÁPSULAS DE BLENDA PCL-PEG	60
FIGURA 23: TERMOGRAMA DE CED DO ÁCIDO FERÚLICO, ÁLCOOL CETÍLICO E FERULATO DE HEXADECILA	61
FIGURA 24: TERMOGRAMA DE CED DAS NANOCÁPSULAS DE PCL	62
FIGURA 25: TERMOGRAMA DE CED DAS NANOCÁPSULAS DE BLENDA PCL-PEG	62
FIGURA 26: TERMOGRAMA DE CED DOS POLÍMEROS PCL E PEG.....	63
FIGURA 27: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DO ÁCIDO FERÚLICO, ÁCIDO FERÚLICO E FERULATO DE HEXADECILA	64
FIGURA 28: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DAS NANOCÁPSULAS COM PCL ...	64
FIGURA 29: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DAS NANOCÁPSULAS COM BLENDA PCL-PEG	65
FIGURA 30: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DOS POLÍMEROS PCL E PEG	65
FIGURA 31: VALORES DE PH DAS FORMULAÇÕES DE PCL (A) E PCL-PEG (B)	66
FIGURA 32: TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA DAS FORMULAÇÕES DE PCL (A) E PCL-PEG (B).....	67
FIGURA 33: AÇÃO HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS DE PCL-PEG CONTENDO FERULATO DE HEXADECILA.....	68
FIGURA 34: AÇÃO HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERULATO DE HEXADECILA	69
FIGURA 35: AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERULATO DE HEXADECILA SOBRE A HEMÓLISE PROMOVIDA PELO AAPH	69
FIGURA 36: AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS PCL-PEG DE FERULATO DE HEXADECILA SOBRE A HEMÓLISE PROMOVIDA PELO AAPH	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	34
TABELA 2: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO FERULATO DE HEXADECILA	44
TABELA 3: DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	53
TABELA 4: TEOR DE FERULATO DE HEXADECILA ENCAPSULADO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	54
TABELA 5: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)dihydrochloride
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AC	Álcool cetílico
AF	Ácido ferúlico
BHE	Barreira hematoencefálica
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CED	Calorimetria exploratória diferencial
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX	Difração de raios X
FH	Ferulato de hexadecila
HOCl	Ácido hipocloroso
IPD	Índice de polidispersão
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
KBr	Brometo de potássio
NC	Suspensão de nanocápsulas
NC-PCL(0)	Suspensões de nanocápsulas de PCL sem ferulato de hexadecila
NC-PCL(1 e 2)	Suspensões de nanocápsulas de PCL com ferulato de hexadecila nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹)
NC-PCL-PEG(0)	Suspensões de nanocápsulas de PCL-PEG sem ferulato de hexadecila
NC-PCL-PEG(1 e 2)	Suspensões de nanocápsulas de PCL-PEG com ferulato de hexadecila nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.mL ⁻¹
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PEG	polietilenoglicol
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema nervoso central
Span [®] 80	Monooleato de sorbitano
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
TCC	Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico
TG	Termogravimetria
Twen [®] 80	Polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 PASSAGEM DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BHE	17
3.2 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS	19
3.2.1 Ácido ferúlico	19
3.2.2 Ferulato de hexadecila	20
3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	21
3.3.1 Formas farmacêuticas de liberação modificada contendo ácido ferúlico e seus ésteres	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 EQUIPAMENTOS	26
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	27
4.2.1 Fármaco	27
4.2.2 Polímeros	27
4.2.3 Água Purificada	27
4.2.4 Solventes e Demais Reagentes	27
4.2.5 Outros Materiais	28
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	29
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
4.4.1 Síntese do Ferulato de Hexadecila	30
4.4.1.1 Purificação do ferulato de hexadecila	31
4.4.1.2 Caracterização do ferulato de hexadecila	31
4.4.1.3 Perfil da ação sobre radicais livres e espécies reativas de oxigênio	31
4.4.1.3.1 Ação <i>scavenger</i> sobre o DPPH [•]	32
4.4.1.3.2 Ação <i>scavenger</i> sobre o ABTS ^{•+}	32
4.4.1.3.3 Ação <i>scavenger</i> sobre o HOCl	33
4.4.2 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas	33
4.4.2.1 Obtenção das misturas físicas	34
4.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por UV-VIS	34

4.4.3.1 Preparo das soluções padrão	35
4.4.3.2 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de FH	35
4.4.4 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por UV-VIS	36
4.4.5 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas	37
4.4.5.1 Determinação de pH	37
4.4.5.2 Análises morfológicas e de superfície	37
4.4.5.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial Zeta	37
4.4.5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV)	37
4.4.5.2.3 Análise por difração de raios X (DRX)	37
4.4.6 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada em Fourier (IVTF)	38
4.4.7 Análise térmica	38
4.4.7.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	38
4.4.7.2 Termogravimetria (TG)	38
4.4.8 Avaliação da estabilidade	38
4.4.9 Toxicidade e ação sobre o estresse oxidativo em eritrócitos humanos	39
4.4.9.1 Toxicidade sobre eritrócitos	39
4.4.9.2 Ação sobre o dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 SÍNTESE DO FERULATO DE HEXADECILA	40
5.1.1 Purificação do ferulato de hexadecila	40
5.1.2 Rendimento do ferulato de hexadecila	40
5.1.3 Caracterização do FH	40
5.1.3.1 Avaliação por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada em Fourier (IVTF)	41
5.1.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
5.1.4 Perfil da ação sobre radicais livres e espécies reativas de oxigênio	46
5.1.4.1 Ação <i>scavenger</i> sobre o DPPH [•]	46
5.1.4.2 Ação <i>scavenger</i> sobre o ABTS ^{•+}	47
5.1.4.3 Ação <i>scavenger</i> sobre o HOCl	48
5.2 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	49
5.2.1 Avaliação macroscópica	49
5.2.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de FH	49
5.2.3 Determinação do FH incorporado e avaliação da eficiência de encapsulação	53

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	54
5.3.1 Determinação de pH	54
5.3.2 Análises morfológicas e de superfície	55
5.3.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial Zeta	55
5.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV)	55
5.3.2.3 Análise por difração de raios X (DRX)	57
5.4 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA EM FOURIER (IVTF)	59
5.5 ANÁLISE TÉRMICA	60
5.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	60
5.5.2 Termogravimetria (TG)	63
5.6 Estudo da estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas	66
5.7 Toxicidade e ação sobre o estresse oxidativo em eritrócitos humanos	68
5.7.1 Toxicidade sobre eritrócitos	68
5.7.2 Ação sobre o dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos	69
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	79

1 INTRODUÇÃO

Vários tratamentos para desordens neurológicas são malsucedidos por não poderem atingir efetivamente o Sistema Nervoso Central (SNC). A fisiologia cerebral apresenta desafios únicos, incluindo a estreita regulação do que pode entrar em seu espaço e a distribuição limitada das substâncias ao longo de suas vias de fluxo de fluido extracelular (ALAM *et al.*, 2010).

A presença da barreira hematoencefálica (BHE) dificulta o desenvolvimento de novos tratamentos voltados ao SNC (PARDRIDGE, 2012), pois ela age, sobretudo, como uma barreira física, que regula a passagem de moléculas a partir da corrente circulatória e assim restringe o tipo de fármaco que pode de atingir o cérebro após estar na circulação sistêmica. Mais de 98% de potenciais novas moléculas terapêuticas são incapazes de atravessar a BHE (PARDRIDGE, 2002).

Entre os grupos de substâncias de origem natural, com capacidade antioxidante promissora, os compostos fenólicos têm exercido um papel proeminente na pesquisa científica. O ácido ferúlico, um polifenol encontrado abundantemente na natureza, é um deles. Bem reconhecido por sua atividade antioxidante, antiinflamatória e anticâncer, tem sido amplamente estudado e sua atividade neuroprotetora é descrita por alguns autores (SULTANA, 2012; YAN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015).

Um dos principais problemas, que tem limitado a utilização clínica do ácido ferúlico é devido às suas características hidrofílicas. Notadamente, sua baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral, que pode ser contornado por alterações em sua estrutura química e pelo preparo de formulações à base de lipídeos (MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Muitos fármacos, quando empregados sem qualquer modificação química ou físico-química, resultam em efeitos farmacológicos reduzidos no SNC pela dificuldade em atravessar a BHE. A lipofilização de moléculas é uma maneira atrativa de elevar as propriedades lipofílicas de um fármaco. Em outras palavras, a modificação de uma substância ativa pelo mascaramento de grupos polares com grupamentos apolares, viabilizaria a conversão de uma substância solúvel em água em uma substância lipossolúvel (ALYAUTDIN *et al.*, 2014).

A associação de um fármaco a um sistema que permita a alteração e/ou adequação de suas propriedades físico-químicas, torna-se possível a partir do uso de nanocarreadores, tais como lipossomas ou nanopartículas lipídicas sólidas (MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar um derivado lipossolúvel do ácido ferúlico, o ferulato de hexadecila (FH), e desenvolver nanocápsulas poliméricas como sistema de vetorização para sua potencial ação sobre o SNC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Promover a síntese de derivado lipossolúvel do ácido ferúlico (ferulato de hexadecila) e posterior obtenção e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo ferulato de hexadecila para uma potencial ação direcionada ao Sistema Nervoso Central (SNC).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese do ferulato de hexadecila (FH) e sua posterior caracterização espectroscópica;
- Avaliar a atividade *scavenger* do ferulato de hexadecila frente a radicais livres e espécies reativas de oxigênio;
- Realizar a obtenção de suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e de blendas PCL-PEG contendo FH;
- Efetuar a caracterização das nanocápsulas poliméricas por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Desenvolver e validar um método analítico, utilizando espectroscopia UV, para determinação de FH.
- Proceder a determinação quantitativa do FH incorporado às nanocápsulas poliméricas, pelo método previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do FH;
- Efetuar a avaliação *ex vivo* em modelo de dano oxidativo em membranas biológicas;

3 REVISÃO DA LITERATURA

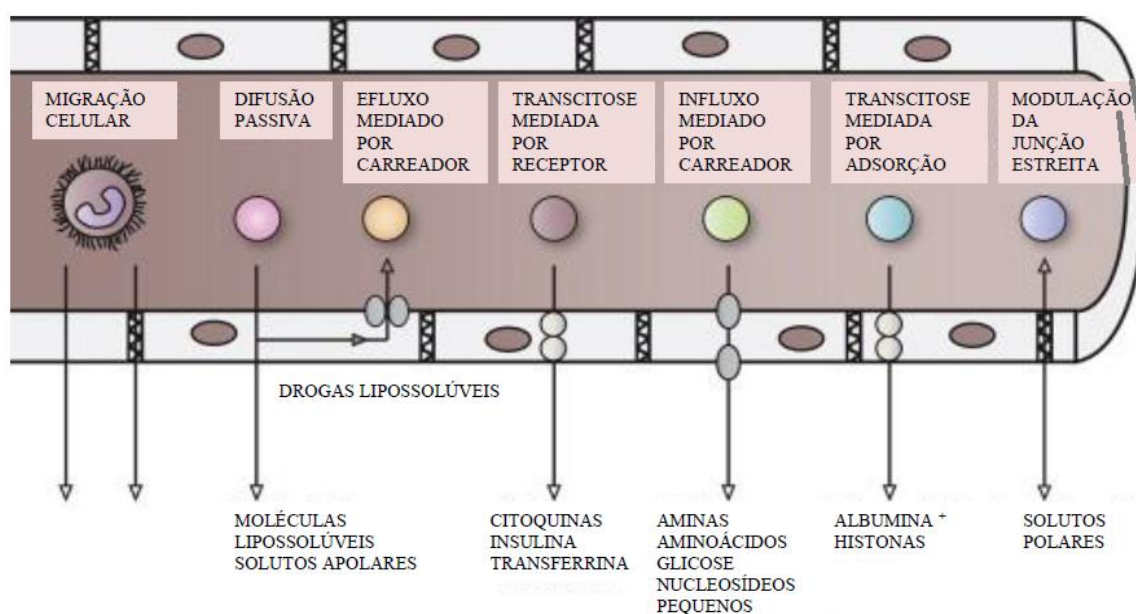
3.1 PASSAGEM DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BHE

A BHE é formada por uma camada de células endoteliais e uma membrana basal. As células epiteliais são altamente especializadas, revestem os capilares, protegem o cérebro de substâncias nocivas presentes no sangue e possuem mecanismos de transporte específicos. Apresentam-se justapostas e conectadas entre si pelas chamadas junções estreitas, o que justifica sua baixa permeabilidade (SERLIN *et al.*, 2015). Em adição às células endoteliais, a microvasculatura também apresenta perícitos (células fagocíticas), localizadas no lado cerebral do endotélio, compartilhando com ele a mesma membrana basal (PARDRIDGE, 2012).

Além da barreira proporcionada pela BHE, enzimas presentes nas células endoteliais, perícitos e astrócitos possuem função metabólica, restringindo a entrada de alguns compostos ao cérebro. Essa entrada também é restringida pela presença da glicoproteína P (PgP), que atua como uma bomba de efluxo, removendo para fora substâncias que permeiam o endotélio (PARDRIDGE, 2012).

Moléculas grandes, como peptídeos e proteínas, entram no cérebro de um modo restrito e regulamentado por transcitose mediada por receptores ou por adsorção; peptídeos pequenos podem atravessar por transcitose mediada por receptor ou por endocitose (SERLIN *et al.*, 2015). Os sistemas de transporte através das células endoteliais que formam a BHE estão ilustrados na Figura 1.

FIGURA 1: POTENCIAIS ROTAS PARA INFILTRAÇÃO E TRANSPORTE ATRAVÉS DA BHE



Fonte: Adaptado de Serlin *et al.* (2015)

Os solutos apolares difundem-se passivamente através da membrana celular. Transportadores de efluxo ativo podem bombear alguns desses solutos penetrados passivamente para fora da célula endotelial. Moléculas polares essenciais, tais como aminoácidos e glicose atravessam a membrana por influxo mediado por transportadores (de forma passiva ou, secundariamente, ativa), já as macromoléculas, tais como peptídeos e proteínas, em todo o endotélio são transportadas por meio de transcitose mediada por receptores. A transcitose adsorptiva pode ser induzida de forma não específica, por macromoléculas carregadas positivamente, resultando na passagem dessas macromoléculas através da BHE. Pode ocorrer também uma modulação nas junções estreitas, afetando a permeabilidade da via de difusão paracelular aquosa (ALAM *et al.*, 2010; SERLIN *et al.*, 2015).

Lipinski e colaboradores (2001) definiram características, que estão presentes na maioria dos fármacos e que garantem uma permeação adequada para agir em um organismo, entre elas está o peso molecular (≤ 500) e o coeficiente de partição ($\text{LogP} \leq 5$). A maioria dos fármacos é absorvida por difusão passiva através das células, pela via transcelular, pois a presença das junções estreitas impede a passagem pela via paracelular (PARDRIDGE, 2002). Assim, compostos lipofílicos, capazes de atravessar as membranas, são mais permeáveis, existindo uma estreita relação entre o coeficiente de partição do fármaco e sua permeabilidade através da BHE (LIPINSKI *et al.*, 2012).

Para transpor a BHE e possibilitar o acesso de agentes terapêuticos ao cérebro, algumas abordagens são atualmente utilizadas, podendo ser por meio de métodos invasivos; farmacológicos, como os nanocarreadores coloidais, lipossomas e nanopartículas poliméricas; ou fisiológicos, como a modulação das junções estreitas, o estímulo físico, químico e biológico (GABATHULER, 2010; ALYAUTDIN *et al.*, 2014). Em meio a essas abordagens, as que consideram a utilização de potencializadores de permeação e o uso de polímeros carreadores são alvos de extensa curiosidade no campo da pesquisa (ALAM *et al.*, 2010).

O uso de tecnologias capazes de transportar moléculas através das células endoteliais da BHE permite uma distribuição homogênea de agentes terapêuticos no cérebro e, assim, proporciona uma uniforme e rápida exposição às células cerebrais (GABATHULER, 2010). Alguns fatores podem favorecer esta habilidade de atravessar a BHE, como o tamanho molecular menor que 500 Da, a carga (baixa capacidade de ligação de hidrogênio) e a

lipofilicidade da droga, quanto mais lipossolúvel, melhor o transporte (LIPINSKI *et al.*, 2012).

Um avanço para alcançar a capacidade de vetorização efetiva de fármacos ao SNC seria o desenvolvimento criterioso de estratégias de liberação, com base na compreensão de suas interações com o ambiente biológico, além das alterações que ocorrem com a progressão das doenças, o mecanismo e o local de ação dos fármacos e a patobiologia das doenças (ALAM *et al.*, 2010). É extremamente importante que o sistema de liberação desenvolvido não deve exercer impacto significativo, seja a curto ou longo prazo, nas funções cerebrais (CHEN e LIU, 2012).

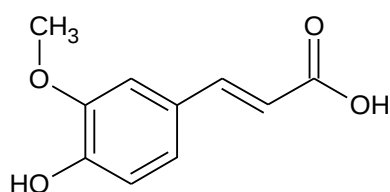
Os nanocarreadores fazem parte de uma classe emergente de sistemas de liberação de fármacos que podem ser facilmente adaptadas para a vetorização a diversas partes do corpo, incluindo o cérebro. Na última década tem atraído a atenção para sua utilização no transporte de fármacos através da BHE. Eles podem transportar uma diversidade de fármacos, controlando sua liberação, e suas propriedades de superfície podem ser modificadas. Essas características fazem deles uma alternativa atraente para o transporte de fármacos através da BHE (CHEN e LIU, 2012).

3.2 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS

3.2.1 Ácido Ferúlico

O ácido ferúlico (AF, ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico) é um composto fenólico, extremamente abundante em plantas, encontrado comumente em diversos vegetais, frutas e grãos (LIN *et al.*, 2013). É sintetizado pela via do chiquimato, a partir da fenilalanina ou da L-tirosina. Na natureza, pode ocorrer tanto na forma *Z* (líquido oleoso amarelado) como na forma de seu isômero *E* (cristal branco), sendo a última mais frequente, cerca de 90% (GRAF, 1992; PAIVA *et al.*, 2013).

FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FERÚLICO



Fonte: o autor

Apresenta características desfavoráveis, como sua fácil oxidação e fotossensibilidade, responsáveis pela conversão parcial do isômero *E* para o isômero *Z*, muito menos ativo. Embora possua baixa solubilidade em água, tem características hidrofílicas, como sugere sua estrutura (Figura 2) e é confirmado por estudo que avalia estas características (SOHN e OH, 2003). A insolubilidade em água é um obstáculo nas formulações farmacêuticas, afetando a sua estabilidade e a biodisponibilidade dos fármacos (KIPP, 2004).

Facilmente metabolizado (KESH *et al.*, 2013), absorvido por via oral e rapidamente eliminado (LI *et al.*, 2011). Embora a identificação, e a importância quantitativa, das vias enzimáticas e/ou dos transportadores no processo de eliminação do ácido ferúlico não estejam bem definidas, estudos de sua farmacocinética propõem o envolvimento de enzimas do citocromo P450 (CYP), sulfotransferases, glucuronosiltransferases e transportadores de ácidos monocarboxílicos (LI *et al.*, 2011).

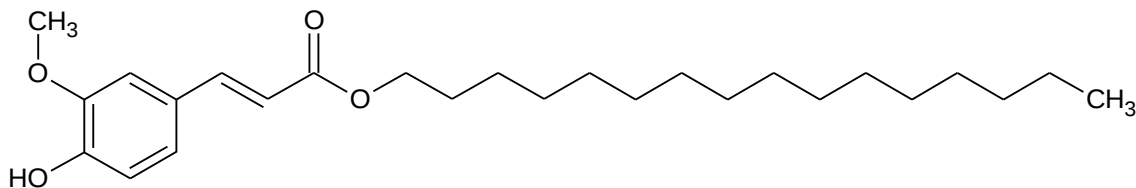
O AF apresenta atividade antioxidante e antiinflamatória (LI *et al.*, 2011). Além dessas atividades, várias outras têm sido demonstradas como anticâncer, antiapoptótica e antidiabética (LIN *et al.*, 2013). Possui várias propriedades fisiológicas como a inibição da promoção de tumor, a redução do colesterol sérico (especialmente o total), do perfil lipídico hepático e do nível de triglicerídeos, e também possui ação hepatoprotetora (KESH *et al.*, 2013)

Adicionalmente, atenua o estresse oxidativo induzido pelo glutamato. Lin *et al.* (2013) indicaram a inibição da liberação do glutamato pela supressão de canais de cálcio voltagem dependente em estudo *in vitro*. A neurotoxicidade induzida pela proteína amilóide também é atenuada pelo AF. Além disso, protege contra a lesão cerebral devido à isquemia e melhora a perda de memória induzida pela β -amilóide (YAN *et al.*, 2013), sugerindo um papel neuroprotetor para o ácido ferúlico (LIN *et al.*, 2013).

3.2.2 Ferulato de Hexadecila

O ácido ferúlico ocorre naturalmente na forma de éster em várias plantas (GRAF, 1992). O ferulato de hexadecila [(2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)acrilato de hexadecila ou ferulato de cetila] é um éster derivado do ácido ferúlico que, na natureza, é encontrado em raízes, como as de algumas espécies de batatas. Os primeiros registros encontrados foram de quando foi isolado por Kawasaki *et al.* (1992). A estrutura química do FH está representada na Figura 3.

FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DO FERULATO DE HEXADECILA



Fonte: o autor

A presença de um grupamento éster e de uma longa cadeia alquílica torna esse composto mais lipofílico, aumentando assim sua habilidade para atravessar membranas, que são de natureza lipídica. Especialmente para o acesso ao SNC, o aumento da lipofilicidade se torna útil por facilitar seu transporte através da barreira hematoencefálica (MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Um estudo realizado por Anselmi et al. (2004) mostrou que a conformação do FH o torna menos suscetível a interagir, por força de van der Waals, com os fosfolípidos de membrana e nela permanecer ancorado, quando comparado a outros ésteres alquílicos derivados do ácido ferúlico.

Há uma estreita relação entre o coeficiente de partição ($\log P$) de um fármaco e a sua permeabilidade na BHE como relata Lipinski et al. (2012). Comparando-se os valores de $\log P$ do FH e do AF de 8,86 e 1,25, respectivamente, o FH estaria mais suscetível a transpor essa barreira. Adicionalmente, estudos sugerem que a solubilidade de um composto em lípidos pode ser um importante fator para a eficiência da supressão da oxidação lipídica e que ferulatos de cadeia alquílica seriam mais promissores antioxidantes do que o AF (FANG *et al.*, 2006).

3.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

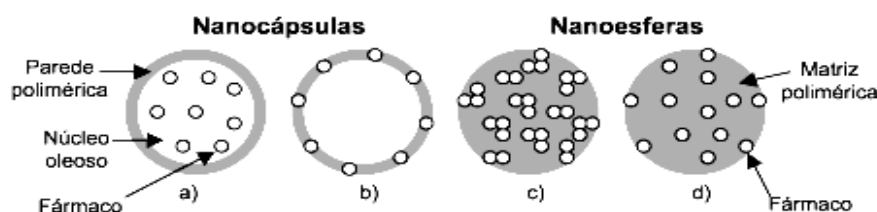
Uma característica importante da nanotecnologia é sua possibilidade de modificação e adaptação para satisfazer as necessidades das diversas condições patológicas (SAHOO e LABHASETWAR, 2003). Na área das ciências farmacêuticas, essa tecnologia está voltada ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos com o objetivo de direcionar e/ou regular a liberação de fármacos (SAKATA *et al.*, 2007). Algumas de suas vantagens e benefícios são a versatilidade, a flexibilidade e a adaptabilidade (LU *et al.*, 2004).

A nanotecnologia pode ser empregada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos na forma de nanopartículas poliméricas, nanoesferas, nanosuspensões, nanoemulsões, nano-micelas e nano-lipossomas, nanocristais, nanotubos de carbono,

nanofibras e nanorobôs, nanopartículas lipídicas sólidas e veículos lipídicos nanoestruturados (SAHOO e LABHASETWAR, 2003).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm (PUISIEUX *et al.*, 1994). Constituídas por polímeros biodegradáveis, são de grande interesse devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, que diferem entre si na composição e organização estrutural (Figura 4).

FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS POLIMÉRICAS



- a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas;
 - b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas;
 - c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas;
 - d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas
- Fonte: Adaptado de Schaffazick *et al.* (2003)

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico, disposto ao redor de um núcleo oleoso. O fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, diferentemente, não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, onde fármaco pode ficar retido ou adsorvido (PUISIEUX *et al.*, 1994).

Existem vários métodos relatados na literatura para o preparo de sistemas constituídos por nanopartículas poliméricas, que podem ser, de forma geral, classificados como métodos de polimerização de monômeros ou de uso de polímeros pré-formados (PINTO REIS *et al.*, 2006).

A escolha do método deve ser feita considerando as características de solubilidade da substância terapeuticamente ativa e a razão fármaco/polímero deve ser adequada à obtenção de uma eficiência de encapsulação elevada e toxicidade reduzida (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Para incorporar fármacos lipofílicos é adaptado o método de preparo a partir de polímeros pré-formados, como os poliésteres alifáticos (SEVERINO *et al.*, 2011). Esse método é de fácil controle, maior rendimento, e pode ser realizado por emulsão-evaporação do solvente (WANG *et al.*, 2011), por deslocamento do solvente (TAHARA *et al.*, 2010), por *salting-out* (WHEATLEY e LEWANDOWSKI, 2010) ou por emulsão-difusão do solvente (OZTURK *et al.*, 2010; SOUTO *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas as nanopartículas têm atraído bastante interesse na vetorização de fármacos ao SNC, pois possuem grande potencial de facilitar o transporte de drogas através de barreiras, como a BHE. Algumas propriedades, como tamanho reduzido, superfície adaptada, melhor solubilidade e múltipla funcionalidade, as tornam capazes de interagir de uma maneira nova com complexas funções celulares (SAHOO e LABHASETWAR, 2003).

As nanopartículas são capazes de proteger o fármaco da degradação e propiciam interessantes propriedades *in vivo*, como aumento da sua absorção, maior capacidade de ultrapassar barreiras biológicas (já referida) e distribuição diferenciada e otimizada (OPPENHEIM, 1981).

Uma vez que a superfície e a carga superficial podem ser modificadas pela inserção de determinados ligantes, como por exemplo, anticorpos, tensoativos e polímeros, elas podem ser direcionadas para células e tecidos específicos (macrófagos, células tumorais, cérebro, entre outros). Assim, são estratégias de alto desempenho para prolongar a liberação do fármaco e consequentemente, potencializar o tempo de meia-vida nos compartimentos biológicos (OPPENHEIM, 1981).

Entretanto, o desenvolvimento de sistemas coloidais (nanopartículas e lipossomas) para o direcionamento de fármacos é limitado pela rápida ligação das proteínas plasmáticas à superfície das nanoestruturas administradas (opsonização) assim que eles atingem a circulação sistêmica (GREF *et al.*, 1994).

A opsonização promove o reconhecimento e a captação dos carreadores coloidais por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), particularmente as células de Küpffer do fígado e macrófagos do baço, levando a uma rápida depuração das nanopartículas da circulação sanguínea (GREF *et al.*, 1994). Após a opsonização pode ocorrer fagocitose, englobamento do material estranho presente na corrente sanguínea por células fagocitárias, destruição e remoção da circulação.

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para modificar superfícies de nanopartículas, com o objetivo de diminuir, retardar ou até mesmo eliminar sua adsorção às proteínas plasmáticas e, consequentemente prolongar o tempo de circulação das nanopartículas no

organismo (GREF *et al.*, 1994; MOSQUEIRA *et al.*, 2001; SOPPIMATH *et al.*, 2001; MOGHIMI e SZE BENI, 2003; OWENS III e PEPPAS, 2006).

Um método que tem sido largamente utilizado é o método de revestimento da superfície com polímeros hidrofílicos/tensoativos e de desenvolvimento de copolímeros biodegradáveis com segmentos hidrofílicos, que podem reduzir as interações eletrostáticas e hidrofóbicas, pelas quais as opsoninas são adsorvidas à superfície das partículas (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

Nesse sentido, a modificação das características superficiais das nanopartículas, seja pela adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos na superfície das mesmas, demonstra ser uma estratégia promissora para a obtenção de carreadores furtivos, ou seja, que impedem o fenômeno de opsonização e escapam da captura pelas células fagocitárias (GREF *et al.*, 2000; MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

A presença de uma cobertura feita com cadeias longas de polímeros hidrofílicos promove uma estabilização estérica das nanopartículas, evitando a opsonização e a fagocitose. Entre os polímeros com a finalidade de estabilização estérica, o polietilenoglicol (PEG) é o polímero mais comumente utilizado para promover a modificação da superfície. O modo de fixação desse polímero sobre a superfície das partículas pode, como mencionado, envolver a adsorção física ou a ligação covalente com o polímero formador da matriz ou da parede polimérica (HANS e LOWMAN, 2002).

As moléculas de PEG podem ser associadas às nanopartículas por diferentes métodos: ligação covalente, mistura durante a preparação das nanopartículas e adsorção à superfície das partículas previamente preparadas (HANS e LOWMAN, 2002).

As características físico-químicas do PEG, como a alta hidrofiliicidade, presença de cadeias flexíveis, neutralidade elétrica e a ausência de grupos reativos são adequadas para prevenir interações com componentes biológicos, como o sistema fagocitário mononuclear (GREF *et al.*, 1995; STORM *et al.*, 1995).

A repulsão estérica é resultado de uma perda de entropia conformacional das cadeias de PEG ligadas a uma superfície estranha e uma baixa energia livre interfacial do PEG em água e contribuem para uma importante propriedade fisiológica das nanopartículas revestidas com PEG (OTSUKA *et al.*, 2003). Além de evitar o reconhecimento pelos anticorpos do organismo, a presença de PEG na superfície das nanopartículas aumenta o tempo de residência desses sistemas na circulação sistêmica, podendo otimizar as respostas terapêuticas (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; HANS e LOWMAN, 2002).

3.3.1 Formas farmacêuticas de liberação modificada contendo ácido ferúlico e seus ésteres

Em levantamento bibliográfico, foram encontrados alguns estudos trazendo o uso de AF e/ou seus ésteres em formas farmacêuticas de liberação modificada. Um estudo sintetizou nanopartículas com albumina de soro bovino tendo como alvo o tecido hepático, entretanto, utilizava o sal ferulato sódico e não o éster (LI e HUANG, 2008). Produziram-se, ainda, nanopartículas de ácido ferúlico pelo método de dupla emulsão para estudo do efeito anticâncer em células de câncer de pulmão (MERLIN *et al.*, 2012). Nanopartículas magnéticas contendo ferulato de sódio mostraram efeito protetor em rins de ratos expostos a um modelo de sepse (MA *et al.*, 2013).

O estudo de Souto e colaboradores (2005) utilizou um éster do ácido ferúlico, o n-dodecil-ferulato, em nanopartículas com finalidade de fotoproteção. Outrossim o efeito fotoprotetor do ferulato foi utilizado no estudo de Trombino *et al.* (2009) que sintetizaram nanopartículas baseadas em estearil-ferulato para diminuir a fotosensibilidade de β -caroteno e α -tocoferol. Outro estudo de Trombino e colaboradores (2013) utilizou a mesma técnica de nanopartículas com base em éster de AF, desta vez contendo AF, e foi observado que a nanopartícula protegeu o AF da fotodegradação, resultando em um bom efeito antioxidante em testes *in vivo*.

Com relação ao SNC, dois estudos testaram o efeito neuroprotetor do ácido ferúlico (AF) livre e em nanopartículas sólidas em cultura celular, obtendo resultado de redução de estresse oxidativo e morte celular em modelos de estudo de Doença de Alzheimer (PICONE *et al.*, 2009; PICONE *et al.*, 2013). Outro estudo mais recente, de Wu e colaboradores (2014), produziu nanopartículas contendo ácido ferúlico e quitosana e testou em modelo de lesão de medula espinhal, observando que o sistema nanoestruturado possibilitou maior tempo na circulação e acesso à matéria cinzenta e branca do SNC, além de preservar axônios e bainha de mielina e redução de resposta inflamatória no local afetado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 830, São Paulo, Brasil);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Espectrômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90, Malvern, Reino Unido);
- Estufa a vácuo (TECNAL, modelo TE 395, Piracicaba, Brasil);
- Evaporador rotativo (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, modelo JEM 1200 EX-II, Tóquio, Japão)
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármacos

- Ácido Ferúlico – FA; C₁₀H₁₀O₄; MW: 194,18 Da (99,80% de pureza, Suzhou Leader Chemical Co. LTDA., Suzhou, China);
- Quercetina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos)

4.2.2 Polímeros

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, M_w 10.000-14000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Polietilenoglicol (PEG, M_w 5.400-6.600 g.mol⁻¹, CROMATO PRODUTOS QUÍMICOS, Diadema, Brasil).

4.2.3 Água Purificada

Para a elaboração das suspensões de nanocápsulas, determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foi empregada água ultrapura, obtida por meio do sistema Milli-Q® (MILLIPORE, Bedford, Estados Unidos).

4.2.4 Solventes e demais reagentes

- ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Acetato de etila P.A. ACS (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Acetona P.A (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Etanol absoluto;
- Hexano P.A. (BIOTEC);
- HOCl (ácido hipocloroso, 30 μ M, Polipur® 4442)
- Metanol grau HPLC (EMD CHEMICALS INC., Darmstadt, Alemanha);

- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween[®] 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®], OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Persulfato de potássio (2,46 mM, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Tampão fosfato de sódio 10, 50 e 100 mM;
- TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

4.2.5 Outros materiais

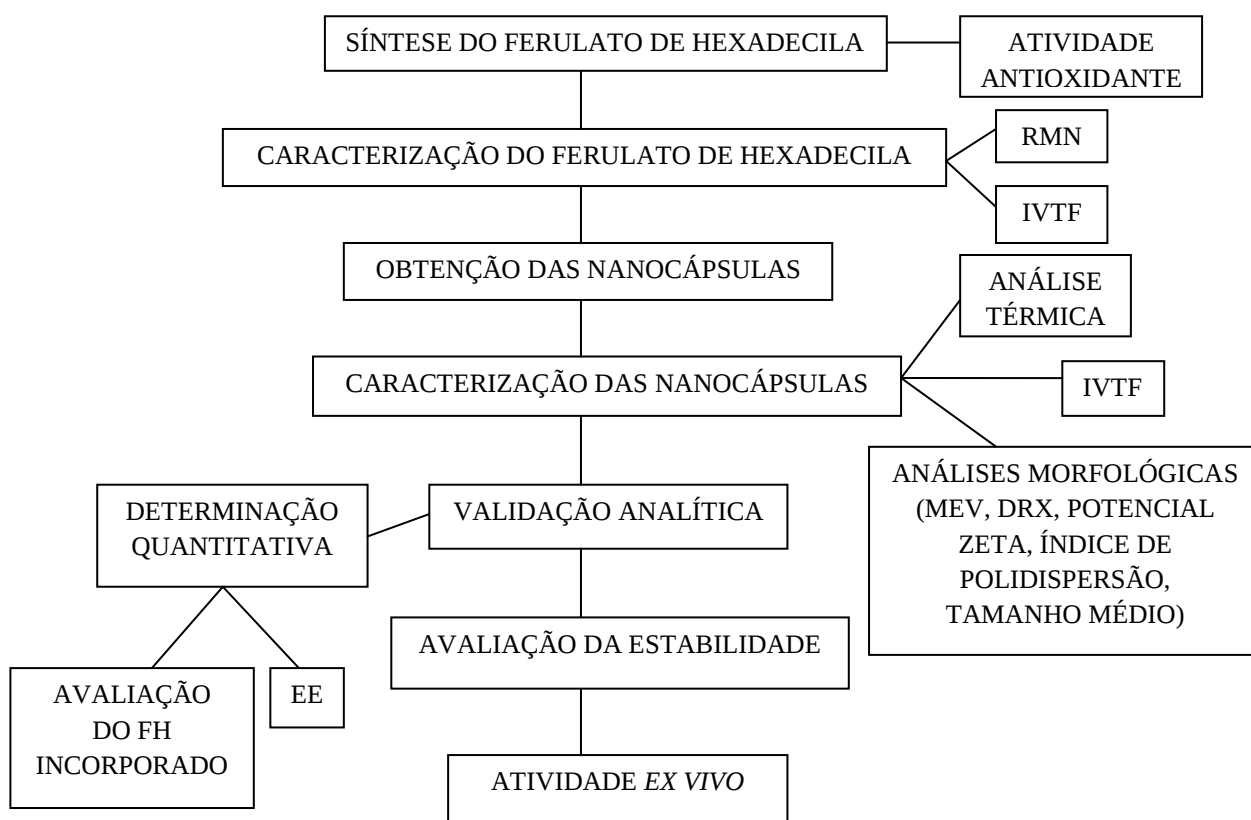
- Cromatoplasas de Sílica-gel 60 F254 Merck[®];
- Membranas de ultrafiltração (Amicon[®] Ultra-0,5 mL 10K, MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) Merck[®];

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa iniciou com a obtenção de derivado lipossolúvel do ácido ferúlico, ferulato de hexadecila (FH), por meio de esterificação e posterior desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo este derivado. Para a caracterização do FH foi realizada espectrometria no infravermelho (IVTF) e ressonância magnética nuclear (RMN). As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. Para a determinação quantitativa do ferulato de hexadecila incorporado nas nanopartículas poliméricas foi utilizado o método por espectroscopia UV, previamente validado, avaliando a eficiência de incorporação do fármaco.

A estabilidade das nanopartículas poliméricas foi investigada. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 5.

FIGURA 5: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



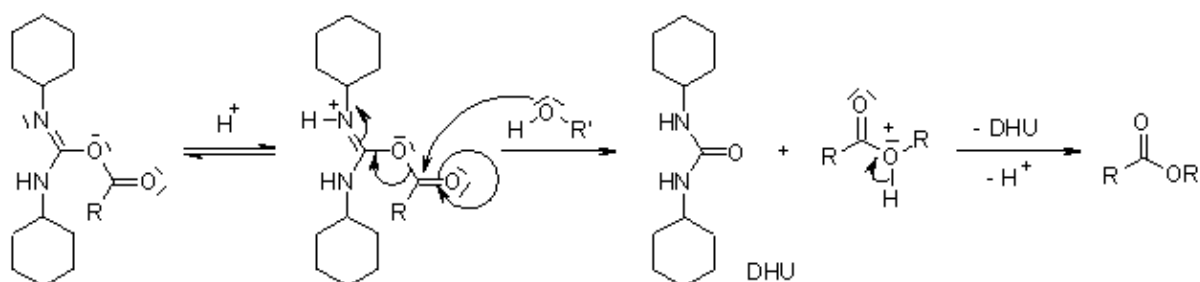
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Síntese do ferulato de hexadecila

Como estratégia para a síntese do éster de ácido ferúlico (AF) e visando melhorar sua lipofilicidade, o álcool cetílico (AC), de longa cadeia alquílica (16 carbonos), foi utilizado. A reação entre o AF e o AC foi desenvolvida empregando a 1,3-dicicloexilcarbodiimida (DCC) como agente desidratante em tetra-hidroflurano (THF) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador, tomando como base o trabalho desenvolvido por Neises e Steglich (1978).

A esterificação de Steglich é uma reação branda que consiste em utilizar DCC como reagente de acoplamento e DMAP como catalisador. Além do éster final é obtido também o subproduto diciclo-hexiluréia (DHU) (NEISES e STEGLICH, 1978). A Figura 6 ilustra o mecanismo envolvido na esterificação.

FIGURA 6: ETAPAS DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO



Fonte: o autor

Na primeira etapa o AF reage com o DCC para formar um intermediário O-ácil isoureia, com reatividade similar à do anidrido do ácido dodecanóico e, portanto, mais reativo que o reagente de partida. Dependendo da velocidade da reação, uma reação paralela pode ocorrer na forma de um rearranjo 1,3 do intermediário O-ácil isouréia a um N-ácil uréia que não prossegue reagindo com o álcool. O DMAP é adicionado na segunda etapa tanto como catalisador como para impedir essa reação paralela que poderia comprometer o rendimento da esterificação e a purificação do produto final. Neste caso, o DMAP atua como um reagente de transferência, e é nesta etapa que os grupos hidroxilas atacam o intermediário para a formação do ferulato de hexadecila (FH).

Em balão de fundo redondo foi adicionado 50mL de THF seco, onde foi dissolvido 2 g (10,3 mmol) de AF e 12,48 g (51,5 mmol) de AC. À solução foram adicionadas quantidades

catalíticas de DMAP e 2,12 g de DCC (10,3 mmol). A atmosfera do sistema foi trocada por nitrogênio e a mistura reacional mantida em agitação magnética, sob fluxo de nitrogênio, por 12 h, à temperatura ambiente.

Transcorrido esse tempo, a mistura reacional foi filtrada utilizando algodão, por duas vezes, para a retirada da N-N'-dicicloexiluréia (DCU) formada durante a síntese. A solução obtida após a filtração foi transferida para um balão de fundo redondo e levada ao evaporador rotatório, para a retirada do THF.

4.4.1.1 Purificação do ferulato de hexadecila

O produto obtido da síntese foi purificado utilizando cromatografia em coluna cromatográfica (CC; 50 X 500 mm), preenchida com Sílica-gel 230 mesh, Merck® (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária na razão sílica:amostra 10:1 (m:m). A eluição foi realizada, em sistema de passagem de solventes, com fase móvel de hexano e acetato de etila puros ou combinados em diferentes proporções e seguindo ordem crescente de polaridade (100:0, 90:10, 80:20, 70:30).

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi empregada para análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna. Utilizou-se, como fase estacionária, cromatoplasas de Sílica-gel 60 F254 Merck® e como fase móvel os solventes hexano, corofórmio e acetato de etila (puros ou combinados). Como reveladores foram utilizados vanilina e cloreto férrico. As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm. O critério para a purificação foi a presença de uma única banda na CCD. Finalmente, o éster foi seco durante 2 dias em um liofilizador a – 40°C e 400 µHg de vácuo.

4.4.1.2 Caracterização do ferulato de hexadecila

O produto da reação de esterificação formado foi caracterizado por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e ressonância magnética nuclear (RMN).

4.4.1.3 Perfil da ação sobre radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Para verificar o potencial *scavenger*, foi realizada avaliação *in vitro* em sistemas modelo. Amostras de FH, AF e do padrão quercetina (Sigma-Aldrich®) foram solubilizadas em metanol na concentração inicial de 1 mg.mL⁻¹ e realizadas diluições para as concentrações entre 0,3 mg.mL⁻¹ e 0,01 mg.mL⁻¹. A ação antioxidante foi testada frente ao DPPH•, ABTS⁺⁺,

HOCl. As absorbâncias (ABS) foram lidas em espectrofotômetro de placas Bioteck® µQuant. Os resultados foram adquiridos em triplicata e expressos como a porcentagem de inibição, pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = ((\text{ABS}_{\text{oxidante}} - \text{AB}_{\text{teste}}) / \text{ABS}_{\text{oxidante}}) \times 100,$$

onde ABS_{oxidante} é a absorbância lida da solução contendo apenas o oxidante e AB_{teste} é a absorbância lida da mistura contendo o FH, o AF ou o padrão quercetina adicionado ao oxidante.

A concentração que promoveu 50% da inibição dos radicais livres e espécies reativas (CI50) foi obtida plotando-se os dados de inibição e a concentração final de cada amostra. Os cálculos e gráficos foram feitos usando o software GraphPad Prism® 5, versão 5.01.

4.4.1.3.1 Ação scavenger sobre o DPPH[•]

A ação das amostras foi testada frente a 60 µM do radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich®) solubilizado em etanol absoluto. O meio foi composto pelas amostras com concentração entre 0,1 e 50 µg.mL⁻¹, solução de DPPH[•] e o meio reacional completado para 1000 µL com etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A ação scavenger foi observada pelo decréscimo da absorbância em $\lambda = 531 \text{ nm}$ (SOARES *et al.*, 1997).

4.4.1.3.2 Ação scavenger sobre o ABTS^{•+}

O radical catiônico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), Sigma-Aldrich®) foi preparado reagindo 5 mL de solução aquosa de ABTS^{•+} (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,46 mM, Sigma-Aldrich®), deixando-se a reação ocorrer em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, durante 12 a 16 horas antes do uso (RE *et al.*, 1999). Antes do ensaio, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato de sódio 10 mM (relação 1:20). As amostras, em concentrações entre 0,1 e 50 µg.mL⁻¹, foram adicionadas às placas juntamente com ABTS^{•+} e tampão fosfato de sódio 100 mM, completando um volume final de 1000 µL de meio reacional. Procedeu-se uma incubação de 15 minutos ao abrigo da luz e então foi feita a leitura em $\lambda = 734 \text{ nm}$.

4.4.1.3.3 Ação scavenger sobre o HOCl

As reações foram feitas em tampão fosfato de sódio 50,0 mM, pH 7,4, para um volume final de 1000 μL , conforme realizado por da Costa *et al.* (2004), com modificações. As amostras, em concentrações entre 0,1 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram adicionadas ao meio juntamente com ácido hipocloroso (HOCl, 30 μM , Polipur® 4442) e incubadas ao abrigo da luz por 10 minutos. Em seguida, o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich®) (2,8 mM) foi preparado e adicionado, seguido de mais 5 minutos de incubação. As leituras de absorbância foram efetuadas em $\lambda = 652 \text{ nm}$.

A concentração da solução de ácido hipocloroso (HOCl) preparada em água foi determinada espectrofotometricamente pelo seu coeficiente de extinção molar (ϵ) em comprimento de onda de 295 nm ($350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ZGLICZYNSKI *et al.*, 1971).

4.4.2 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Suspensões de nanocápsulas, obtidas a partir do polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e de blenda PCL-PEG, contendo FH, foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito anteriormente (FESSI *et al.*, 1989). Resumidamente, o polímero ou blenda polimérica (0,100 g) foi solubilizado em acetona (27 mL), em presença de Span 80® (0,077 g), ferulato de hexadecila (0,01 e 0,02 g) e triglicerídeos de cadeia média (TCM, 0,3 g). Após 60 minutos de agitação magnética moderada a 40°C, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa (54 mL) contendo Tween 80® (0,077 g). A agitação magnética foi mantida por 10 minutos após o término da adição. O solvente orgânico e o excesso de água foram, então, eliminados por rota-evaporação para atingir um volume final de 10 mL e concentração do FH de 1,0 mg/mL (NC(1)) e 2,0 mg/mL (NC(2)). Para fins comparativos, foi preparada uma suspensão de nanocápsulas sem a adição do fármaco (NC(O)), como controle negativo. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. As composições das formulações estão indicadas na Tabela 1.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

FORMULAÇÃO	Fase Orgânica						Fase Aquosa	
	FH (g)	PCL (g)	PEG (g)	TCC (g)	Acetona (mL)	Span 80® (g)	Twen 80® (g)	Água (mL)
NC-PCL (0) ¹	—	0,1	—	0,3	27	0,077	0,077	54
NC-PCL (1) ²	0,01	0,1	—	0,3	27	0,077	0,077	54
NC-PCL (2) ²	0,02	0,1	—	0,3	27	0,077	0,077	54
NC-PCL-PEG (0) ¹	—	0,075	0,025	0,3	27	0,077	0,077	54
NC-PCL-PEG (1) ³	0,01	0,075	0,025	0,3	27	0,077	0,077	54
NC-PCL-PEG (2) ³	0,02	0,075	0,025	0,3	27	0,077	0,077	54

¹controle negativo das nanocápsulas poliméricas; ²nanocápsulas de poli(ε-caprolactona); ³nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) com polietilenoglicol

4.4.2.1 Obtenção das misturas físicas

As misturas físicas (MF), entre os polímeros utilizados e o FH, foram preparadas para o estudo de caracterização comparativo com as formulações de nanocápsulas desenvolvidas. Essas misturas foram constituídas na proporção, em massa, de 1:1 (FH:PCL) e 1:1:1 (FH:PCL:PEG).

4.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por UV-VIS

A validação foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

Os ensaios foram efetuados em espectrômetro UV-VIS NIR (Varian Cary 50; Mulgrave, Australia). Todas as medidas de absorbância foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico, na faixa espectral entre 200 e 800 nm.

O método analítico por UV-VIS foi desenvolvido e validado para quantificar o teor do FH encapsulado e avaliar a eficiência de encapsulação. Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.4.3.1 Preparo das soluções padrão

A solução padrão estoque de FH foi preparada em etanol a uma concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Diluições foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentrações entre 20,0 e 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a concentração de 60,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi o ponto médio da curva analítica.

A solução padrão contendo 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FH foi preparada solubilizando-se 12,5 mg de FH em pequena quantidade de álcool etílico e posteriormente completando-se com ele o volume do balão volumétrico de 50 mL. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente e protegida da luz.

4.4.3.2 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de ferulato de hexadecila

Para avaliar a melhor condição de leitura e identificar o espectro de absorção do FH ele foi submetido à varredura na faixa do ultravioleta e do visível. O comprimento de onda em que apresentou o pico de máxima absorção foi selecionado para a realização das medições.

A especificidade foi determinada por análise do espectro de absorção do FH em comparação àqueles obtidos com as formulações de nanocápsulas poliméricas sem o FH, com o objetivo de confirmar que nenhum componente da formulação interferiu na quantificação.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas. Foram realizadas diluições a partir da solução trabalho (padrão) em uma faixa de concentração entre 20 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica. Os gráficos da curva de calibração foram obtidos representando a absorbância *versus* concentração. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). A avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (DP) e inclinação (S) das curvas analíticas, por meio das Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 2})$$

A precisão do método foi determinada seguindo o guia do ICH (2005). A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

Para repetibilidade, três concentrações (25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram avaliadas em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada por desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) de seis medições de solução na concentração teórica de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, analisadas intradia, interdía e com diferentes analistas.

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se a quantidade de 2,5 mg de FH à solução padrão de FH (250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Alíquota de 120 μL da solução padrão FH (250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e da nova solução preparada (300,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram diluídas para 4 mL em etanol, em triplicata, resultando em amostras à 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 36,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A exatidão (%) do método foi calculada, em triplicata, conforme Equação 3.

$$\%Exatidão = \frac{C36 - C30}{36 - 30} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

onde, C36 e C30 correspondem ao valor da concentração experimental obtida.

A robustez foi avaliada nas amostras a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por variações no comprimento de onda, uso de solvente de diferentes fabricantes (Merk Millipore e Biotec) e diferentes cubetas. O teste Tukey de Análise de variância (ANOVA) foi realizado para avaliar se as variações alteram o resultado das análises. Os resultados foram analisados utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão.

4.4.4 Determinação do FH incorporado e avaliação da eficiência de encapsulação

A quantificação do FH encapsulado foi realizada pelo método indireto, que determina a concentração de fármaco não associado ao sistema carreador no ultrafiltrado. Uma alíquota de 500 μL das suspensões de nanocápsulas foram submetidas à ultrafiltração/centrifugação usando um dispositivo de centrifugação (Amicon[®] 10.000 Mw, Milipore) a 22000 rpm por 10 minutos. O teor do FH foi determinado (n=3) no ultrafiltrado por UV-VIS, utilizando um método analítico previamente validado segundo os preceitos estabelecidos pelo ICH (2005).

A eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre a concentração total e a concentração de fármaco livre (Equação 4).

$$EE\% = \frac{\text{FH inicial} - \text{FH livre}}{\text{FH inicial}} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

Onde, $FH_{inicial}$ corresponde à concentração do fármaco adicionada inicialmente à formulação e, FH_{livre} , à concentração de FH não incorporado às nanocápsulas, quantificadas por UV. Os valores de EE% foram expressos como média $\pm$ DP.

4.4.5 Caracterização das suspensões de nanocápsulas poliméricas

4.4.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após o preparo. Os resultados representam a média de três amostras diferentes.

4.4.5.2 Análises morfológicas e de superfície

4.4.5.2.1 Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos ($n=3$) por espectroscopia de correlação de fótons após a diluição de uma alíquota de suspensão de nanocápsulas em água purificada (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). A análise de potencial zeta ($n=3$) foi feita no mesmo equipamento após a diluição da amostra em uma solução de NaCl a 10 mmol/L (1:500).

4.4.5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV)

A avaliação morfológica e de superfície das nanopartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.4.5.2.3 Análise por difração de raios X (DRX)

As nanocápsulas poliméricas contendo FH, após liofilização, o FH, os polímeros puros e os compostos de partida, álcool cetílico e cetil ferulato foram examinadas em difratômetro de raio-X XRD-6000 (Shimadzu), scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda=1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.6 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As nanocápsulas poliméricas contendo FH, após serem liofilizadas, foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier das amostras preparadas foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, dos polímeros de partida e das respectivas misturas físicas.

4.4.7 Análise térmica

4.4.7.1 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (CED) foram realizadas para o FH, o AC e o AF (produtos de partida), bem como para as misturas físicas e as nanopartículas poliméricas preparadas, após liofilização. As amostras foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; P.F.= 156,6°C; $\Delta H_{fusão} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 400 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante.

4.4.7.2 Termogravimetria

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio de curvas de termogravimetria (TG). A análise termogravimétrica foi realizada no mesmo equipamento, STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando célula calorimétrica de alumina, contendo aproximadamente $5 \pm 0,1$ mg da amostra, onde foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 600 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

4.4.8 Estudo de estabilidade

As suspensões de nanocápsulas foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C) e protegidas da luz em frascos de vidro âmbar. As formulações foram monitoradas durante 2 meses de armazenamento pela medida do teor de fármaco, pH, tamanho de partículas, distribuição de tamanho e potencial zeta.

4.4.9 Toxicidade e ação sobre o estresse oxidativo em eritrócitos humanos

4.4.9.1 Toxicidade sobre eritrócitos

O estudo foi realizado segundo Velloso (2008), com modificações. O sangue total foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, o plasma foi retirado e as hemácias lavadas utilizando uma solução tampão de Fosfato de Sódio 10 mM/NaCl 150 mM. O processo de centrifugação e lavagem se repetiu por mais duas vezes e após a última centrifugação foi adicionado volume de tampão suficiente para a obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 5%. À suspensão de eritrócitos foram adicionadas diferentes alíquotas de FH e NC-PCL-PEG nas concentrações de 0,2 a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram incubadas por 5 horas à temperatura de 37 °C.

Após uma hora de incubação alíquotas das amostras foram retiradas em tubos contendo solução tampão de Fosfato de Sódio 10 mM/NaCl 150 mM, os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante teve a absorbância lida em 414 nm para a determinação da hemólise, liberação da hemoglobina das células para o meio reacional na presença da amostra. A cada intervalo de uma hora, durante cinco horas, novas alíquotas foram retiradas das amostras incubadas e o procedimento repetido para a realização da leitura da absorbância e determinação da hemólise na presença das amostras.

4.4.9.2 Ação sobre o dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

Foram avaliadas, da mesma forma, as ações das amostras de FH e NC-PCL-PEG, nas concentrações de 0,2 a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, na presença de AAPH (25 mM), em suspensão de eritrócitos 5%.

Os procedimentos descritos nos ensaios de toxicidade e ação sobre o estresse oxidativo em eritrócitos foram realizados, também, em tubos contendo a suspensão de eritrócitos na presença e ausência do AAPH, utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob nº do parecer: 1.795.644 e CAAE: 61037916.9.0000.0105.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DO FERULATO DE HEXADECILA

O FH foi obtido como um pó branco ou quase branco (*off-white*) pelo método de esterificação empregado.

5.1.1 Purificação do ferulato de hexadecila

Foi possível observar, ainda na coluna, a formação de duas bandas, sugerindo a separação do produto desejado nas proporções de eluente 80:20 (hexano:acetato de etila). O primeiro composto a eluir (ferulato de hexadecila) foi detectado pela visualização direta por UV e posteriormente, a partir do acompanhamento da CC por CCD, verificou-se que ele apresentou fator de retenção ($R_f = 0,69$) distinto do segundo composto eluído ($R_f = 0,11$).

Após a evaporação dos solventes, o ferulato de hexadecila foi identificado como um pó branco ou quase branco, enquanto o segundo componente apresentou uma coloração amarelada.

5.1.2 Rendimento da reação de esterificação

Ao final da síntese foi obtido 3,110 g de ferulato de hexadecila, conferindo um rendimento de 76,77%. Esse rendimento está em conformidade com o relatado na literatura para o método de esterificação utilizado (NEISES e STEGLICH, 1978). Bernards e Lewis (1992) obtiveram rendimentos inferiores a 25% utilizando apenas o DCC e rendimentos máximos de 66% utilizando um ácido lábil como forma de proteção, do grupo hidroxila livre do ácido ferúlico, antes da adição do DCC. Outro estudo, que realizou a esterificação do ácido ferúlico por meio de biocatalizadores, obteve rendimentos entre 44 e 56% (CHIGORIMBO-MUREFU *et al.*, 2009). Estes resultados reforçam a eficiência do método de esterificação e a favorável utilização do DMAP como agente catalítico.

5.1.3 Caracterização do ferulato de hexadecila

A caracterização estrutural foi realizada por IVTF e RMN de ^{13}C e ^1H comparados com dados da literatura. Alguns sinais observados nos espectros foram fundamentais para a caracterização e confirmação da formação do éster. Tais características sugerem a obtenção do produto desejado e são apresentadas nos itens que se seguem.

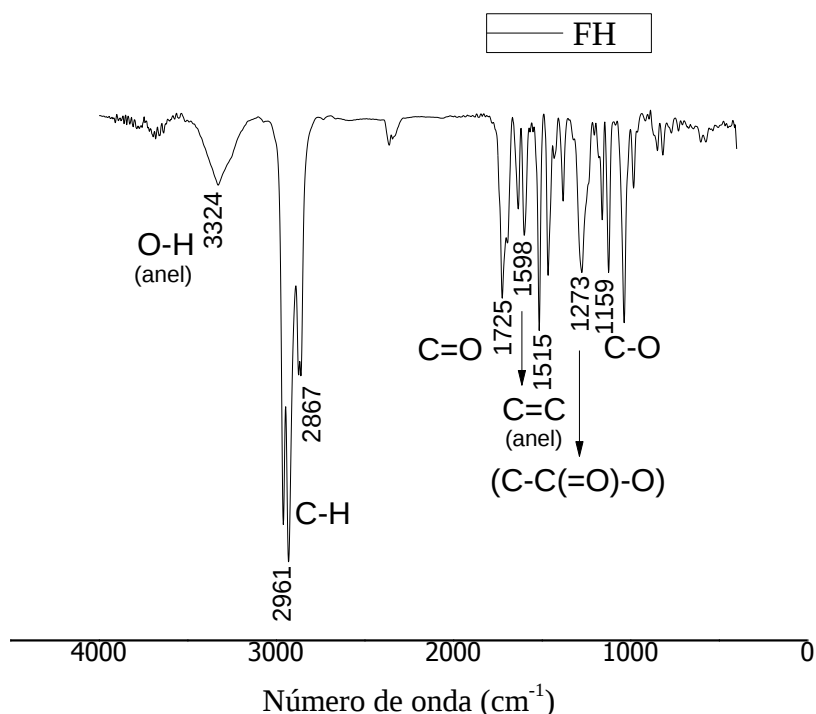
Também, foi possível constatar uma alteração da solubilidade dos produtos de reação. Observou-se que o produto sintetizado apresenta um caráter mais apolar, em relação aos produtos de partida, que são mais solúveis em solventes polares. Essa verificação passa a ser outro indício da efetividade da reação de esterificação.

5.1.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que fornece informações sobre os grupos funcionais de moléculas. A partir da análise e da comparação dos espectros de IVTF dos produtos de partida e do produto da reação foi possível avaliar a efetividade da reação. As análises foram realizadas em pastilhas de KBr, de 4000 a 400 cm^{-1} no equipamento Bio-Rad Laboratories, Excalibur Series (FTS 3500GX), com 32 scans/min e resolução de 2 cm^{-1} .

O espectro de IVTF do FH, representado na Figura 7, apresentou bandas típicas de grupamento éster. Seu espectro pode ser comparado aos espectros do AF e AC (Figura 8).

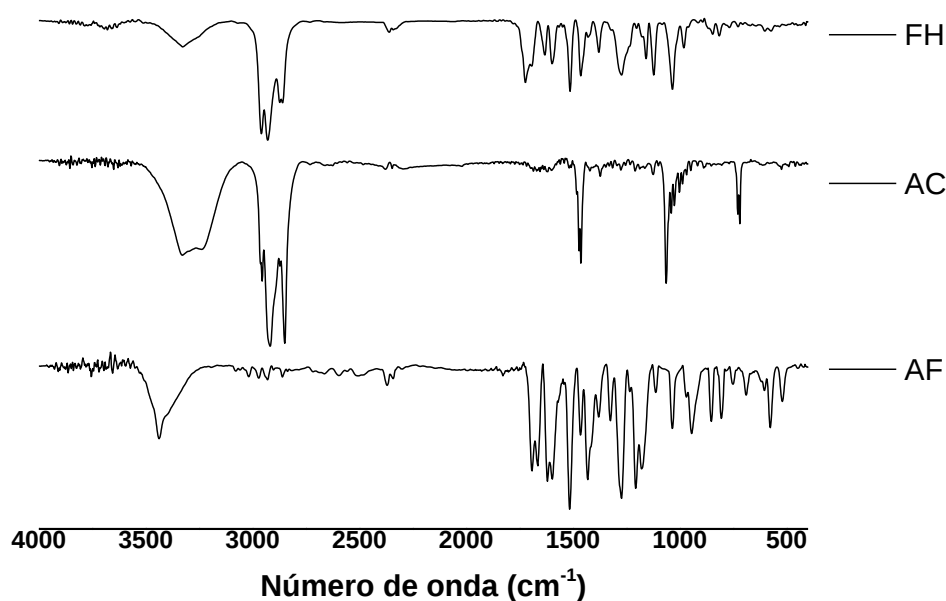
FIGURA 7: ESPECTRO IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA



A presença de uma banda de absorção típica em 1725 cm^{-1} (nC=O), associada à absorção 1159 cm^{-1} (nC-O), são indicativas da função éster e não são observados nos espectros do AC e do AF. A absorção do estiramento C-O e a presença de banda larga de absorção em 3324 cm^{-1} (nO-H) permite assinalar que a substância tem função mista éster e fenol. A absorção em 2961 e 2867 cm^{-1} são característica do estiramento C-H de compostos saturados, observado também no espectro do AC, referente à cadeia alquílica. As absorções em 1273 e 1250 cm^{-1} correspondem ao alongamento de insaturação do éster (C-C(=O)-O), sinais não observados nos espectros do AC e do AF. As absorções em 1598 e 1515 cm^{-1}

($\text{nC}=\text{C},\text{ArH}$) confirmam a presença de estrutura aromática e as ligações C-H do anel aromático são confirmadas em 817 e 845 cm^{-1} .

FIGURA 8: ESPECTROS IVTF DO ÁCIDO FERÚLICO, ÁLCOOL CETÍLICO E FERULATO DE HEXADECILA



Esses resultados foram confirmados com o auxílio dos dados fornecidos pelos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono.

5.1.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a elucidação estrutural do FH, os espectros RMN foram registrados em equipamento BRUCKER AVANCE DRX-400 operando a 9,4 T, observando ^1H em 400,13 e ^{13}C em 100,61. Foi utilizado o sinal de deslocamento de TMS como referencial interno ($\delta = 0$ ppm).

O espectrômetro é equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa de 5 mm com gradiente z (experimentos 2D) e sonda multinuclear de detecção direta de 5 mm (espectros ^1H e ^{13}C). Foi utilizado solvente CDCl_3 deuterado para diluição das amostras.

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H confirmaram a estrutura química do ferulato de hexadecila. Baseado em suas características estruturais os sinais podem ser divididos em dois grupos: um correspondente à porção aromática da molécula (ferulato) e outro correspondente

à porção alifática (cetífica). Os prótons das duas porções são ressonantes em diferentes áreas de deslocamento químico. Particularmente a porção aromática é ressonante em campos altos (aproximadamente 6,5 a 7,5 ppm) e a porção alifática em campos baixos (0,5 a 2,5 ppm) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

O espectro de ^1H para a amostra analisada, representado na Figura 9, apresentou sinais de deslocamento químico entre 6,31 e 7,63 ppm que correspondem aos prótons do anel, sendo três aromáticos em 7,08, 7,05 e 6,93 ppm, apresentou o sinal em 3,8 ppm correspondente ao grupo metoxi do anel. Também apresentou sinal de deslocamento em 4,20 ppm referente aos hidrogênios do primeiro carbono da cadeia alquílica do éster, sinal não observado nos espectros de ^1H do ácido ferúlico e do álcool cetílico, além dos demais sinais de deslocamento químico entre 0,9 e 1,72 ppm referentes aos demais hidrogênios da cadeia alquílica. A Tabela 2 relaciona os hidrogênios da molécula com seus respectivos deslocamentos, que estão de acordo com o reportado na literatura para esta molécula (KAWASAKI *et al.*, 1992; KIEWLICZ *et al.*, 2015). Os deslocamentos do espectro de RMN de ^{13}C de podem ser observados na Figura 10.

TABELA 2: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DO FERULATO DE HEXADECILA

CARBONOS*	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^c$	$^1\text{H}^a$	$^1\text{H}^b$	$^1\text{H}^c$
1	146,76	146,728	—		

2	147,9	147,871	—		
3	109,3	109,247	7,08	7,07	
4	127,05	126,989	—		
5	123,04	123,006	7,05	7,04	7,028
6	115,67	115,594	6,94	6,91	6,923
7	144,63	144,623	7,63	7,7	
8	114,71	114,678	6,29	6,28	
9	167,39	167,399	—		
10	64,62	64,599	4,22		4,187
11	26,01	25,969	1,72	1,5-1,8	1,676
12	25,74	25,868	1,59		
13	29,7	30,48			
14	29,66	29,668			
15	29,62	29,629			
16	29,61	29,571			
17	29,55	29,519			
18	29,44	29,334	1,32	1,1-1,4	1,255
19	29,37	29,279			
20	29,31	28,736			
21	28,78	28,593			
22	31,93	31,731			
23	32,81	31,897			
24	22,7	22,665			
25	14,12	14,094	0,88	0,88	0,895
26	55,93	55,874	3,95	3,93	3,873

^aMedidas realizadas observando-se os núcleos ¹H a 400,13 MHz e ¹³C a 100,61MHz, CDCl₃, ppm;
^b Kawasaki *et al.* (1992); ^c Kiewlicz *et al.* (2015)

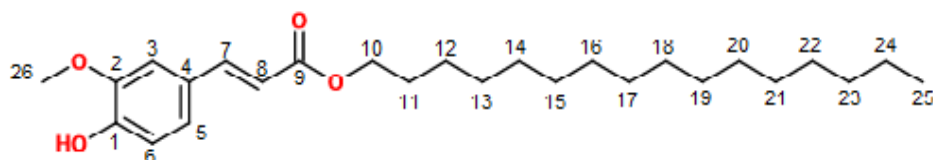
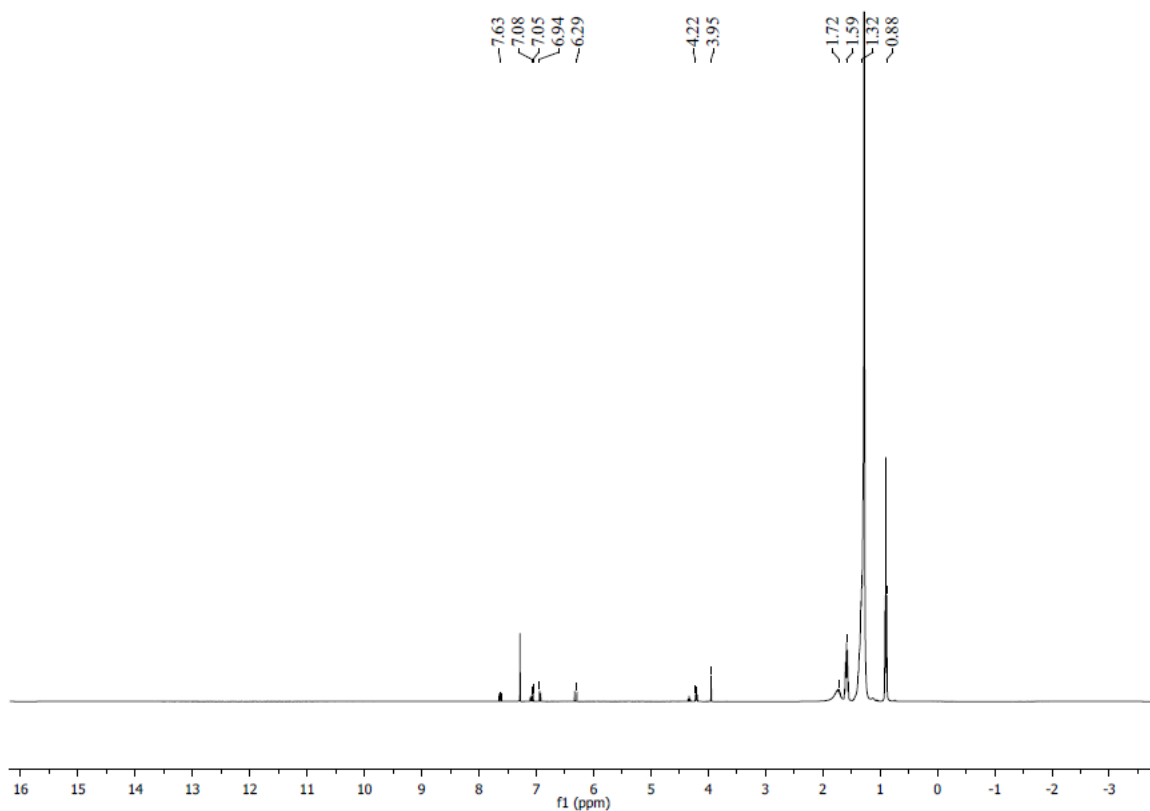
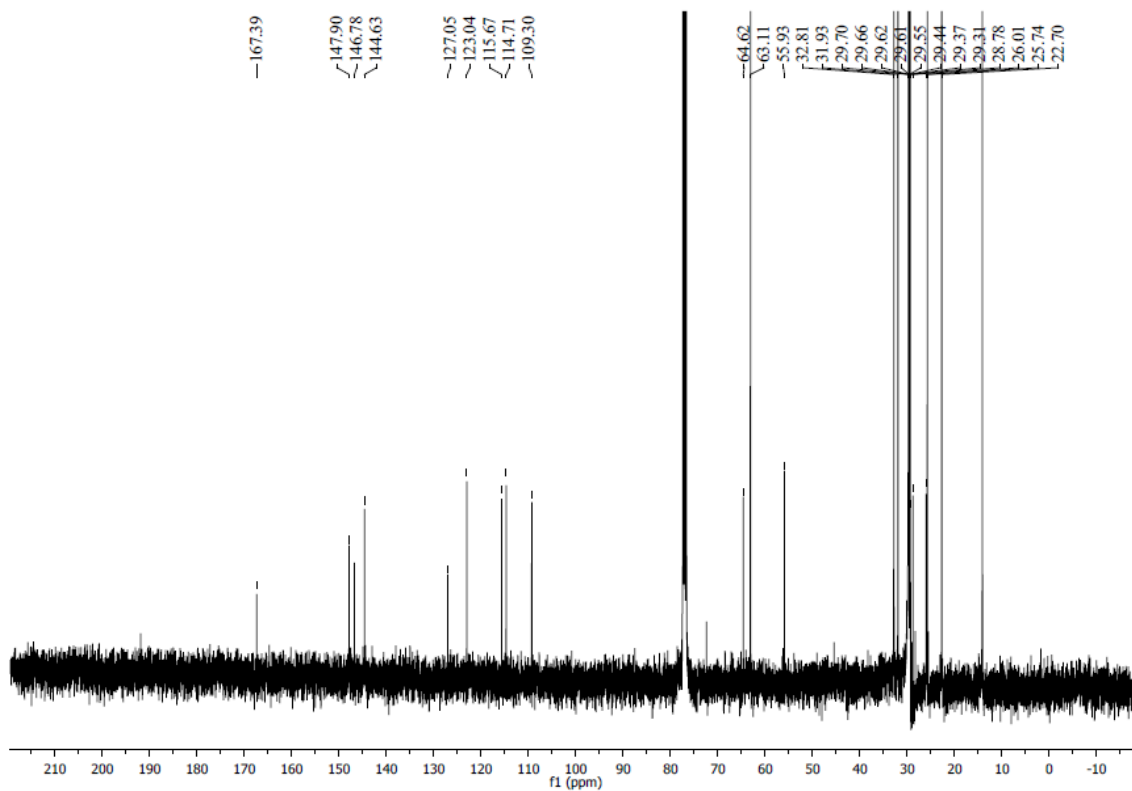


FIGURA 9: ESPECTRO RMN ¹H DO FERULATO DE HEXADECILA



Medidas realizadas observando-se os núcleos ^1H a 400,13 MHz, CDCl_3 , ppm

FIGURA 10 : ESPECTRO RMN ^{13}C DO FERULATO DE HEXADECILA



Medidas realizadas observando-se os núcleos ^{13}C a 100,61MHz, CDCl_3 , ppm

5.1.4 Perfil da ação sobre radicais livres e espécies reativas de oxigênio

5.1.4.1 Ação scavenger sobre o DPPH•

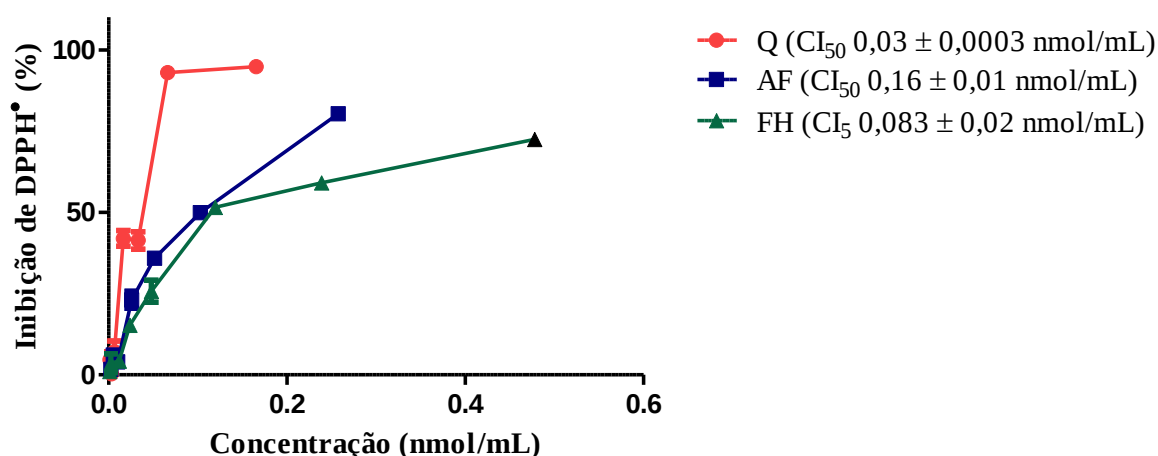
O DPPH• é um radical estável muito usado em ensaios antioxidantes na área de produtos naturais (*screening* em química orgânica).

O ferulato de hexadecila mostrou-se eficaz na captura deste radical (Figura 11), alcançando atividade *scavenger* máxima de $72,50 \pm 1,66$ % ($0,48$ nmol/mL; $CI_{50} = 0,083 \pm 0,009$ nmol/mL), enquanto o ácido ferúlico atingiu a atividade máxima de $80,3 \pm 1,29$ % ($0,26$ nmol/mL; $CI_{50} = 0,16 \pm 0,01$ nmol/mL). Embora o FH tenha atingido, neste ensaio, atividade antioxidante máxima inferior à apresentada pelo AF, apresentou maior potencial antioxidante, necessitando de concentrações menores para inibir 50 % do radical.

Anselmi *et al.* (2004) investigaram a atividade scavenger do ácido ferúlico e seus ésteres alquílicos sobre o DPPH• e reportaram não haver diferença estatística significativa entre suas atividades.

Como padrão antioxidante utilizou-se a quercetina, flavonóide conhecido por sua forte atividade antioxidante e excepcional ação *scavenger* (D'ANDREA, 2015). Neste ensaio a quercetina apresentou $CI_{50} = 0,03 \pm 0,0003$ μ mol/mL e atingiu sua capacidade máxima de $94,82 \pm 0,09$ % ($0,07$ nmol/mL).

FIGURA 11: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O RADICAL DPPH•



▲ Inibição máxima determinada após análise estatística (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$)

DPPH 60 μ M em etanol absoluto; $\lambda = 531$ nm.

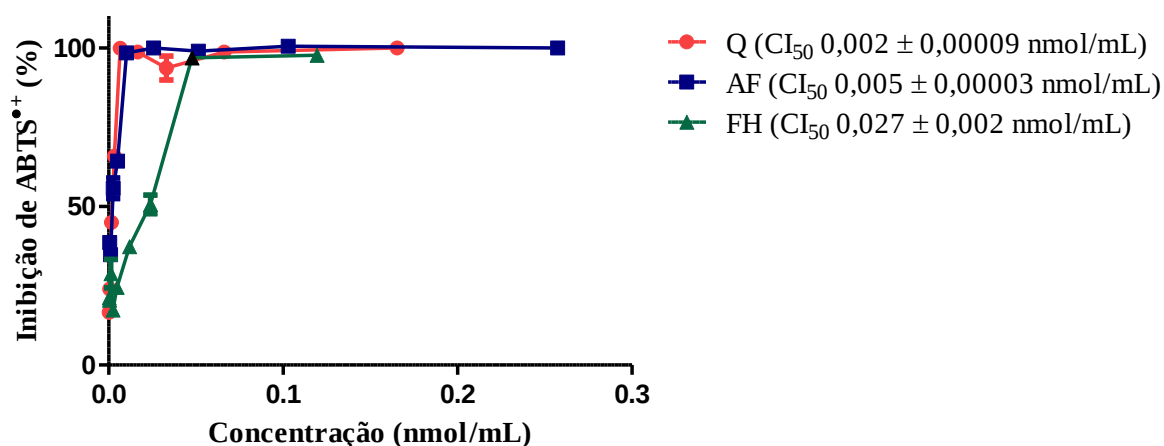
5.1.4.2 Ação scavenger sobre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$

O radical catiônico do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é muito utilizado para avaliar as habilidades dos agentes fenólicos como captadores de radicais (RE *et al.*, 1999)

Neste ensaio, o ferulato de hexadecila promoveu $99,74 \pm 4,68 \%$ (0,05 nmol/mL) de captura do radical, enquanto o ácido ferúlico atingiu $98,41 \pm 0,53 \%$ (0,01 nmol/mL) de atividade *scavenger*. O FH mostrou-se eficaz na captura deste radical ($\text{CI}_{50} = 0,03 \pm 0,002$ nmol/mL), assim como o ácido ferúlico ($\text{CI}_{50} = 0,005 \pm 0,00003$ nmol/mL), demonstrando sua alta capacidade antioxidante.

Como padrão antioxidante utilizou-se a quercetina, que apresentou CI_{50} de $0,002 \pm 0,00009$ nmol/mL e promoveu $98,66 \pm 0,33 \%$ na concentração de 0,007 nmol/mL (Figura 12).

FIGURA 12: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O RADICAL $\text{ABTS}^{\bullet+}$



▲ Inibição máxima determinada após análise estatística (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$)

$\text{ABTS}^{\bullet+}$ (55 μM) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4; $\lambda = 734$ nm

Menezes *et al.* (2011) avaliaram a atividade de dois ésteres derivados do ácido ferúlico, com cadeia alquílica de 14 e 18 carbonos, sobre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Assim como nos resultados aqui obtidos, eles observaram um decréscimo na atividade desses derivados, mas não foi considerado que a esterificação alterou de forma significativa a atividade antioxidante.

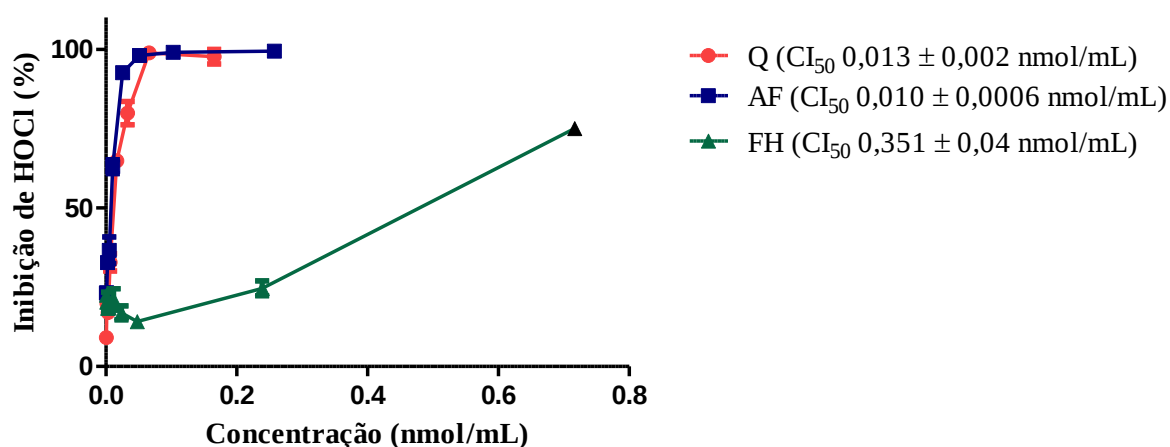
5.1.4.3 Ação scavenger sobre o HOCl

HOCl não é um radical livre, porém está relacionado à formação de espécies radicalares por meio de reações com compostos inorgânicos, lipídeos, proteínas, hidratos de carbono e outros biopolímeros, além de ser considerado um forte oxidante (PANASENKO *et al.*, 2013).

Neste ensaio os resultados são expressos em % (porcentagem) da inibição de oxidação da tetrametilbenzidina (TMB), pois esta molécula também é oxidada pelo HOCl presente no meio reacional e o aumento da absorbância é diretamente proporcional ao aumento desta oxidação. A inibição máxima alcançada pelo ferulato de hexadecila foi de $75 \pm 1,63\%$ ($0,72 \text{ nmol/mL}$; $CI_{50} = 0,35 \pm 0,04 \text{ nmol/mL}$), pelo ácido ferúlico foi de $92,62 \pm 0,46\%$ ($0,03 \text{ nmol/mL}$; $CI_{50} = 0,01 \pm 0,0006 \text{ nmol/mL}$) e pelo padrão quercetina foi de $98,84 \pm 1,17\%$ ($CI_{50} = 0,01 \pm 0,002 \text{ nmol/mL}$).

Não foram encontrados estudos avaliando a atividade do ácido ferúlico e comparando com seus derivados frente ao HOCl. Rosso *et al.* (2006) compararam a atividade do ácido gálico com a de seus ésteres de cadeia alquílica e obteve resultados semelhantes. Embora com um decréscimo na atividade *scavenger* dos ésteres em relação ao seu precursor, todos se apresentaram capazes de realizar esta atividade.

FIGURA 13: AÇÃO SCAVENGER DO FERULATO DE HEXADECILA, ÁCIDO FERÚLICO E QUERCETINA SOBRE O HOCl



▲ Inibição máxima determinada após análise estatística (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$)

HOCl ($30 \mu\text{M}$), em tampão fosfato de sódio 50 nM , $\lambda = 652 \text{ nm}$

O perfil da ação sobre radicais livres e espécies reativas de oxigênio verificado para o FH no presente estudo, com decréscimo da atividade em relação ao AF, pode estar relacionado à sua baixa solubilidade em meio aquoso, meio em que os ensaios são realizados.

5.2 OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

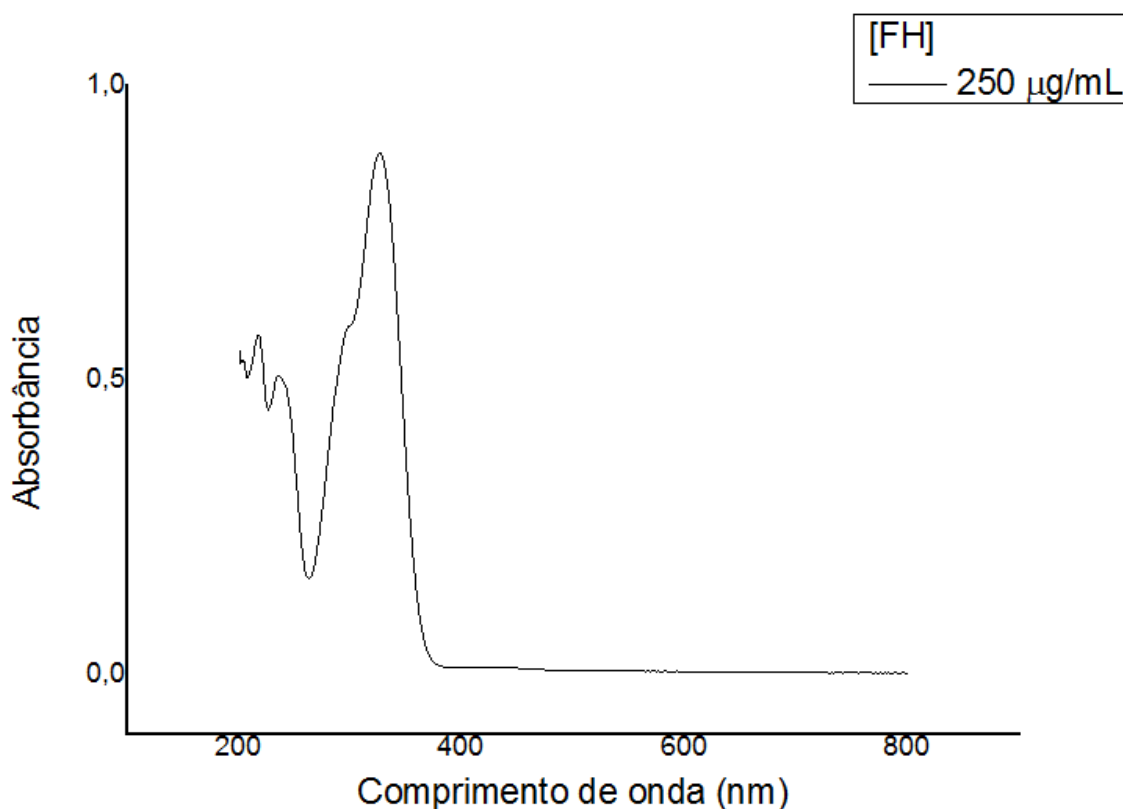
5.2.1 Avaliação macroscópica

As suspensões de nanocápsulas poliméricas obtidas apresentaram-se macroscopicamente como um líquido homogêneo, sem odor, de aspecto leitoso e opalescente com reflexo azulado, relacionado ao movimento browniano das estruturas coloidais (efeito Tyndall), em acordo com os resultados previamente relatados para outros sistemas nanoparticulados de núcleo lipídico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

5.2.2 Desenvolvimento e validação do método para quantificação de FH

O espectro de absorção do FH evidenciou uma banda de máxima absorção no comprimento de onda 327 nm, como mostra a Figura 14.

FIGURA 14: ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA NA REGIÃO DO UV-VIS



A linearidade do método foi avaliada por meio de cinco níveis de concentração: 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a construção da curva analítica, demonstrada na Figura 15, utilizou-se o comprimento de onda de absorção máxima para o FH, 327 nm.

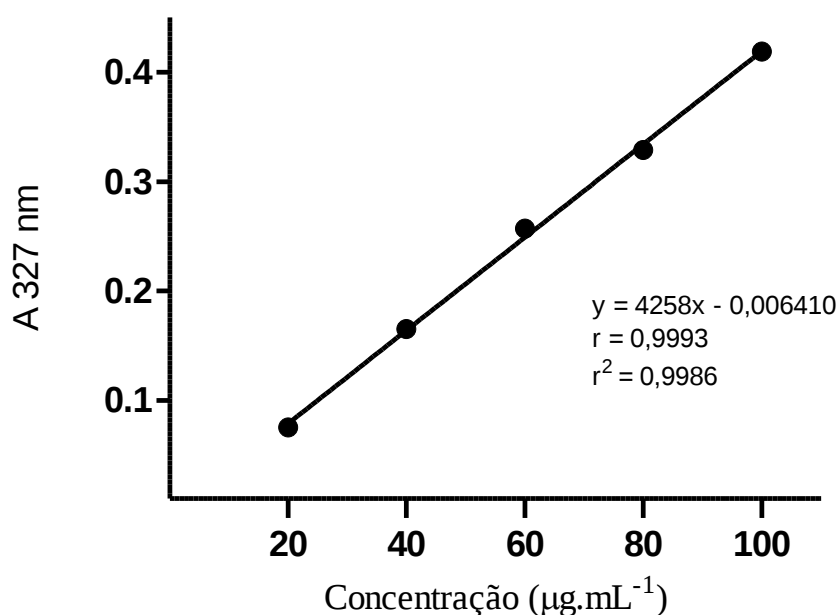
Foi observada relação linear entre a absorbância e a concentração de FH em uma faixa de concentração de 20,0 a 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação da reta, representativa de linearidade, obtida para o método foi $y = 4258x - 0,006410$ ($n = 3$, $r = 0,9993$). As curvas foram lineares no intervalo de concentrações utilizado.

O DPR da inclinação foi de 3%, estando de acordo com o limite proposto pelo ICH e pela ANVISA de até 5%. O valor negativo de b está dentro do intervalo de confiança de 95% da curva analítica, pelo teste ANOVA.

De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear, e por isso, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Este teste avalia a variação dos valores residuais. Para falta de ajuste, o valor de F foi menor que o valor de F tabelado, para o

intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste.

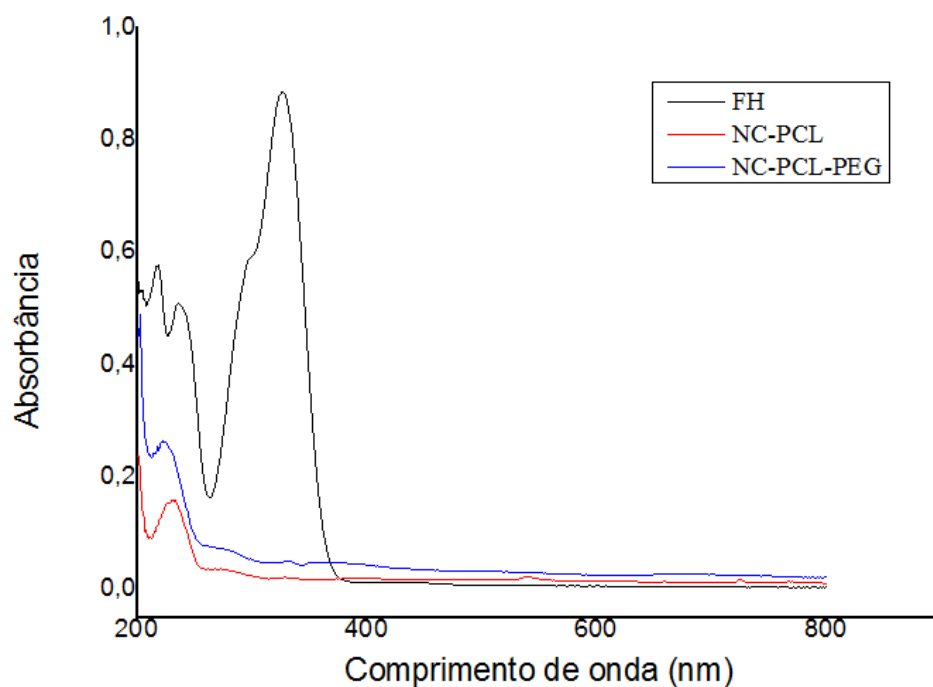
FIGURA 15: CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA



O resultado dos cálculos para a menor concentração detectada (LD) e quantificada (LQ) de FH, com aceitável precisão e exatidão, foi 0,34 e 1,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, indicando uma boa sensibilidade do método de determinação.

Especificidade é a habilidade de um método analítico diferenciar e quantificar o analito em presença de impurezas ou outros componentes na amostra (ICH, 2005). A especificidade em relação às nanocápsulas foi demonstrada por comparação dos espectros de absorção do FH e das nanocápsulas poliméricas com PCL e blends PCL-PEG (Figura 16). Os resultados mostram diferentes bandas de absorção máxima. Sendo assim, é possível confirmar a especificidade do método proposto para a quantificação do FH.

FIGURA 16: ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO FERULATO DE HEXADECILA, NC-PCL E NC-PCL-PEG



A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de uma substância quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas alíquotas (ICH, 2005). A repetibilidade expressa precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo. Foi avaliada a precisão intermediária, expressa como variação intradia, interdia e com diferentes analistas.

O DPR para repetibilidade nas concentrações 25, 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram de 0,24; 0,14 e 0,18 %, respectivamente. Quanto à precisão intermediária, os valores de DPR foram de 0,14; 0,10 e 0,16 % para intradia, interdia e segundo analista, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 3, confirmando a precisão do método desenvolvido.

TABELA 3: DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)			
	25	$24,87 \pm 0,06$	0,24
	50	$49,83 \pm 0,07$	0,14
	70	$69,53 \pm 0,13$	0,18
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)	50	$49,82 \pm 0,07$	0,14
Interdia (n = 3)	50	$49,87 \pm 0,05$	0,10
Diferentes analistas (n = 3)	50	$49,83 \pm 0,08$	0,16
Média $\pm$ DP* (n = 9)	50	$49,84 \pm 0,02$	0,04

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade exata de FH a uma solução de concentração conhecida. A % média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram $100,08 \pm 0,48$ e 0,48 %, respectivamente. Portanto, estes resultados indicam que o método proposto é considerado exato.

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua confiabilidade em condições normais de uso (ICH, 2005). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando utilizadas diferentes cubetas ou solventes de diferentes fabricantes. Os resultados das medidas de concentração da amostra não foram afetados ao serem realizados em diferentes comprimentos de onda (325 e 329 nm) quando comparados ao comprimento de onda escolhido para o método (327 nm). Portanto, o método provou ser robusto sob as condições avaliadas.

5.2.3 Determinação do FH incorporado e avaliação da eficiência de encapsulação

Os resultados da concentração do FH incorporado às nanocápsulas (mg.mL^{-1}) e da eficiência de encapsulação (%) para as formulações estão resumidos na Tabela 4. As formulações apresentaram valores de concentrações de FH muito próximos aos teóricos, indicando que não houve perda durante seu preparo. Além disso, todas as formulações apresentaram valores de EE superiores a 99,36%, o que está relacionado à baixa solubilidade do FH em água, resultando no aumento da concentração do fármaco incorporada à nanopartícula.

TABELA 4: TEOR DE FERULATO DE HEXADECILA ENCAPSULADO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Amostras	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FH encapsulado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	EE (%)
NC-PCL (1) ¹	1000	998,92 $\pm$ 0,23	99,89
NC-PCL (2) ¹	2000	1997,44 $\pm$ 0,51	99,87
NC-PCL-PEG (1) ²	1000	993,69 $\pm$ 0,31	99,36
NC-PCL-PEG (2) ²	2000	1995,48 $\pm$ 0,12	99,77

¹nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona);²nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com polietilenoglicol

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As concentrações utilizadas do fármaco variaram de 0 a 2,0 mg.mL⁻¹ e não interferiram nos parâmetros avaliados para as suspensões de nanocápsulas de PCL e blends de PCL-PEG.

Os resultados obtidos de pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

Amostras	FH (mg.mL ⁻¹)	Ph	Tamanho de partícula (nm)	IPD	PZ (mV)
NC-PCL (0) ¹	—	5,75 $\pm$ 0,18	217,03 $\pm$ 4,86	0,25 $\pm$ 0,02	- 38,43
NC-PCL (1) ²	1	5,99 $\pm$ 0,20	217,77 $\pm$ 2,95	0,26 $\pm$ 0,02	- 38,60
NC-PCL (2) ²	2	6,14 $\pm$ 0,16	228,73 $\pm$ 1,61	0,25 $\pm$ 0,03	- 38,60
NC-PCL-PEG (0) ¹	—	5,86 $\pm$ 0,08	223,27 $\pm$ 2,25	0,25 $\pm$ 0,03	- 35,93
NC-PCL-PEG (1) ³	1	6,00 $\pm$ 0,09	225,03 $\pm$ 3,33	0,25 $\pm$ 0,01	- 35,73
NC-PCL-PEG (2) ³	2	6,04 $\pm$ 0,12	233,83 $\pm$ 1,87	0,26 $\pm$ 0,03	- 28,57

¹controle negativo das nanocápsulas poliméricas; ²nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona); ³nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com polietilenoglicol; Valores expressos como média (n=3) $\pm$ erro padrão da média.

5.3.1 Determinação do pH

O pH apresentou valores entre 5,75 e 6,04 para todas as formulações. É importante acompanhar o pH das suspensões de nanocápsulas pois a sua alteração em função do tempo pode ser sugestiva de degradação do polímero (GUTERRES *et al.*, 1995). Em geral os valores

de pH estão entre 3,0 e 7,5 quando as suspensões de nanocápsulas são obtidas por meio da nanoprecipitação (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). A composição dos polímeros contribuiu para a obtenção de suspensões de caráter ácido pela presença de seu grupamento carboxílico (DURAN *et al.*, 2006).

5.3.2 Análises morfológicas e de superfície

5.3.2.1 Determinação do tamanho de partícula e potencial Zeta

Todas as formulações preparadas apresentaram partículas com tamanhos adequados, inferiores a 233,83 nm, caracterizando sistemas nanoparticulados eficientes para carregamento de fármacos, uma vez que devem possuir diâmetro menor que 300 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O índice de polidispersão não ultrapassou o valor de 0,26 garantindo homogeneidade da suspensão (AVADI *et al.*, 2010).

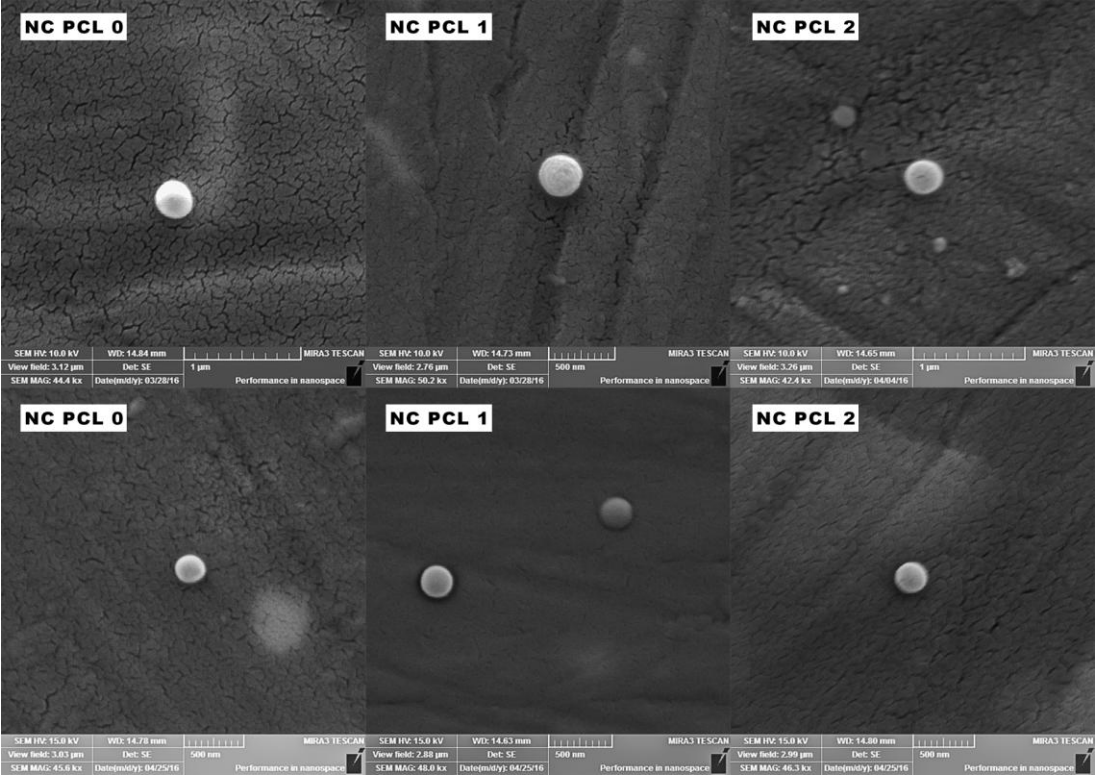
O potencial zeta das nanocápsulas apresentou valores negativos, entre -28,57 e -38,60 mV, que é condizente com a natureza aniônica dos polímeros, sugerindo estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas. Em geral, a estabilidade das partículas é garantida quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de 30 mV, enquanto que valores próximos a 0 e 5,0 mV podem acarretar floculação (NEVES *et al.*, 2013).

Essa característica negativa da superfície das nanocápsulas promove o aumento do seu tempo de permanência no sangue, visto que partículas carregadas positivamente tendem a ser depuradas mais rapidamente da corrente sanguínea e acumuladas nos pulmões e fígado (LI e HUANG, 2008).

5.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV)

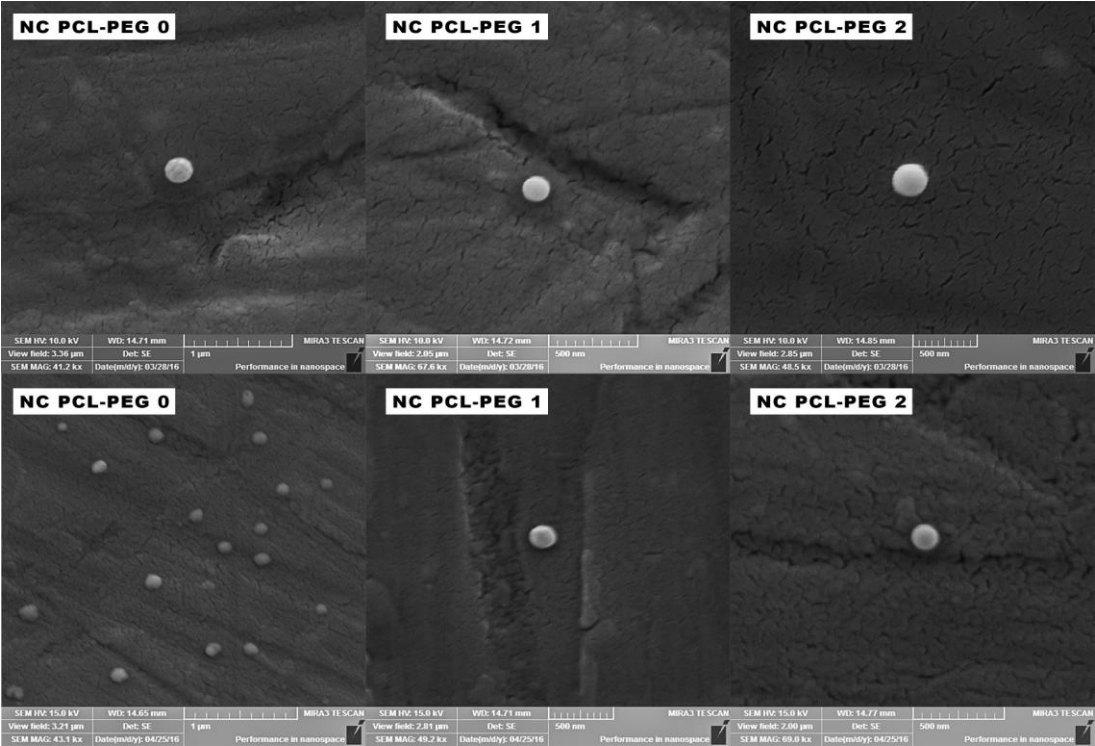
Por meio das fotomicrografias (Figuras 17 e 18) obtidas a partir das suspensões de nanocápsulas poliméricas preparadas, foi possível visualizar a formação de nanopartículas esféricas e de superfície lisa. As nanoestruturas foram similares entre si e compatíveis com os resultados encontrados no método de espectroscopia de correlação de fótons para o tamanho de partícula e índice de polidispersão. Não foram verificadas diferenças na morfologia e superfície das nanocápsulas preparadas com ou sem o FH ou quando associadas aos polímeros (PCL e blenda PCL/PEG).

FIGURA 17: ELETROMICROGRAFIAS MEV DAS NANOPARTÍCULAS PCL



Eletromicrografias obtidas com aumento de 10000X e 15000X para as nanocápsulas de PCL, controle negativo e FH 1 e 2%

FIGURA 18: ELETROMICROGRAFIAS MEV DAS NANOPARTÍCULAS PCL-PEG



Eletromicrografias obtidas com aumento de 10000X e 15000X para as nanocápsulas de PCL-PEG, controle negativo e FH 1 e 2%

5.3.2.3 Análise por difração de raios X (DRX)

As interações do fármaco e do polímero em um sistema nanoestruturado, bem como o estado físico da formulação desempenham função importante no controle da liberação de fármacos (LIECHTY *et al.*, 2010).

A difração de raios X possibilita a identificação do fármaco quanto à sua cristalinidade ou amorfismo, característica que impacta em suas propriedades físico-químicas, farmacêuticas e biofarmacêuticas e que é importante para o seu potencial de solubilidade, a sua velocidade de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade (BROUWERS *et al.*; RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

Substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos, o que não é observado em difratogramas de substâncias amorfas. A ausência de picos de alta intensidade no intervalo de 10° a 40° (Figuras 19 e 20), nos difratogramas das suspensões de nanocápsulas, caracterizam as formulações como amorfas (MURTHY e MINOR, 1990), indicando a formação de um complexo de inclusão entre fármaco e polímeros.

A análise por DRX conduzida no presente estudo confirma o padrão cristalino do FH, conforme mostram as Figuras 19 e 20, os picos de alta intensidade foram registrados nos ângulos de difração em 7,03°, 11,78°, 21,33°, 43,77°.

Fármacos cristalinos, como é o caso do FH, possuem baixa solubilidade aquosa em comparação com a forma amorfa e, por conseguinte baixa biodisponibilidade em meio fisiológico (SENNA e NAKAYAMA, 2009). A maior solubilidade de sólidos amorfos se deve à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de pouca energia para separá-los (BROUWERS *et al.*).

O padrão de difração de raios X do FH foi comparado com os das suspensões de nanocápsulas. As Figuras 19 e 20 demonstram os difratogramas das formulações NC-PCL e NC-PCL-PEG, respectivamente. As amostras das suspensões de nanocápsulas, contendo ou não o FH, exibiram um padrão muito similar entre si, e notadamente diferente do padrão exibido no difratograma do FH.

O desaparecimento dos picos de alta intensidade observados, além de indicarem amorfização do FH, sugere que o fármaco está molecularmente disperso no sistema polimérico.

Portanto, a complexação da PCL, do PEG (semicristalinos) e do FH (cristalino), levou a uma alteração da cristalinidade, que resultou na formação de nanopartículas com caráter amorfo e, portanto, com melhor solubilidade relativa do FH.

FIGURA 19: DIFRATOGRAMA DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM PCL

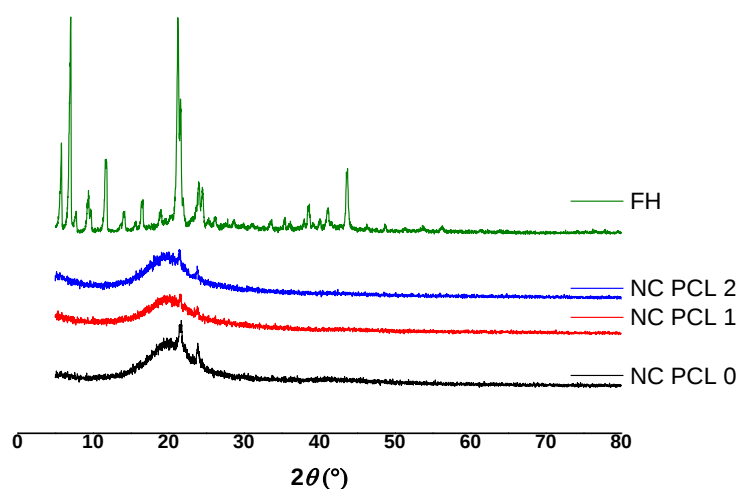
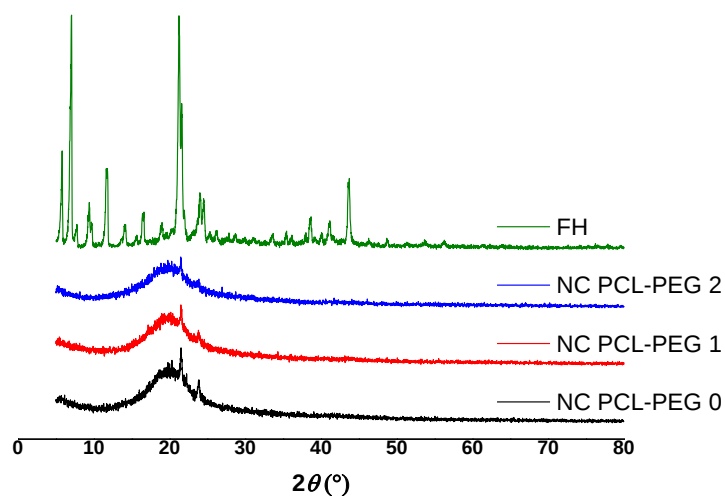


FIGURA 20: DIFRATOGRAMA DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS PREPARADAS COM BLENDA PCL-PEG



5.4 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

A partir dos espectros de IVTF obtidos, pode-se afirmar que não houve nenhuma interação química entre os polímeros e o ativo utilizados durante a formação das nanopartículas, uma vez que os picos característicos foram mantidos no espectro das nanopartículas. Isso garante a atividade do ferulato de hexadecila durante a aplicação do produto obtido.

Os espectros de IVTF comparativo do FH e das suspensões de nanocápsulas poliméricas com PCL e blends PCL-PEG podem ser observados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

FIGURA 21: ESPECTRO DE IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS NANOCÁPSULAS DE PCL

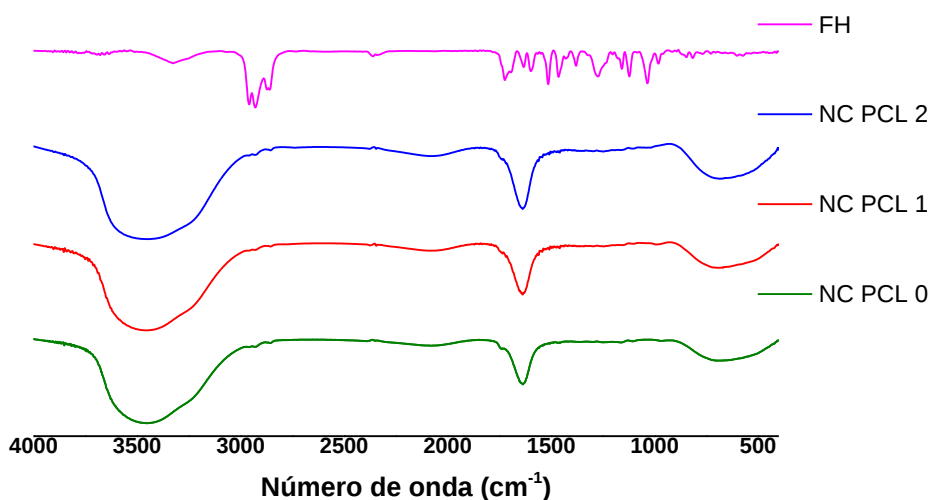
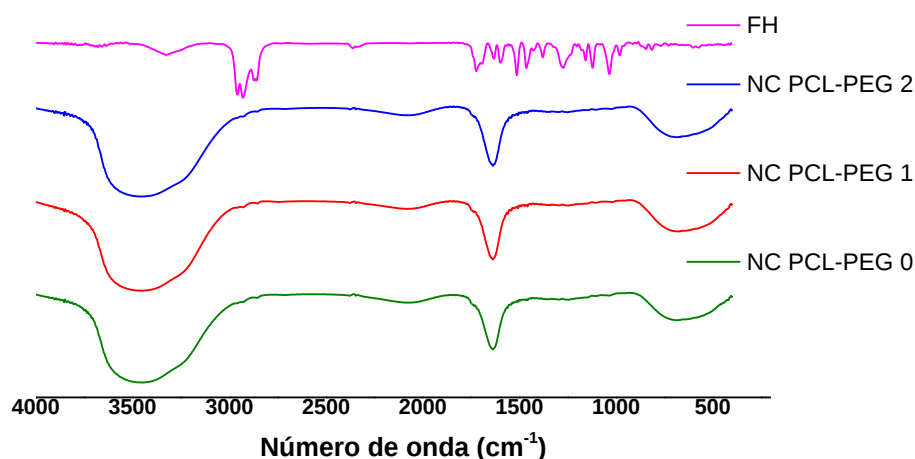


FIGURA 22: ESPECTRO DE IVTF DO FERULATO DE HEXADECILA E DAS NANOCÁPSULAS DE BLENDA PCL-PEG



5.5 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica neste trabalho foi realizada para verificar o comportamento do FH, AF e AC e das nanocápsulas com a elevação gradativa da temperatura, obtendo também dados referentes ao comportamento termo-analítico do FH, que ainda não possui estas características descritas na literatura.

5.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (CED)

A técnica de CED envolve aquecimento da amostra e medida subsequente da temperatura e da energia associadas a uma série de eventos térmicos, incluindo fusão, evaporação, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição. Esta análise foi empregada a fim de avaliar a possível amorfização ou degradação do fármaco decorrente do processo de encapsulação.

A curva de CED do álcool cetílico mostra dois picos endotérmicos, em 68,95 °C e 264,14 °C, atribuídos à fusão e à evaporação desse composto, como relatado por Schnitzler *et al.* (2001). O FH exibiu pico endotérmico em 66,88 °C e o AF em 192 °C, atribuídos à fusão destes compostos, como pode ser observado na Figura 23.

Por esses resultados é possível garantir a estabilidade térmica do ferulato de hexadecila na temperatura necessária para o preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas (aproximadamente 40 °C).

Na Figura 26 podem-se observar os termogramas de CED dos polímeros utilizados nas formulações. Houve um pico endotérmico único para cada um deles, sendo o do PCL em 61,88 °C, e o do PEG em 80,47 °C.

Os termogramas de CED das nanocápsulas (Figuras 24 e 25) apresentaram um único pico endotérmico, em 69,97 °C para as nanocápsulas com PCL e em 69,36 °C para as blendas de PCL-PEG. As temperaturas em que houve o evento endotérmico foram semelhantes à temperatura para o FH puro. A intensidade dos picos aumentou com o aumento da concentração do fármaco na formulação.

FIGURA 23: TERMOGRAMA DE CED DO AF, AC E FERULATO DE HEXADECILA

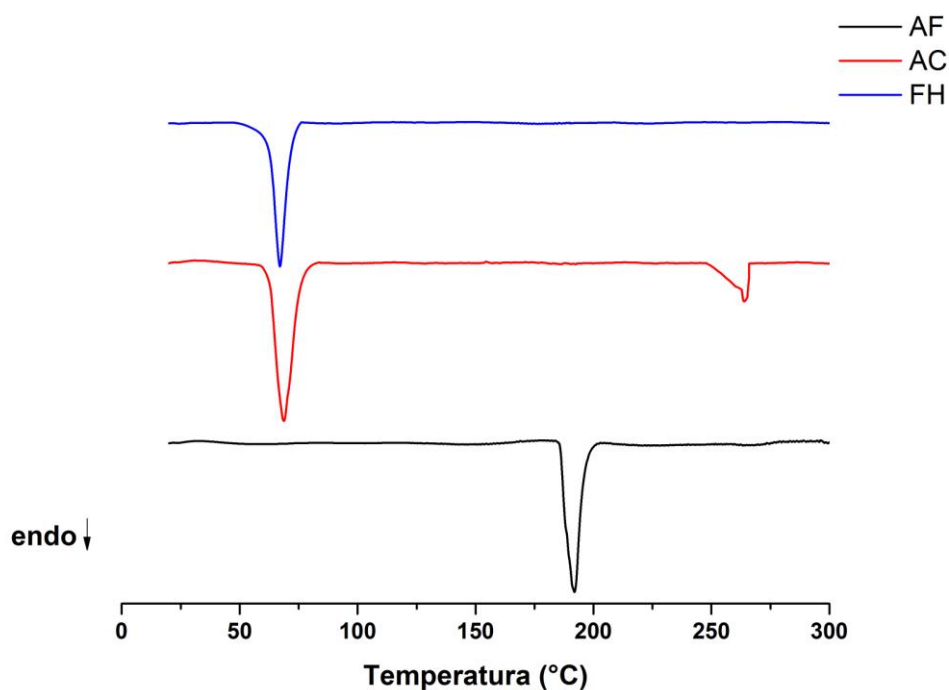


FIGURA 24: TERMOGRAMA DE CED DAS NANOCÁPSULAS COM PCL

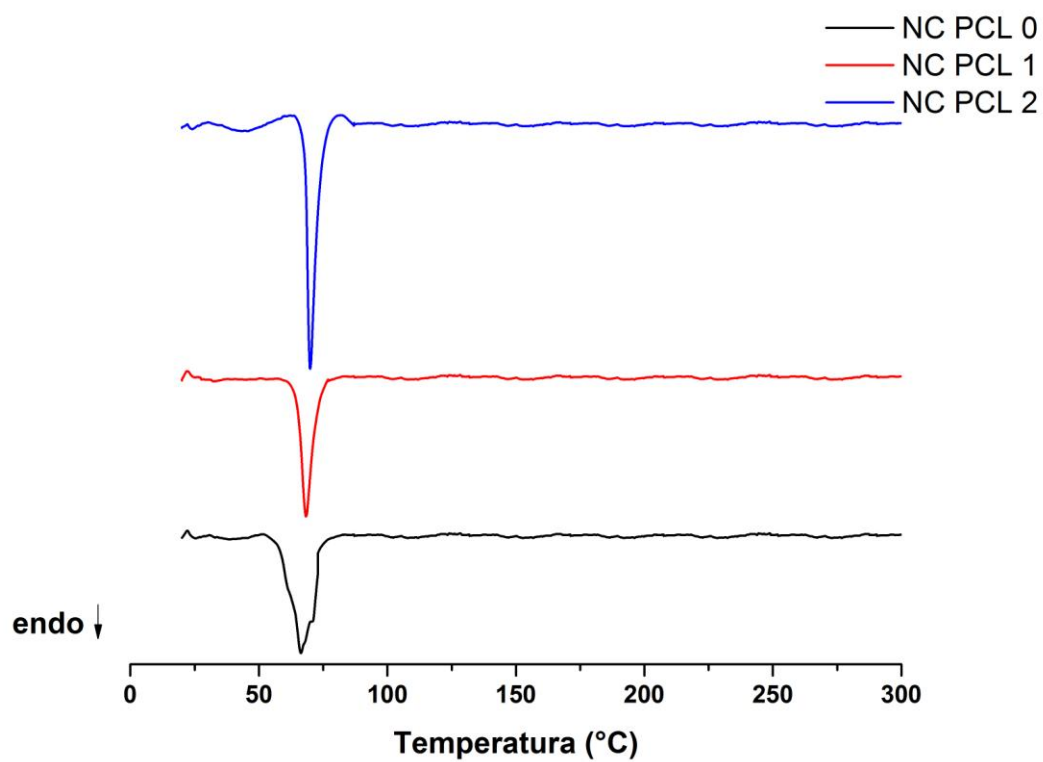


FIGURA 25: TERMOGRAMA DE CED DAS NANOCÁPSULAS COM BLENDAS PCL-PEG

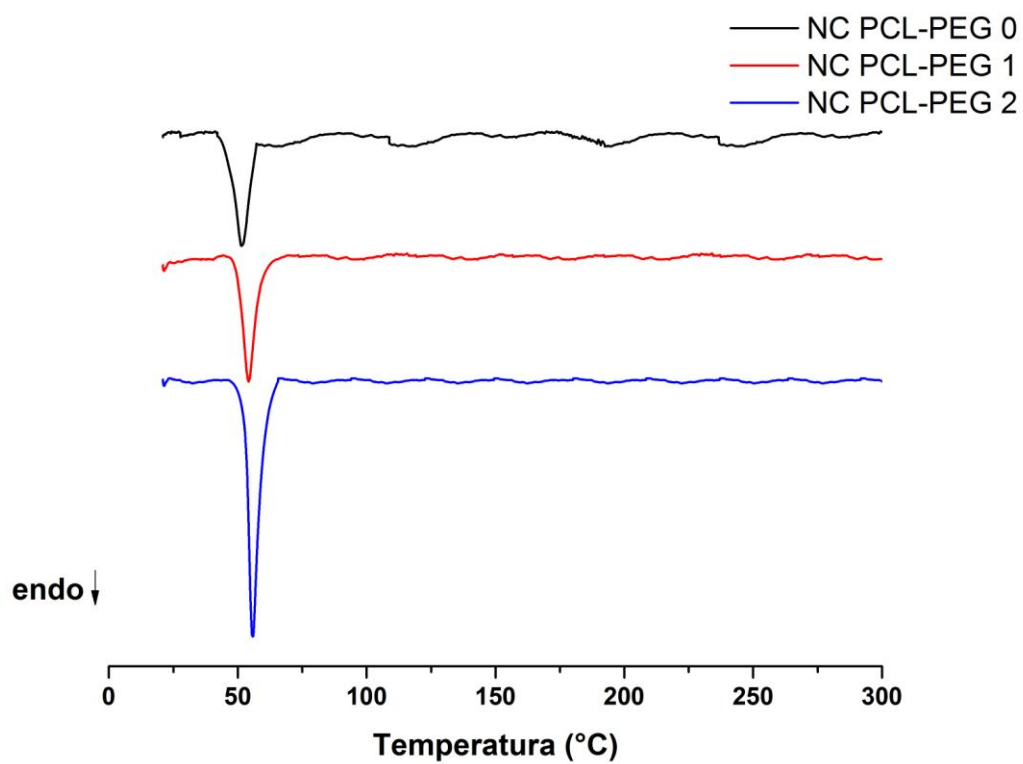
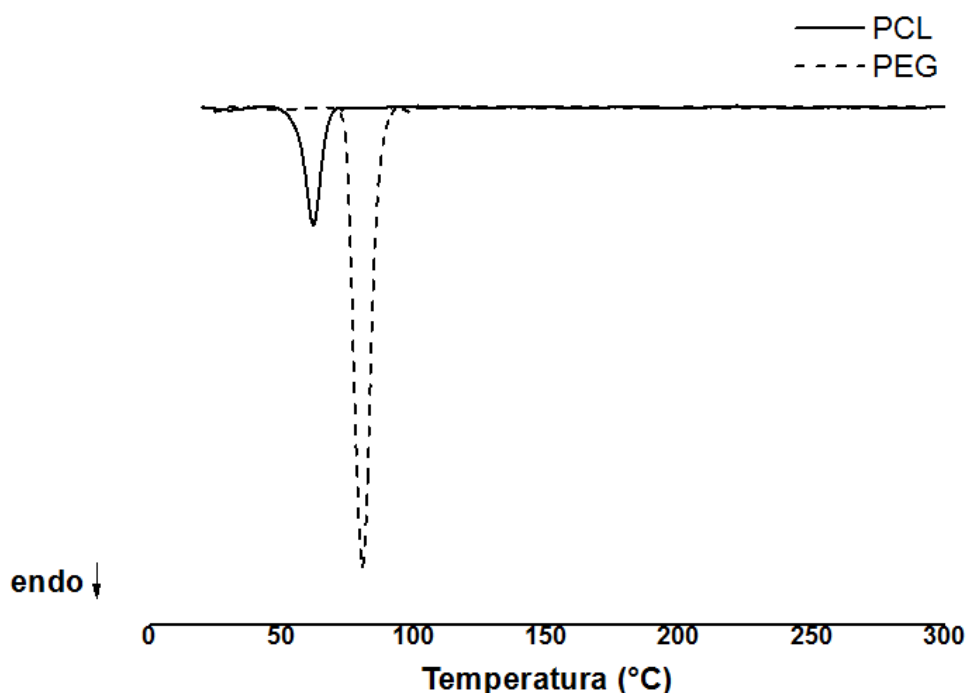


FIGURA 26: TERMOGRAMA DE CED DOS POLÍMEROS PCL E PEG



5.5.2 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar as propriedades térmicas dos materiais e a sua estabilidade, por meio da variação, perda ou ganho de massa em função da temperatura.

A curva termogravimétrica do FH mostrou um processo de decomposição térmica entre 150 e 320 °C, diferente do AF, que ocorreu entre 200 e 390 °C, e do AC, entre 150 e 265 °C (Figura 27). O AF apresenta melhor estabilidade térmica do que o seu derivado FH.

As curvas termogravimétricas das nanocápsulas de PCL e de PCL-PEG (Figuras 28 e 29), apresentaram o mesmo perfil, na presença ou ausência do FH, as temperaturas iniciais de degradação foram semelhantes, em torno de 210 °C e a degradação máxima se deu em 440 °C, suas massas residuais à 600 °C apresentaram uma pequena variação, de 1,7 %. Nenhuma amostra apresentou variação de massa em temperaturas próximas de 110 °C, referente à perda de água, isso se explica pelo fato delas terem sido liofilizadas antes da análise.

A adição do FH não alterou o mecanismo de degradação térmica das nanocápsulas. Quando incorporado nas formulações, o FH apresentou temperatura inicial de degradação maior do que a do FH puro, mostrando os benefícios da formulação para a melhoria da estabilidade térmica do FH. Este fenômeno pode ser explicado pelas características de degradação térmica dos polímeros, que iniciam em elevadas temperaturas (Figura 30).

FIGURA 27: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DO AF, AC E FERULATO DE HEXADECILA

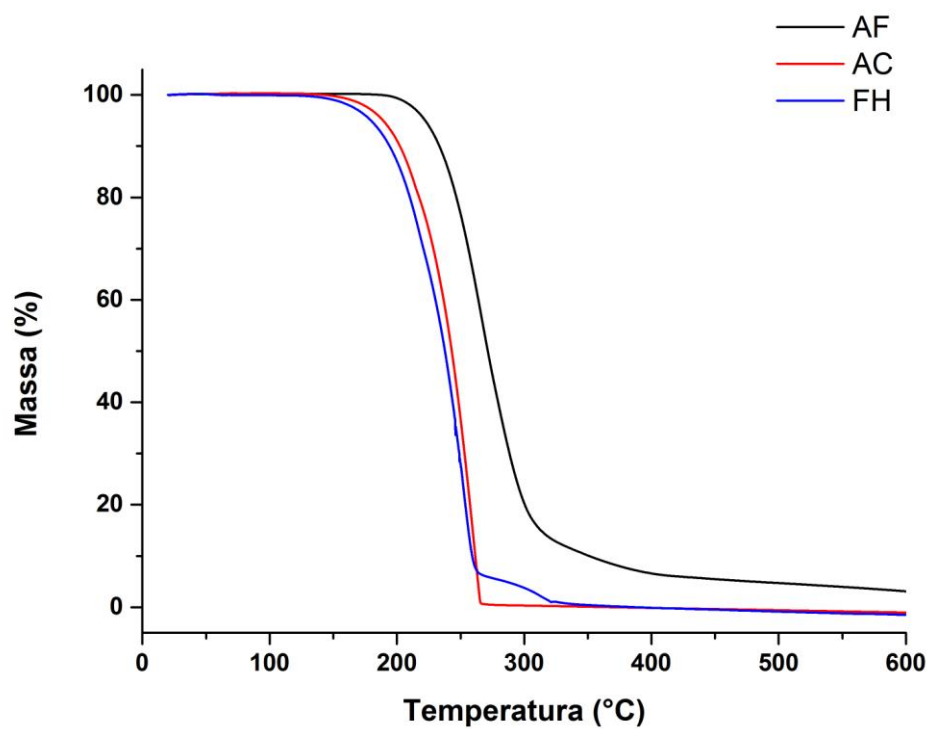


FIGURA 28: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DAS NANOCÁPSULAS COM PCL

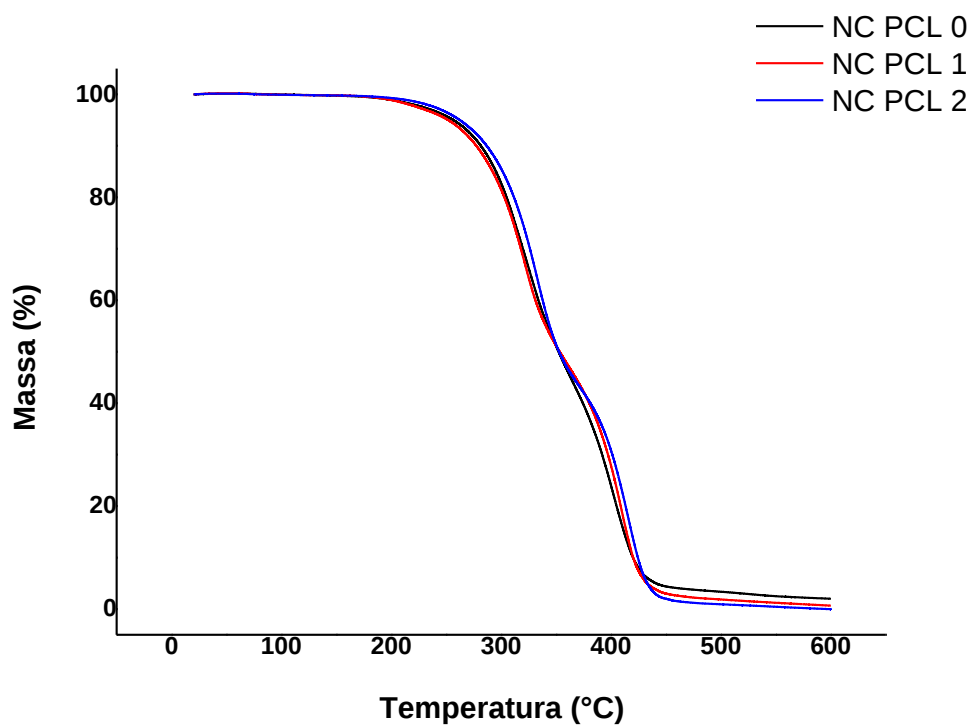


FIGURA 29: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DAS NANOCÁPSULAS COM BLENDA PCL-PEG

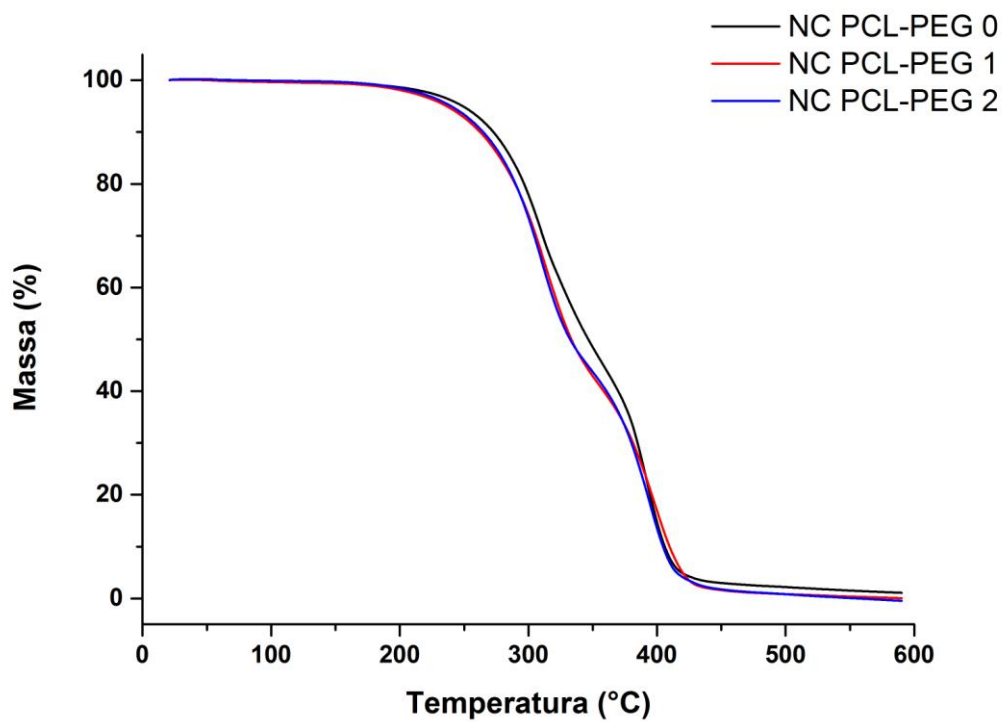
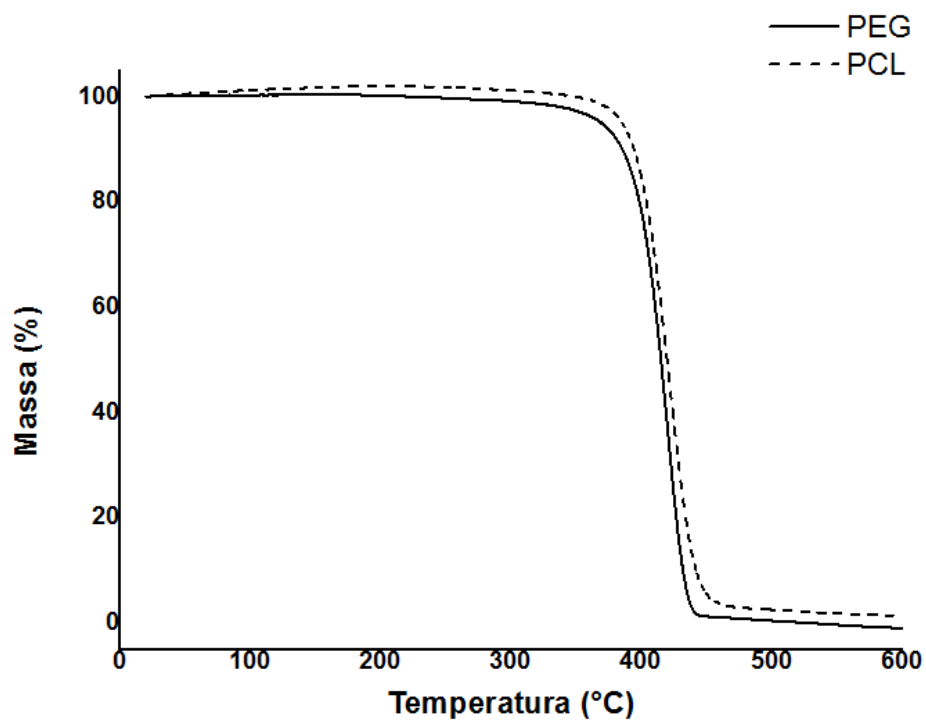


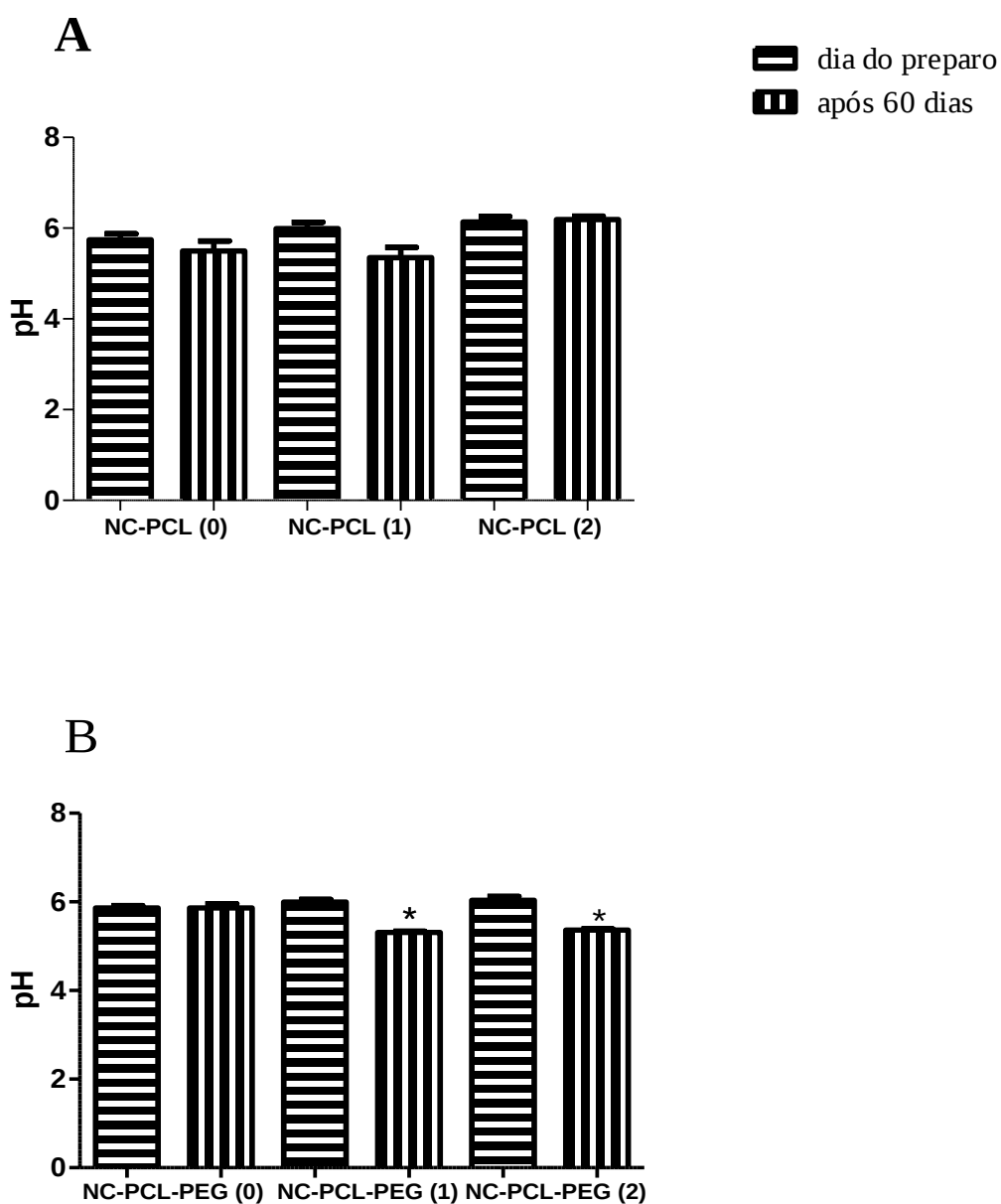
FIGURA 30: CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DOS POLÍMEROS PCL E PEG



5.6 Estudo da estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas

As formulações, mantidas à temperatura ambiente e protegidas da incidência de luz, apresentaram a mesma aparência, sem alteração de cor, cremagem ou formação de precipitado após 60 dias de armazenamento. Os parâmetros de pH e tamanho médio de partícula (nm) foram avaliados para todas as formulações e esquematizados nas Figuras 31 e 32, respectivamente.

FIGURA 31: VALORES DE PH DAS FORMULAÇÕES DE PCL (A) E PCL-PEG (B)



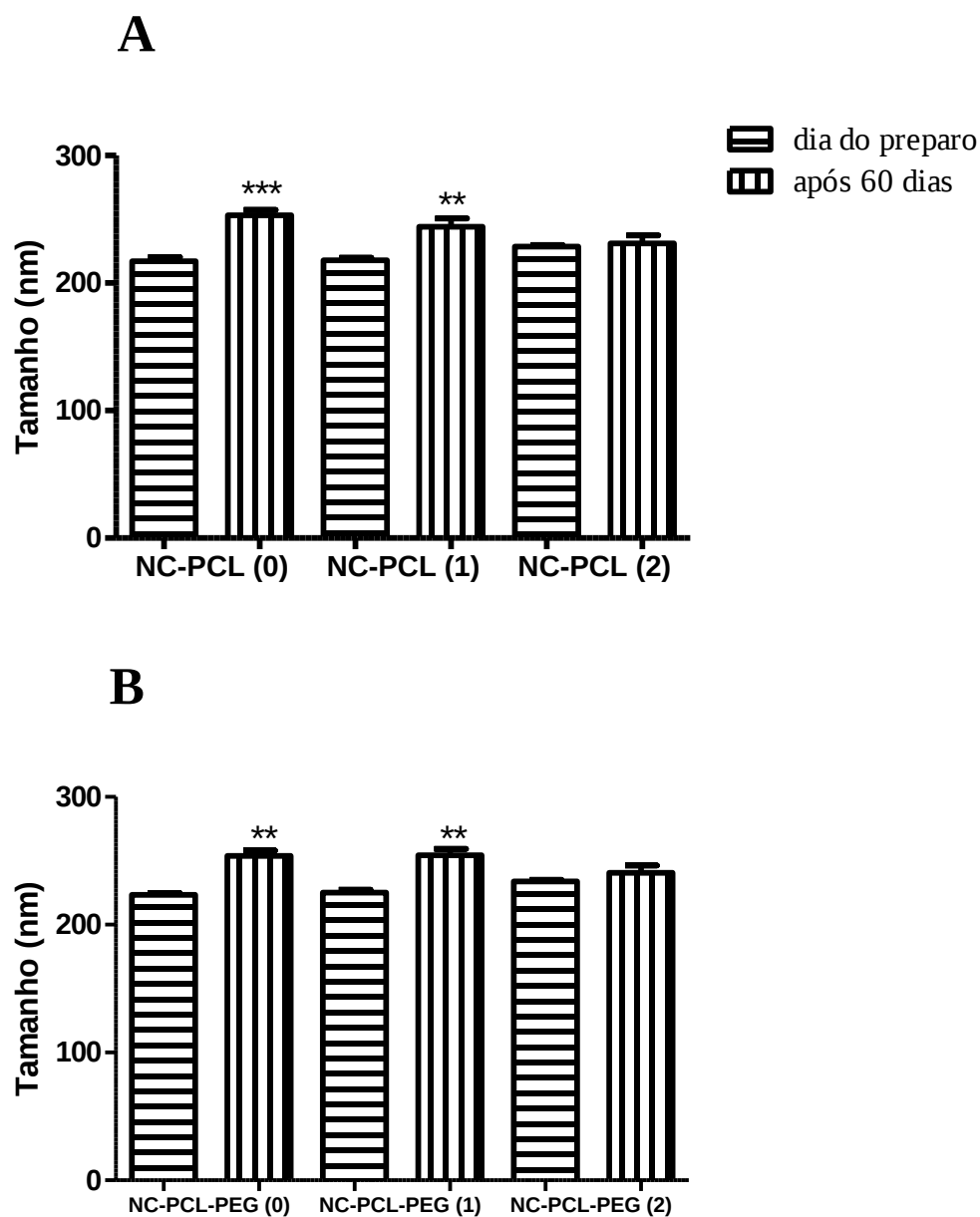
*p < 0,05 (ANOVA seguida de Bonferroni);

NC-PCL (0), (1) e (2): nanocápsulas poliméricas de PCL nas concentrações 0, 1 e 2 mg.mL⁻¹;

NC-PCL-PEG (0), (1) e (2): nanocápsulas de blendas PCL-PEG nas concentrações 0, 1 e 2 mg.mL⁻¹;

Todas as formulações apresentaram um decréscimo nos valores de pH após o período de 60 dias (Figura 31). A diminuição foi significativa ($p < 0,05$) apenas para as formulações de nanocápsulas com blendas PCL-PEG contendo o FH. De acordo com (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo pode estar relacionada tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise.

FIGURA 32: TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA DAS FORMULAÇÕES DE PCL (A) E PCL-PEG (B)



* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$; ANOVA seguida de Bonferroni;

NC-PCL (0), (1) e (2): nanocápsulas poliméricas de PCL nas concentrações 0, 1 e 2 mg.mL^{-1} ;

NC-PCL-PEG (0), (1) e (2): nanocápsulas de blendas PCL-PEG nas concentrações 0, 1 e 2 mg.mL^{-1} ;

Pode-se observar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$) para as formulações de PCL e PCL-PEG sem o FH e com o FH na concentração de 1 mg.mL^{-1} . No entanto, as nanocápsulas mantiveram-se com diâmetros inferiores a 300 nm, como anteriormente mencionado, o que assegura a eficiência de sistemas nanoparticulados para o carreamento de fármacos.

5.7 Toxicidade e ação sobre o estresse oxidativo em eritrócitos humanos

5.7.1 Toxicidade sobre eritrócitos

A avaliação do perfil de substâncias sobre a toxicidade em eritrócitos é necessária na investigação da interferência de xenobióticos em processos oxidativos. É utilizada como modelo de estudo celular principalmente pela suscetibilidade dos eritrócitos a radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e aos efeitos que o dano oxidativo sobre tais células pode causar ao organismo humano.

Inicialmente, foi avaliado se as amostras por si só apresentavam algum potencial citotóxico sobre os eritrócitos em um período de 5 horas. Conforme apresentado nas Figuras 33 e 34, mesmo as maiores concentrações testadas de FH e de NC-PCL-PEG não demonstraram ação hemolítica, ou seja, não promoveram dano aos eritrócitos.

Na quinta hora, momento de maior atividade hemolítica do controle positivo, todas as concentrações de amostras testadas apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparadas a esse controle. Quando as diferentes concentrações de NC-PCL-PEG e de FH, foram comparadas entre si e ao controle negativo.

FIGURA 33: AÇÃO HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS DE PCL-PEG CONTENDO FERULATO DE HEXADECILA

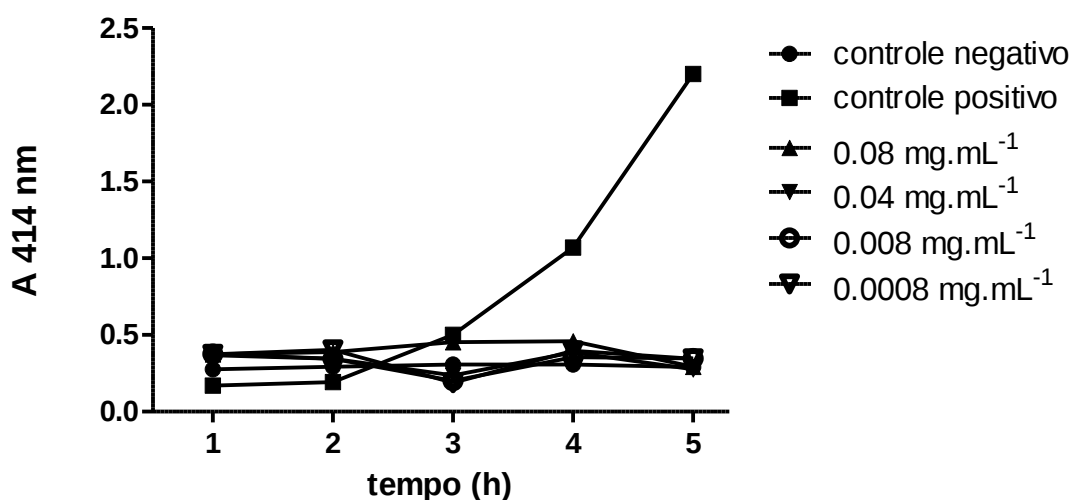
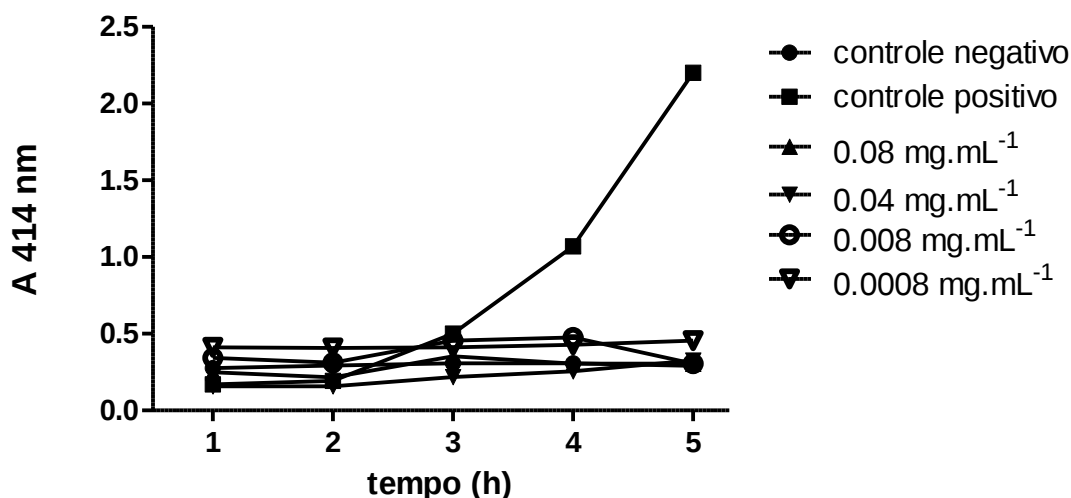


FIGURA 34: AÇÃO HEMOLÍTICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERULATO DE HEXADECILA



5.7.2 Ação sobre o dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

Os eritrócitos têm sido utilizados em diversas pesquisas como modelo para o estudo do dano oxidativo de membranas biológicas na presença de radicais livres de fase aquosa, como o 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), capazes de atacar membranas causando lipoperoxidação e promovendo hemólise (ZHU *et al.*, 2002).

Como pode ser observado nas Figuras 35 e 36, o AAPH (controle positivo) provoca forte ação hemolítica quando comparado ao controle negativo. Houve uma inibição desta atividade hemolítica na presença de FH e de NC-PCL-PEG de FH em todo o tempo analisado, independentemente de sua concentração.

FIGURA 35: AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERULATO DE HEXADECILA SOBRE A HEMÓLISE PROMOVIDA PELO AAPH

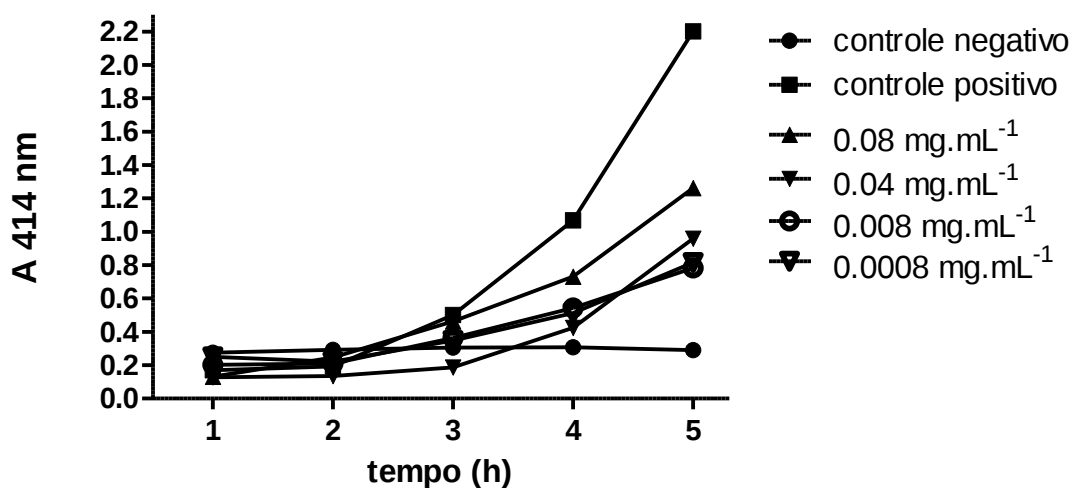
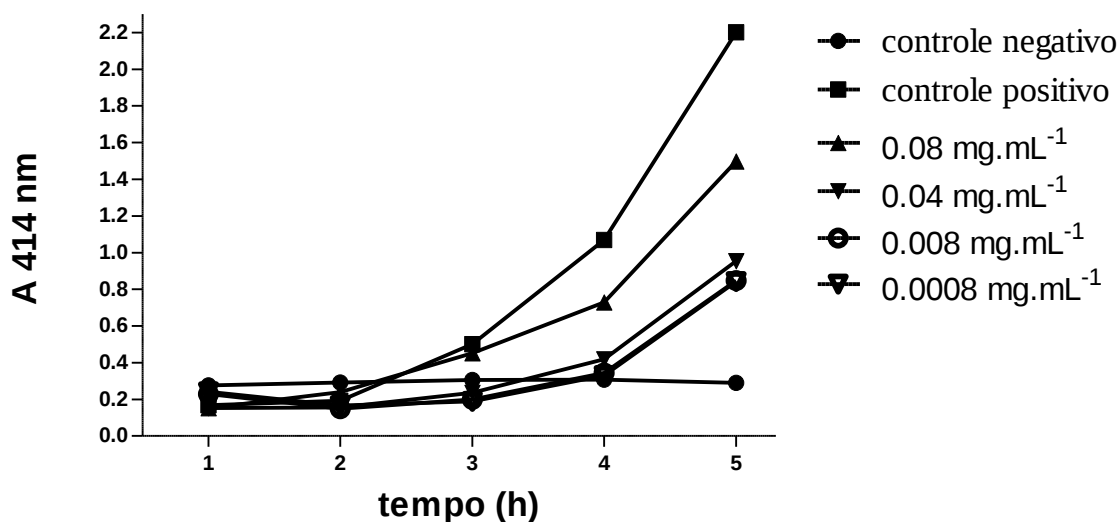


FIGURA 36: AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NANOCÁPSULAS PCL-PEG DE FERULATO DE HEXADECILA SOBRE A HEMÓLISE PROMOVIDA PELO AAPH



Na quinta hora, todas as concentrações testadas de FH apresentaram-se diferentes ($p < 0,0001$) do controle positivo. A maior concentração testada ($0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$) apresentou diferença estatística significativa quando comparada às concentrações $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$), $0,008$ e $0,0008 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$) e não houve diferença significativa das outras concentrações quando comparadas entre si (Figura 35).

Para as concentrações testadas NC-PCL-PEG de FH, após este mesmo período de incubação (5 horas), houve diferença significativa em relação controle positivo ($p < 0,0001$) como pode ser observado na Figura 36.

A nanoencapsulação não prejudicou a atividade do FH, pois à medida que o tempo passou e a hemólise promovida pelo AAPH aumentou, as amostras mantiveram a atividade protetora sobre as células quando comparadas ao controle positivo, o que ficou evidenciado pela redução da ocorrência da hemólise promovida na presença das amostras.

6 CONCLUSÕES

A síntese do ferulato de hexadecila (FH) foi promovida de forma satisfatória, por reação de esterificação do ácido ferúlico, como confirmado por IVTF e RMN de ^1H e ^{13}C . E com excelente rendimento.

A atividade *scavenger* do FH em sistemas oxidativos foi avaliada e observou-se que a alteração estrutural realizada manteve a atividade *scavenger* frente aos radicais DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{\bullet+}$ e ao HOCl.

As nanocápsulas poliméricas de PCL e de blendas PCL-PEG contendo FH foram obtidas adequadamente pelo método de deposição interfacial do polímero, como demonstraram as análises de caracterização morfológicas e de superfície e as análises espectroscópicas realizadas.

O método analítico desenvolvido para a quantificação do FH foi específico, linear, preciso, exato e robusto, possibilitando uma rápida determinação do fármaco nas formulações. Por meio dele pode-se confirmar a eficiência de encapsulação do FH.

O processo de obtenção das nanocápsulas promoveu a amorfização do FH, comprovado por MEV, DRX e CED. As análises efetuadas de IVTF demonstraram que não houve interação entre o fármaco e os polímeros. Todas as formulações preparadas apresentaram partículas esféricas e de superfície lisa, pH e tamanhos adequados para o uso desejado, índice de polidispersão garantindo a homogeneidade das partículas, e potencial zeta com valores negativos, sugerindo estabilidade das suspensões de nanocápsulas poliméricas.

As análises térmicas demonstraram que o FH é estável na temperatura utilizada para o preparo das suspensões de nanocápsulas e que sua incorporação às nanocápsulas favoreceu sua estabilidade térmica.

Os estudos de toxicidade em eritrócitos demonstraram que o FH livre ou nas formulações com PCL-PEG, não apresentou ação hemolítica, mesmo com variações na dose testada e em função do tempo. Adicionalmente, apresentou ação protetora sobre a hemólise promovida pelo AAPH.

A possível ação das formulações desenvolvidas sobre SNC, considerando que possuem características adequadas para sua vetorização, já está sendo investigada em modelos de ansiedade e depressão e deve ser melhor explorada futuramente.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. I. *et al.* Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, 8/11/ 2010.
- ALYAUTDIN, R. *et al.* Nanoscale drug delivery systems and the blood–brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 795-811, 02/07 2014.
- ANSELM, C. *et al.* Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6425-32, Oct 20 2004.
- AVADI, M. R. *et al.* Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.
- BERNARDS, M. A.; LEWIS, N. G. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3409-12, Oct 1992.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **Resolução R.E. 899 de 29 de Maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2003.
- BROUWERS, J.; BREWSTER, M. E.; AUGUSTIJS, P. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 8, p. 2549-2572,
- CHEN, J. *et al.* Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 1, p. 129-36, Feb 2015.
- CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 7, p. 640-65, May 15 2012.
- CHIGORIMBO-MUREFU, N. T. L.; RIVA, S.; BURTON, S. G. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 277-282, 4// 2009.
- D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 10// 2015.
- DURAN, N.; MORAIS, P. C. D.; MATTOSO, L. H. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** Artliber, 2006. ISBN 8588098334.
- FANG, X. *et al.* Suppressive effect of alkyl ferulate on the oxidation of linoleic acid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 457-61, Feb 2006.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GABATHULER, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 48-57, 1// 2010.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435-48, Oct 1992.

GRAF, R. *et al.* The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 215-233, 1995.

GRAF, R. *et al.* ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, n. 3–4, p. 301-313, 2000.

GRAF, R. *et al.* Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1600-3, Mar 18 1994.

GUTERRES, S. S. *et al.* Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 10, p. 1545-7, Oct 1995.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319-327, 2002.

CH. **International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1).** 2005.

KAWASAKI, Y.; GODA, Y.; YOSHIHARA, K. The Mutagenic Constituents of *Rubia tinctorum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 1504-1509, 1992.

KESH, S. B. *et al.* Promising role of ferulic acid, atorvastatin and their combination in ameliorating high fat diet-induced stress in mice. **Life Sciences**, v. 92, n. 17–19, p. 938-949, 2013.

KIEWLICZ, J.; SZYMUSIAK, H.; ZIELINSKI, R. Otrzymywanie, stabilność termiczna i właściwości przeciwutleniające długołańcuchowych estrów kwasu ferulowego. **Żywność Nauka Technologia Jakość**, v. 22, n. 4, 2015.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n. 1–2, p. 109-122, 10/13/ 2004.

LI, S.-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.

LI, Y. *et al.* Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 562-567, 2011.

LIECHTY, W. B. *et al.* Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149-173, 2010.

LIN, T. Y. *et al.* Ferulic acid suppresses glutamate release through inhibition of voltage-dependent calcium entry in rat cerebrocortical nerve terminals. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 2, p. 112-9, Feb 2013.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 1 2001.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, p. 4-17, 12// 2012.

LU, Z. *et al.* Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 22, p. 7677-84, Nov 15 2004.

MA, Q. *et al.* [Protective effect of sodium ferulate magnetic nanoparticle in septic kidney injury rats]. **Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi= Zhongguo yingyong shenglixue zazhi= Chinese journal of applied physiology**, v. 29, n. 5, p. 465-468, 2013.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185-195, 3// 2014.

MENEZES, J. C. J. M. D. S. *et al.* Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 773-777, 2// 2011.

MERLIN, J. J.; PRASAD, N. R.; SHIBLI, S. Ferulic acid loaded poly-d, l-lactide-co-glycolide nanoparticles: systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 69-76, 2012.

MOGHIMI, S. M.; SZE BENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 6, p. 463-478, 2003.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-42, Jan 29 2010.

MOSQUEIRA, V. *et al.* Biodistribution of Long-Circulating PEG-Grafted Nanocapsules in Mice: Effects of PEG Chain Length and Density. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, 2001/10/01 2001.

MURTHY, N. S.; MINOR, H. General procedure for evaluating amorphous scattering and crystallinity from X-ray diffraction scans of semicrystalline polymers. **Polymer**, v. 31, n. 6, p. 996-1002, 1990/06/01 1990.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522-524, 1978.

NEVES, A. R. *et al.* Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p. 177-187, 2013.

OPPENHEIM, R. C. Solid colloidal drug delivery systems: Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 217-234, 1981.

OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 403-419, 2003.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

OZTURK, K. *et al.* The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. **Pharmazie**, v. 65, n. 9, p. 665-9, Sep 2010.

PAIVA, L. B. D. *et al.* Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 395-411, 2013.

PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 78, n. 13, p. 1466-89, Dec 2013.

PARDRIDGE, W. M. Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? **Drug discovery today**, v. 7, n. 1, p. 5-7, 2002.

PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 11, p. 1959-72, Nov 2012.

PICONE, P. *et al.* Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. **Free Radical Research**, v. 43, n. 11, p. 1133-45, 2009.

PICONE, P.; NUZZO, D.; DI CARLO, M. Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo. **Biological Bulletin**, v. 224, n. 1, p. 18-28, Feb 2013.

PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

PUISIEUX, F. *et al.* Liposomes, an interesting tool to deliver a bioenergetic substrate (ATP). in vitro and in vivo studies. **Journal of Drug Targeting**, v. 2, n. 5, p. 443-8, 1994.

QUINTANAR-GUERRERO, D. *et al.* Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998/07/01 1998.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-7, May 1999.

RODRÍGUEZ-SPONG, B. *et al.* General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2/23/ 2004.

ROSSO, R. *et al.* Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6409-6413, 9/15/ 2006.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, v. 8, n. 24, p. 1112-20, Dec 15 2003.

SAKATA, S. *et al.* Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733-737, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHNITZLER, E. *et al.* Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (dsc) na caracterização térmica do acetato de dexametazona, excipientes e do creme de dexametazona. **Eclética Química**, v. 26, p. 41-52, 2001.

SENNA, M.; NAKAYAMA, S. Preparation and properties of nano-amorphous organic and inorganic particles via chemical and mechanochemical routes. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 483, n. 1-2, p. 265-270, 8/26/ 2009.

SERLIN, Y. *et al.* Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 38, p. 2-6, 2// 2015.

SEVERINO, P. *et al.* Polímeros, in press. 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005. x, 502 p. ISBN 0471393622 (acid-free paper)

0471429139 (WIE acid-free paper). Disponível em: < Publisher description

<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0626/2005270991-d.html>

Table of contents only <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0626/2005270991-t.html> >.

- SOARES, J. R. *et al.* Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v. 26, n. 5, p. 469-78, May 1997.
- SOHN, Y. T.; OH, J. H. Characterization of physicochemical properties of ferulic acid. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 12, p. 1002-8, Dec 2003.
- SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.
- SOUTO, E. *et al.* Preparation and characterization of n-dodecyl-ferulate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1, p. 261-268, 2005.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, p. 101-106, 2012.
- STORM, G. *et al.* Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, n. 1, p. 31-48, 1995.
- SULTANA, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 748-752, 2012.
- TAHARA, K. *et al.* Hybrid-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 311-313, 2010.
- TROMBINO, S. *et al.* Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 273-279, 2013.
- TROMBINO, S. *et al.* Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 2, p. 181-187, 2009.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009/05/01 2009.
- VELLOSA, J. C. **Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, “enzimáticos” e “celulares”**. Araraquara: 2008.
- WANG, J. *et al.* Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 1, p. 228-34, Jan 10 2011.
- WHEATLEY, M. A.; LEWANDOWSKI, J. Nano-sized ultrasound contrast agent: salting-out method. **Mol Imaging**, v. 9, n. 2, p. 96-107, Apr 2010.

WU, W. *et al.* Neuroprotective ferulic acid (FA)–glycol chitosan (GC) nanoparticles for functional restoration of traumatically injured spinal cord. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2355-2364, 2014.

YAN, J. J. *et al.* Protective effects of ferulic acid in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 140-3, 2013.

ZGLICZYNSKI, J. M. *et al.* Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, n. 3, p. 419-24, Jun 16 1971.

ZHU, Q. Y. *et al.* Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 227, n. 5, p. 321-9, May 2002.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento, caracterização e avaliação ex vivo de nanocápsulas poliméricas contendo ferulato de hexadecila.

Pesquisador: Edmar Miyoshi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61037916.9.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.795.644

Apresentação do Projeto:

Vários tratamentos para distúrbios neurológicos são malsucedidos por não poderem atingir efetivamente o Sistema Nervoso Central (SNC). A presença da barreira hematoencefálica (BHE) dificulta esse acesso e muitas substâncias são incapazes de atravessá-la quando empregadas sem qualquer modificação química ou físico-química. O ácido ferúlico, um polifenol encontrado abundantemente na natureza e bem reconhecido por sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, é amplamente estudado e sua atividade neuroprotetora vem sendo descrita. Um dos principais problemas, que limita sua utilização clínica, é sua baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral, que pode ser contornado por alterações em sua estrutura e/ou pelo preparo de formulações à base de lipídeos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi sintetizar um derivado lipossolúvel do AF, o ferulato de hexadecila (FH), obter nanocápsulas poliméricas como sistema de vetorização para sua potencial ação no SNC e, posteriormente, avaliar o perfil da ação sobre a toxicidade em eritrócitos e realizar o estudo do dano oxidativo de membranas biológicas na presença de radicais livres de fase aquosa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Promover a síntese de derivado lipossolúvel do ácido ferúlico (ferulato de hexadecila) e posterior obtenção e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo ferulato de hexadecila para uma potencial ação direcionada ao Sistema Nervoso Central (SNC).

Objetivo Secundário:

Efetuar a avaliação ex vivo em modelo de dano oxidativo em membranas biológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos pertinentes a este trabalho são mínimos. Para os voluntários poderá gerar um desconforto mínimo no momento da coleta de sangue, porém todos os procedimentos que envolvam a manipulação das amostras biológicas serão realizados com o uso de equipamento de proteção individual (EPI) para proteção do manipulador e uso de material descartável para proteção do voluntário. Os compostos utilizados não apresentam riscos ao pesquisador.

Benefícios:

O composto sintetizado, é um importante passo para a otimização da vetorização de fármacos ao SNC. A partir desse estudo será verificado os possíveis efeitos protetores do ferulato de hexadecila sobre os eritrócitos, ou, em caso de uma ação hemolítica, essa informação será utilizada para divulgação dos riscos do seu uso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa iniciará com a obtenção de derivado lipossolúvel do ácido ferúlico, ferulato de hexadecila (FH), por meio de esterificação e posterior desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo este derivado. Para a caracterização do FH será realizada espectrometria no infravermelho (IVTF) e ressonância magnética nuclear (RMN). As nanopartículas poliméricas serão caracterizadas por meio de estudos morfológicos,

espectroscópicos e térmicos. Para a determinação quantitativa do fenolato de hexadecila incorporado nas nanopartículas poliméricas será utilizado o método por espectroscopia UV, previamente validado, avaliando a eficiência de incorporação do fármaco. Posteriormente será realizada a avaliação ex vivo em modelo de dano oxidativo em membranas biológicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação encaminhada é pertinente e está de acordo com as diretrizes.

Recomendações:

Enviar relatório final após a conclusão do projeto de pesquisa para evitar pendências com a COEP ou com a PROESP via notificação pela plataforma Brasil (on line).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de opinião favorável a aprovação desse projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_793896.pdf	13/10/2016 15:47:14		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto1.pdf	13/10/2016 15:46:00	FLAVIA DE BRITO PEDROSO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProtocolodePesquisaHemolise.docx	21/09/2016 13:56:32	FLAVIA DE BRITO PEDROSO	Aceito
Investigador TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	21/09/2016 13:52:14	FLAVIA DE BRITO PEDROSO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

meio de estudos morfológicos,

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.
Bairro: Uvaranas CEP: 84.039-900
UF: PR Município: PONTA GROSSA
Telefone: (42)3230-3108 E-mail: coep@uepg.br