



**Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**



Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

ANA CAROLINA NAZARÉ

***Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas
de oxigênio (EROs) do ácido ferúlico e seus ésteres e seu perfil
de liberação em preparações dermatológicas***

Araraquara - SP

2013

ANA CAROLINA NAZARÉ

**Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas
de oxigênio (EROs) do ácido ferúlico e seus ésteres e seu perfil
de liberação em preparações dermatológicas**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós -
graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP -
campus de Araraquara como parte dos
requisitos para o Título de mestre em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia. Área de concentração: Química dos
produtos naturais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Co-orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Araraquara - SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Bibliotecas e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Nazari, Ana Carolina
N335a Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas de oxigênio (AERO) do ácido férilico e sua esterco e seu perfil de liberação em preparações dermatológicas / Ana Carolina Nazari. – Araraquara, 2013
102 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Luis Marcos da Fonseca
Coorientador: Valdecir Peres Almeida
1. Bactéria oxidativa. 2. Ácido férilico. 3. Compostos férilicos. 4. Autoridutiva. I. Fonseca, Luis Marcos da, orient. II. Almeida, Valdecir Peres, coorient. III. Título.

CAPES: 49360005

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Hematologia Clínica do Departamento de Análise Clínicas e de Cosmetologia do Departamento de Fármacos e Medicamentos, ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, e no laboratório de Bioquímica do Departamento de Química na Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

Fomento: Bolsa CNPq – Mestrado.

Não deixe de fazer algo que gosta,
devido à falta de tempo,
pois a única falta que terá,
será desse tempo que
infelizmente não voltará mais".

(Mário Quintana)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus,
aos meus pais, meu irmão,
ao meu namorado e minha família coruja!

Obrigada por confiarem em mim,
por sempre me estimularem a ir mais longe,
por todo carinho, amor, respeito, força e compreensão.

Vocês estão e estarão sempre em meus pensamentos!

Amo muito cada um de vocês.

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, professor Dr. Luiz Marcos da Fonseca, pela oportunidade oferecida, pela orientação e pelo ótimo convívio e comprometimento ao longo destes anos de trabalho. Por contribuir com o meu avanço pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Valdecir Farias Ximenes por sua co-orientação, e confiança em mim investida, obrigada, pela atenção, disponibilidade e por ceder seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Aos professores, Dr. Luis Octavio Regasini, Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, Dr. Marcos Antonio Corrêa e Dra. Vera Lúcia Borges Isaac, cujo apoio, atenção e dedicação foram imprescindíveis nesta trajetória.

Às professoras Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli e Dra. Sandra Helena Pulcinelli por também cederem seus laboratórios para realização de parte deste trabalho, em especial à aluna de Pós-Doutorado Renata Cristina Kiatkoski Kaminski, por toda ajuda oferecida.

A todos os companheiros e amigos de laboratório: Luana, Carol Quinello, Cíbele, Elaine, Malu, Giovana, Fernanda, Bruna, Gabi, Ana, Carol Magnani, Fernanda Coirada e Beatriz, muito obrigada, pelo apoio, compreensão, pela convivência, pelas risadas que não foram poucas e pela ajuda. Em especial a um amigo, colega de laboratório e meu namorado: Mike, pela ajuda, compreensão, dedicação, pelo ótimo convívio e por todo carinho, muito obrigada.

Aos professores e funcionários da UNESP de Araraquara e Bauru que de alguma forma contribuíram como este trabalho.

RESUMO

Os processos oxidativos podem ser evitados pela utilização de substâncias antioxidantes que possuem propriedades de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas. Antioxidantes fenólicos podem funcionar como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais. Alguns produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à estabilização por ressonância do anel aromático presente nestas substâncias. Devido à relação entre a geração endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a gênese ou a progressão de inúmeras patologias de cunho inflamatório e degenerativo, as aplicações experimentais e clínicas de substâncias com propriedades antioxidantes aumentam a cada dia. O mesmo pode ser dito para as aplicações de uso tópico, onde antioxidantes podem conferir proteção contra EROs e ainda promover a estabilização química das emulsões. No presente trabalho foram estudadas as características químicas e biológicas do ácido ferúlico e ferulatos de alquila, os quais foram sintetizados no Instituto de Química – UNESP – Araraquara/SP. Especificamente foi avaliado a lipofilicidade dos mesmos a fim de visualizar possíveis alterações no potencial antioxidante destas substâncias. Estas alterações puderam ser observadas quando comparamos os resultados dos ensaios químicos com os ensaios biológicos, onde o potencial antioxidante se inverteu. Nos ensaios químicos em meio aquoso, como por exemplo, o DPPH, o ácido ferúlico (CI_{50} 23,54) apresentou maior potencial antioxidante frente aos ferulatos de alquila ($CI_{50} > 23,54$), já nos ensaios celulares, usando como exemplo o ensaio de lucigenina, os ferulatos (com exceção o F7) apresentaram maior potencial antioxidante frente ao ácido ferúlico $F2 > F1 > F4 > F7 > F0$, isso pode estar relacionado à cadeia alquílica dos ferulatos que representa baixa solubilidade em meio aquoso. E nos ensaios celulares, os ferulatos possuem capacidade de interação da cadeia alquílica com a membrana plasmática das células. Em nosso último passo foram preparadas formulações diferentes que passaram por testes preliminares a fim de avaliar a estabilidade, escolhemos uma das formulações para a incorporação do ácido ferúlico e ferulato de etila separadamente, das quais foram traçados os perfis de liberação dos mesmos, e verificada a estabilidade destas formulações.

ABSTRACT

Oxidative processes can be avoided by the use of antioxidants to prevent or lessen property triggering of oxidative reactions. Phenolic antioxidants may act as radical scavengers and sometimes as metal chelators. Some intermediate products formed by the action of these antioxidants are relatively stable due to resonance stabilization of the aromatic ring present in these substances. Because of the relationship between the endogenous generation of reactive oxygen species (ROS) and the genesis or progression of numerous diseases imprint inflammatory and degenerative experimental and clinical applications of substances with antioxidant properties increase every day. The same can be said for topical applications, where antioxidants may confer protection against ROS and further promote the chemical stabilization of emulsions. In the present study, the chemical and biological characteristics of ferulic acid and alkyl ferulates, which were synthesized at the Institute of Chemistry - UNESP - Araraquara / SP. Specifically was evaluated lipophilicity to visualize possible changes in antioxidant potential of these substances. These changes could be observed when comparing the chemical assays with biological assays, where the antioxidant potential was reversed. In the test chemical in aqueous medium, for example DPPH ferulic acid (IC_{50} 23,54) has a higher antioxidant activity against alkyl ferulates ($IC_{50} > 23.54$) already in cellular assays using the assay as an example of lucigenin the ferulates (except F7) showed higher antioxidant ferulic acid against $F2 > F1 > F4 > F7 > F0$, this may be related to the alkyl ferulates chain of representing low solubility in aqueous media. And in cellular assays, ferulates have the ability to interact with the alkyl chain with the plasma membrane of cells. In our last step different formulations were prepared that have undergone preliminary tests in order to evaluate the stability of the formulations chosen for the incorporation of ferulic acid and ethyl ferulate separately, which were the traces of the same release profiles, and checked for stability of these formulations.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
AcOEt	acetato de etila
BHT	butil-hidroxitolueno
CB	creme base
Cl₅₀	concentração inibitória
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPR	desvio padrão relativo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas do oxigênio
F0	ácido ferúlico
F1	ferulato de metila
F2	ferulato de etila
F4	ferulato de butila
F7	ferulato de heptila
F-Try	Fluortriptamina
HEX	Hexano
HRP	peroxidase de rábano
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
PBMC	células mononucleares
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial hidrogeniônico
PMA	phobol 12-myristate 13-acetate
PMN	células polimorfonucleares
QLDLuc	quimiluminescência dependente de lucigenina
QLDLum	quimiluminescência dependente de luminol
SOD	superóxido dismutase

TEAC	atividade antioxidante equivalente ao Trolox
TMB	Tetrametilbenzidina
UV	Ultraviolet
WST-1	sal de tetrazólio solúvel em água
XO	xantina oxidase
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol L⁻¹	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do ácido ferúlico.....	21
Figura 2: Ação da NADPH oxidase, SOD e MPO.....	23
Figura 3: Reação química dependente de luminol.....	38
Figura 4: Esquema da reação da redução de lucigenina.....	39
Figura 5: Esquema de formação da taurinacloramina pela MPO.....	41
Figura 6: Célula de Franz modificada.....	50
Figura 7: Dados extraídos do programa Gen5.....	54
Figura 8: Gráficos com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina.....	55
Figura 9: Potencial antioxidante do F0 e do F2 e BHT.....	57
Figura 10: Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque® 1077 e 1119.....	58
Figura 11: Porcentagem de inibição do F0 e de seus ésteres em células PMN e PBMC.....	59
Figura 12: Porcentagem de inibição do ânion superóxido por F0 e seus ésteres em células PMN e PBMC.....	60
Figura 13: Porcentagem de inibição da atividade clorinante da MPO.....	61
Figura 14: Porcentagem de inibição da produção de ácido hipocloroso.....	61
Figura 15: Ação scavenger do F0 e seus ésteres.....	62
Figura 16: Perfil cinético do decaimento da absorvância.....	63
Figura 17: Gráfico do perfil cinético e porcentagem de inibição do ânion superóxido com WST-1.....	63
Figura 18: Regressão linear F0 e F2.....	65
Figura 19: Avaliação do pH dos cremes base, F0 e F2.....	73
Figura 20: Densidade medida durante 15 dias.....	74
Figura 21: Avaliação do pH durante 90 dias.....	75
Figura 22: Densidade medida durante 90 dias.....	76
Figura 23: Perfil da estabilidade química do F0 e F2.....	77
Figura 24: Estabilidade química do F0 e F2 em todas as condições estudadas.....	78
Figura 25: Curva de fluxo X viscosidade do CB, F0 e F2.....	80
Figura 26: Varredura de frequência do CB, F0 e F2.....	80
Figura 27: Varredura de tensão do CB, F0 e F2.....	81

Figura 28: Fluência e Relaxação.....	82
Figura 29: Valores de Absorvância X Tempo e porcentagem de F0 liberado pela emulsão através das membranas sintéticas nos tempos de 0.5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.....	83
Figura 30: Valores de Absorvância X Tempo e porcentagem de F2 liberado pela emulsão através das membranas sintéticas nos tempos de 0.5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.....	83
Figura 31: Perfil de liberação do F0 X F2.....	83
Figura 32: Gráfico da emissão de luz gerada no ensaio QLDLuc com células PMN.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura molecular do F0 e seus ésteres.....	29
Tabela 2: Composição percentual do sistema emulsionado.....	44
Tabela 3: Valores de CI_{50} (μM) referentes ao ensaio com radical DPPH.....	54
Tabela 4: Avaliação da atividade antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila (TEAC).....	56
Tabela 5: Avaliação do potencial antioxidante frente ao radical peroxila.....	57
Tabela 6: Composição percentual do sistema emulsionado escolhido para incorporação do ácido ferúlico e ferulato de etila.....	64
Tabela 7: Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	66
Tabela 8: Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	66
Tabela 9: Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	67
Tabela 10: Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	67
Tabela 11: Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	68
Tabela 12: Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	68
Tabela 13: Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	69
Tabela 14: Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	69
Tabela 15: Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	69
Tabela 16: Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	69
Tabela 17: Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	70
Tabela 18: Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	70

Tabela 19: Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.....	71
Tabela 20: Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do ferulato de etila.....	71
Tabela 21: Características organolépticas das emulsões estudadas.....	72
Tabela 22: Características organolépticas dos cremes F0 e F2 frente ao estresse do ciclo (freezer e estufa).....	72
Tabela 23: Avaliação da viscosidade do CB nos dias 1, 30, 60 e 90.....	78
Tabela 24: Avaliação da viscosidade do F0 nos dias 1, 30, 60 e 90.....	79
Tabela 25: Avaliação da viscosidade do F2 nos dias 1, 30, 60 e 90.....	79

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Substâncias fenólicas.....	20
1.2. Ácido ferúlico.....	21
1.3. Neutrófilos e o <i>burst</i> oxidativo.....	22
1.4. Efeito da radiação UV na pele e sua influencia na geração de EROs.....	23
2. OBJETIVO.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Reagentes.....	28
3.2. Ácido ferúlico e seus ésteres de alquila.....	29
3.3. Preparação de soluções e tampões.....	30
3.4. Efeito supressor sobre o radical livre DPPH.....	33
3.5. Efeito supressor sobre os radicais peroxila (AAPH/Piranina).....	33
3.6. Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo tungue).....	34
3.7. Amostra de sangue.....	35
3.8. Isolamento das células polimorfonucleares e mononucleares.....	35
3.9. Teste de viabilidade: exclusão por azul de Tripan.....	36
3.10. Citotoxicidade.....	36
3.11. Efeito inibitório sobre a produção de EROs gerados por neutrófilos ativados – quimiluminescência dependente de luminol.....	37
3.12. Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerados por neutrófilos ativados – quimiluminescência dependente de lucigenina.....	39
3.13. Inibição da atividade clorinante da MPO.....	40
3.14. Efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados.....	41
3.15. Efeito supressor sobre ácido hipocloroso.....	42
3.16. Efeito supressor sobre o radical ânion superóxido (xantina/ xantina oxidase /WST-1).....	42

3.17.	Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados (WST-1).....	43
3.18.	Preparo das formulações.....	44
3.19.	Escolha da formulação para continuidade dos experimentos.....	45
3.20.	Quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila.....	45
3.21.	Padronização da metodologia de quantificação do ácido ferúlico e de seu éster ferulato de etila por espectrofotometria UV/VIS.....	45
3.22.	Estudos de estabilidade.....	47
3.23.	Estudo do comportamento reológico.....	49
3.24.	Avaliação do perfil de liberação de sistemas emulsionados contendo ácido ferúlico do ferulato de etila.....	50
4.	ANALISE ESTATÍSTICA.....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1.	Efeito supressor sobre o radical livre DPPH.....	54
5.2.	Efeito supressor sobre os radicais peroxila (AAPH/Piranina).....	54
5.3.	Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo tungue).....	56
5.4.	Isolamento das células polimorfonucleares e mononucleares.....	58
5.5.	Teste de viabilidade: exclusão por azul de Tripan.....	58
5.6.	Citotoxicidade.....	58
5.7.	Efeito inibitório sobre a produção de EROs gerados por células PMN e PBMC ativadas - quimiluminescência dependente de luminol.....	59
5.8.	Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerados por células PMN e PBMC ativadas – quimiluminescência dependente de lucigenina.....	60
5.9.	Inibição da atividade clorinante da MPO.....	60
5.10.	Supressão do ácido hipocloroso.....	61
5.11.	Efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados.....	62
5.12.	Efeito supressor sobre o radical ânion superóxido (xantina/ xantina oxidase /WST-1).....	62
5.13.	Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados (WST-1).....	63
5.14.	Preparo das formulações.....	64

5.15. Escolha da formulação para continuidade dos experimentos.....	64
5.16. Padronização da metodologia de quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila por espectrofotometria UV-VIS.....	65
5.17. Estudos de estabilidade.....	71
5.18. Estudo do comportamento reológico.....	79
5.19. Avaliação do perfil de liberação de sistemas emulsionados contendo ácido ferúlico do ferulato de etila.....	82
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÃO.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
Anexo 1.....	99

Capítulo 2

Carta de submissão do artigo.....	102
-----------------------------------	-----

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Substâncias fenólicas

O interesse pelos estudos de substâncias de origem natural com propriedades antioxidantes tais como: ácidos fenólicos, polifenóis, flavonoides, e curcuminóides têm crescido desde a década de 80. Isto se deu no intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido a sua toxicidade (LAGUERRE; LECOME; VILLENEUVE, 2007). Desta forma, os antioxidantes naturais têm sido amplamente utilizados em diversos seguimentos da indústria tais como: alimentícias, automotivas, petrolíferas, cosméticas, químicas e farmacêuticas. A indústria alimentícia tem estudado estes antioxidantes, principalmente por aumentarem a meia-vida dos produtos, protegendo contra possíveis oxidações causadas pela luz, umidade e temperatura. No que diz respeito às indústrias que trabalham com produtos lipídicos, o uso de antioxidantes é uma forma de minimizar a rancificação e retardar a formação de produtos tóxicos, bem como manter a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

A presença das substâncias fenólicas em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM *et al.*, 1992; GAMACHE *et al.*, 1993; IVANOVA *et al.*, 1997; AZIZ *et al.*, 1998; FERNANDEZ *et al.*, 1998 e HOLLOMAN & KATAN, 1998). Podem reduzir riscos de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (SPENCER, *et al.*, 2008), além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG *et al.*, 1998).

Evidências recentes sugerem que as substâncias fenólicas podem atuar por meio de outros mecanismos, como a modulação da atividade de diferentes enzimas, entre elas: telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase; interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, os quais são essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D' ARCHIVIO, *et al.*, 2007).

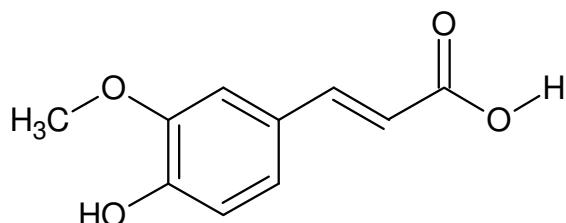
1.2. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico (Figura 1) é um ácido fenólico, que pode ser encontrado na forma livre ou ligado a açúcares, em folhas e sementes de muitas plantas. Entre os vegetais, destacam-se, berinjela, broto de bambu, beterraba, couve, espinafre e brócolis. Em frutas são encontrados na banana e frutas cítricas, principalmente nas suas cascas, e em cereais como farelo de trigo e alimentos de grãos integrais (MATTILA & HELLSTROM, 2007).

No Japão o ácido ferúlico, já é usado como conservante de alimento há algum tempo (GRAF., 1992) e na China, o ferulato de sódio é usado no tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (WANG & OU YANG, 2005).

Foi isolado pela primeira vez em 1866, a partir de uma resina, e sintetizado em 1925 (GRAF., 1992). Em 1970 foram descobertos seus primeiros ésteres antioxidantes extraídos do óleo de arroz (YAGI & OHISHI, 1979). Esta descoberta foi o ponto inicial para a investigação do possível potencial antiaterosclerose (YIN & XU, 1980; ZHANG, 1990).

Figura 1. Estrutura molecular do ácido ferúlico.



Neste trabalho foram estudados o ácido ferúlico (F0) e ferulatos de alquila. O F0 (Figura 1) é um antioxidante fenólico amplamente conhecido na literatura, onde uma de suas características é funcionar como sequestrador de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI *et al.*, 1992). Também possui capacidade de absorção da energia dos raios UV, podendo auxiliar como um possível agente protetor (SAIJA *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2004 e LIN *et al.*, 2005). Taniguchi e colaboradores em 1999 depositaram uma patente com o uso dos ésteres derivados do ácido ferúlico em produtos cosméticos, tais pesquisadores utilizaram os ésteres em formulações de maquiagem, com intuito de proteger a pele da radiação ultravioleta, no entanto

este uso só foi possível devido os ésteres apresentarem características termoeestáveis (HISAJI *etal.*, 1999).

1.3. Neutrófilos e o *burst* oxidativo

Os neutrófilos são células fagocíticas recrutadas mais precocemente nas infecções. Eles migram do sangue para os tecidos com o objetivo de fagocitar os microrganismos invasores, evitando processos infecciosos (VASSELON & DETMERS, 2002). Os neutrófilos englobam e digerem os microrganismos por meio da ação de enzimas microbicidas digestivas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos, (KLEBANOFF, 2005), as quais são capazes de hidrolisar polissacarídeos simples e complexos além de proteínas, lipídeos e outras substâncias.

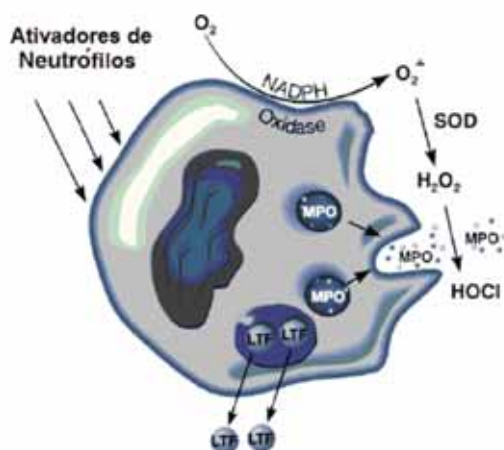
O processo de digestão do microrganismo envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação de enzimas no vacúolo fagocítico com a formação de fagolisossomo e o *burst* respiratório com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HAMPTON *et al.*, 1998).

O metabolismo oxidativo é mediado pela NADPH oxidase (CHANOCKF *et al.*, 1994; BABIOR, 1988 e BABIOR, 1999). E as EROs podem ser geradas por mecanismos dependentes e independentes de mieloperoxidase (MPO), quando os fagócitos são apropriadamente estimulados. Quanto as diversas EROs produzidas durante o *burst* oxidativo, sabe-se que o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) não apresenta atividade bactericida direta e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem atividade bactericida somente em altas concentrações. Portanto, a ação microbicida dos neutrófilos é, provavelmente, devido à ação de oxidantes secundários, produzidos a partir de ambos. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados, o H_2O_2 é um metabólito extremamente oxidante e altamente tóxico para as células, pois tem vida longa, sendo capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas ou com proteínas ligadas ao íon Fe^{++} , como ocorre na hemocromatose transfusional (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O HOCl é o principal e o mais potente microbicida produzido por células fagocíticas (SILVA, 2001). Assim é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, aminas, aminoácidos e nucleotídeos. Em células de mamíferos, os antioxidantes não são capazes de inibir a ação

deste ácido por via catalítica devido à ausência de defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (WEISS, 1989 e LAURINDO, *et al.*, 1996). Quanto ao radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), sua combinação extremamente rápida com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Figura 2. Ação da NADPH oxidase, SOD e MPO (BRENNAN *et al.*, 2003).



1.4. Efeito da radiação UV na pele e sua influencia na geração de EROs

A geração de radicais livres no corpo humano também está associada ao processo de respiração celular no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993), e, é influenciada por fatores endógenos ou por fatores exógenos, como radiação ultravioleta, poluentes do ar e fumaça de cigarro. A exposição à radiação UV é responsável por alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce, resultante da redução da concentração das substâncias antioxidantes endógenas por ação das EROs (DAL' BELO, 2008; VELASCO *et al.*, 2008).

A extensão dos efeitos biológicos da radiação UV solar sobre a pele são determinadas pelo tempo de exposição da radiação; a área da pele exposta e a predisposição genética. Embora a radiação UVB atinja a epiderme e a derme superior, UVA é a radiação mais penetrante que alcança a derme. As respostas biológicas a ação da radiação podem ser agudas, tais como: inflamação,

queimaduras solares e prurido, ou crônicas tais como: fotoenvelhecimento, imunossupressão e fotocarcinogênese (SALIOU *et al.*, 1999).

Esta radiação induz a produção de EROs, que são responsáveis pelos danos foto-oxidativos em ácidos nucléicos, lipídios e proteínas (DEVARY *et al.*, 1993). Uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo é a desorganização do mecanismo de defesa antioxidante das células, provocando alterações na pele, sendo resultado então das condições decorrentes desse desequilíbrio e que tem como consequências de danos à estrutura de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho tivemos por objetivo estudar e comparar o ácido ferúlico e seus ésteres no que diz respeito as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatória, bem como estudar as propriedades físicas de emulsões contendo o ácido ferúlico e seus ésteres.

2.1. Objetivos específicos:

- 1) Estudar a capacidade antioxidante via redução do radical DPPH;
- 2) Estudar a capacidade antioxidante via redução de radicais peroxila, utilizando o ensaio AAPH/piranina;
- 3) Estudar a capacidade antioxidante via redução de radicais peroxila, utilizando o ensaio de degradação de lipídeos poli-insaturados por AAPH;
- 4) Inibição da produção EROs por neutrófilos ativados, utilizando QLDLum;
- 5) Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados, utilizando o ensaio de QLDLuc;
- 6) Inibição da atividade clorinante da MPO;
- 7) Efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados;
- 8) Efeito supressor sobre ácido hipocloroso;
- 9) Efeito supressor sobre o radical ânion superóxido, utilizando o ensaio xantina/xantina oxidase/ WST-1;
- 10) Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados (WST-1);
- 11) Preparo das formulações cosméticas;
- 12) Escolha da formulação para continuidade dos experimentos;
- 13) Padronização do método analítico e quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila;
- 14) Estudar estabilidade das formulações;
- 15) Avaliar características reológicas;
- 16) Estudar perfil de liberação do ácido ferúlico e do ferulato de etila nas emulsões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

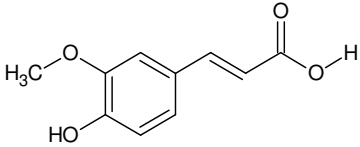
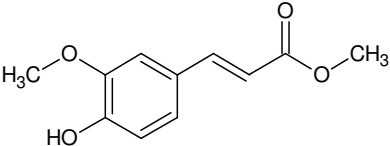
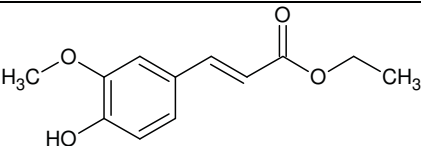
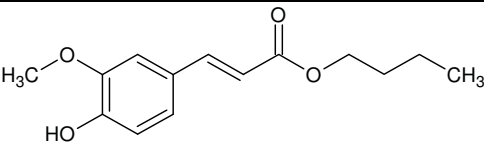
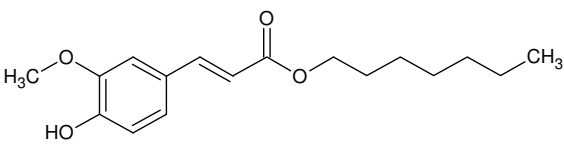
3.1. Reagentes

AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) – Sigma-Aldrich[®], acetato de etila – Synth, ácido acético glacial, ácido ferúlico (F0) – Sigma-Aldrich[®], ácido hipocloroso (HOCl), ácido sulfúrico – Vtec, água destilada, álcool cetoestearílico etoxilado 20 o e, álcool cetoestearílico, anisaldeído, azul de tripan, butanol – Sigma-Aldrich[®], butil-hidroxitolueno (BHT), catalase – Sigma-Aldrich[®], cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), dimetilformamina (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), EDTANa₂, estearato de octila, etanol – Sigma-Aldrich[®], éter laurilo 23 polioexietileno (Brij 35[®]) – Sigma-Aldrich[®], ferulato de butila (F4) – sintetizado no Instituto de Química UNESP – Araraquara, ferulato de etila (F2) – Sigma-Aldrich[®] e sintetizado no Instituto de Química UNESP – Araraquara, ferulato de heptila (F7) – sintetizado no Instituto de Química UNESP – Araraquara, ferulato de metila (F1) – sintetizado no Instituto de Química UNESP – Araraquara, fluortriptamina (F-Try), fosfato dissódico, fosfato monopotássico, heptanol – Sigma-Aldrich[®], hexano – Synth, hidróxido de sódio (NaOH), Histopaque 1077 – Sigma-Aldrich[®], Histopaque 1119 – Sigma-Aldrich[®], iodeto de potássio (KI), lucigenina – Sigma-Aldrich[®], luminol – Sigma-Aldrich[®], metanol – Sigma-Aldrich[®], mieloperoxidase (MPO) purificada – Sigma-Aldrich[®], miristato de isopropila, óleo tungue – Sigma-Aldrich[®], palmitato de cetila, peg-75 lanolina, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – Sigma-Aldrich[®], peroxidase de rábano (HRP), Phenova[®], piranina – Sigma-Aldrich[®], PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) – Sigma-Aldrich[®], propilenoglicol, sílica – gel (flex), tampão fosfato (0,1 m – pH 7,4), tampão PBS suplementado, tampão PBS, taurina – Sigma-Aldrich[®], TMB (3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine) – Sigma-Aldrich[®], triglicerídeo do ácido caprílico, trolox – Sigma-Aldrich[®], WST-1 – Sigma-Aldrich[®], xantina oxidase – Sigma-Aldrich[®], xantina– Sigma-Aldrich[®], zymosan – Sigma-Aldrich[®].

3.2. Ácido ferúlico e seus ésteres de alquila

As substâncias foram sintetizadas anteriormente no projeto de iniciação científica (número do processo FAPESP - 2009/08699-8), realizado sob orientação dos professores Dra. Dulce Helena Siqueira Silva e Dr. Luis Octávio Regasini do Instituto de Química da UNESP – Araraquara/SP (Tabela 1).

TABELA 1: Estrutura molecular do F0 e seus ésteres

Nome	Fórmula Estrutural
ácido ferúlico (F0)	
ferulato de metila (F1)	
ferulato de etila (F2)	
ferulato de butila (F4)	
ferulato de heptila (F7)	

3.3. Preparação de soluções e tampões

Solução estoque de DPPH

A solução estoque foi preparada pesando 0,00394 g de DPPH que foi solubilizado em 100 mL de etanol.

Ácido ferúlico e seus ésteres

Foram preparadas soluções estoque na concentração de 5 mM que foram diluídas em DMSO de acordo com as concentrações a serem testadas.

Substâncias padrão

As soluções estoque do trolox, 5-fluortriptamina, apocinina e butilhidroxitolueno (BHT) foram preparadas nas concentrações de 5 mM em DMSO e conservadas em geladeira.

Tampão fosfato 10 mM isotônico (PBS)

Para preparar o tampão foram pesados 8,00 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g de KH_2PO_4 em 1 litro de água deionizada. O pH foi devidamente ajustado em 7,4.

PBS suplementado

Adiciona-se em 10 mL do PBS comum 100 μL de cálcio (100 mM), 100 μL de magnésio (50 mM) e 100 μL glicose (100 mg/mL).

Solução estoque de AAPH

O preparo do AAPH foi realizado pouco antes de fazer os experimentos, devido sua instabilidade. Esta substância foi preparada em diferentes concentrações (de acordo com os ensaios) e dissolvida em PBS.

Solução estoque de piranina

Foi preparada numa concentração de 5 mM, onde foram pesados 0,00262 g de piranina e dissolvidos em 1 mL de PBS e conservada em geladeira.

Éter laurilo 23 polioexietileno (Brij 35[®])

Pesou-se 1 mg de Brij 35[®] em 25 mL de PBS.

Emulsão do óleo tungue

Foram adicionados 25 mL de Brij 35[®] (preparado anteriormente) a 5 mg de óleo tungue em um frasco âmbar, que foram agitados até completa homogeneização.

Corante azul de tripan (0,5%)

Para preparar o corante azul de tripan foram pesados 0,5 g do corante e dissolvido em 100 mL de água destilada.

Luminol

Foi preparada uma solução estoque de luminol 10^{-2} M dissolvendo 0,002 g em 1 mL de tampão PBS. Preparou-se alíquotas da solução estoque que foram armazenadas no freezer ao abrigo da luz.

Lucigenina:

Foi preparada uma solução estoque de lucigenina á 10 mM, onde foram pesados 0,01021 g e dissolvidos em 1 mL de PBS. Armazenada em geladeira ao abrigo da luz.

Zymosan

Foram pesados 20 mg de zymosan e adicionados à 10mL de solução salina, aquecidos até a ebulição durante 30 minutos, posteriormente foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O precipitado foi homogeneizado em 1mL de PBS. Ao final obteve-se uma suspensão de zymosan a 10 mg/mL, sendo que a concentração utilizada nos ensaios foi de 1 mg/mL.

Zymosan Opsonizado

20 mg de zymosan foram suspensos em 10 mL de solução salina e aquecidos até ebulição do banho-maria durante 30 minutos, centrifugou-se a 1500 rpm por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 1mL de soro sanguíneo (*pool* de soro de 3 indivíduos sadios) e incubado a 37° C por 30

minutos. Após incubação o zymosan foi lavado 3 vezes com PBS e suspenso em 1 mL de PBS. Ao final foi obtida uma suspensão de zymosan a 10 mg/mL, sendo que a concentração utilizada nos ensaios foi de 1 mg/mL.

Tetrametilbenzidina (TMB)

Foram pesados 0,0168 g de TMB e dissolvidos em 2,5 mL de dimetilformamina (DMF), onde foram adicionados 2,5 mL de ácido acético 0,8 M e em seguida 100 µL de Iodeto de Potássio (KI) 10 mM.

Taurina

A taurina foi preparada na concentração de 5 mM e dissolvida em PBS suplementado.

Catalase

Foi pesado 1 mg de catalase para 1 mL de água.

PMA

Foi preparada uma solução estoque de PMA na concentração de 1,6 mM, onde foram preparadas alíquotas e congeladas.

Xantina

A concentração da xantina foi de 5 mM onde foi diluída em NaOH 0,01M.

WST-1

Foi utilizado em dois ensaios diferentes, por tanto foi preparado em duas concentrações em 2,5 mM e 500 mM ambas diluídas em PBS.

Xantina Oxidase

Foram adicionados 2 µL da solução do frasco de xantina oxidase (1,3 U/mg proteína e 21 mg de proteína/mL) 1 mL de PBS, para que a concentração final fosse 0,05 U/mL.

ENSAIOS QUÍMICOS

3.4. Efeito supressor sobre o radical livre DPPH

As misturas de reacionais foram constituídas pela combinação de 950 μL de DPPH ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 50 μL do ácido ferúlico ou de seus ésteres nas concentrações finais de 25, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos e absorvância foi medida no comprimento de onda de 515 nm, em um espectrofotômetro UV-Mini 1240, em relação a um branco constituído de álcool etílico. Os experimentos foram efetuados em triplicata e o percentual de inibição do radical DPPH foi calculado tendo como referência o controle, o qual não teve a adição dos antioxidantes e sim de água deionizada. A partir das porcentagens de inibição foi calculada a concentração para supressão de 50% (CI_{50}) das amostras e comparado o antioxidante de referência trolox. Também foi testado o BHT no intuito de comparar sua ação antioxidante com o ácido ferúlico e seus ésteres de alquila, já que o mesmo é muito utilizado em preparações dermatológicas para conferir estabilidade frente a possíveis processos oxidativos que a formulação pode sofrer (BRAND-WILLIAMS, *et al.*, 1995 modificado por SANCHES-MORENO *et al.*, 1998).

3.5. Efeito supressor sobre radicais peroxila (AAPH/Piranina)

O experimento foi realizado utilizando a técnica de Campos e colaboradores, com pequenas modificações (CAMPOS, *et al.*, 2004). Este se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetido à oxidação por radicais peroxila gerados pela termólise do AAPH.

A piranina foi incubada na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ juntamente com AAPH (20 mM) em PBS a 37°C na presença ou ausência de diferentes concentrações finais do ácido ferúlico, ou de seus ésteres, ou do BHT (25, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Utilizou-se trolox como referência de substância com reconhecida capacidade antioxidante. O decaimento de fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação de 456 nm e de emissão de 512 nm em um leitor Spectramax M2 Microplate (Molecular Devices, EUA). O volume final da reação foi de 250 μL . A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de indução, ou seja,

o atraso no decaimento de fluorescência da piranina provocado pela presença das substâncias em estudo. Por fim os resultados deste ensaio foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox) onde comparamos diretamente a atividade antioxidante das amostras testadas com a atividade antioxidante do trolox.

3.6. Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo tungue)

Este ensaio baseia na inibição da degradação oxidativa do óleo de tungue provocada por radicais peroxila. Para este ensaio foi preparado uma emulsão de óleo tungue pela adição de 5 mg do mesmo em PBS contendo $34 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Brij 35®. Esta mistura foi agitada até completa homogeneização formando uma emulsão. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, sendo que para o controle negativo foram pipetados 150 μL de PBS e 50 μL da emulsão. Para o controle positivo foram adicionados 100 μL de PBS, 50 μL da emulsão e 50 μL da solução de AAPH 4 mM. Para as substâncias em teste foram adicionado 50 μL de PBS, 50 μL da emulsão, 50 μL da solução de AAPH 4 mM e 50 μL do ácido ferúlico, ou do ferulato de etila, ou do BHT em diferentes concentrações finais de 0.25, 0.5 e $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. A leitura foi feita em leitor de placa (Synergy H1 Hybrid Reader Biotek) durante 3 horas com intervalos a cada 10 minutos, no comprimento de onda de 273 nm na temperatura de 37° C. Este ensaio mede o decaimento da absorvância do óleo tungue sob ação do oxidante AAPH (LAGUERRE *et al.*, 2008).

ENSAIOS CELULARES

3.7. Amostras de sangue

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) e recebeu parecer favorável para sua realização, parecer nº 42/2012 (Anexo 1).

As amostras de sangue foram obtidas de voluntários do grupo de pesquisa que doaram seu sangue. O material biológico foi coletado por punção venosa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, Vacutainer®, em tubos estéreis e descartáveis contendo o sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K₂) como anticoagulante.

3.8. Isolamento das células polimorfonucleares e mononucleares:

Método que utiliza os Histopaque 1119 e o Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®) para separação de células por densidade (BOYUM, 1968).

As células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) foram separadas em tubo tipo *falcon* estéril usando 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich®), 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®) e 6 mL do sangue total. Centrifugou-se a 2500 rpm, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação formaram-se duas camadas distintas de células. A camada superior composta por células mononucleadas foi aspirada utilizando-se uma pipeta de Pasteur e separada em tubo tipo *falcon*. A camada inferior composta por células polimorfonucleares também foi aspirada e separada em um segundo tubo. Onde foram lavadas com PBS por três vezes com centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspensas em 1 mL de PBS suplementado. A suspensão de células foi diluída na proporção de 1:20 em líquido de Lázarus e contadas em câmara de Neubauer, após contagem as células foram ajustadas na concentração de 5×10^6 células/mL.

3.9. Teste de viabilidade: exclusão por azul de tripan

O azul de tripan é um corante ácido incorporado apenas por células não viáveis de dano irreversível da membrana, precedendo a morte celular (MINERVINI, FORNELLI, FLYNN, 2004).

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan a 0,5%, onde 50 µL da suspensão de PMN na concentração de 1×10^6 células/mL em tampão PBS foram incubados a 37 °C por tempos diferentes (30 minutos, 1 hora e 1 hora e meia), na presença do ácido ferúlico e de seus ésteres nas concentrações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 mM. Como controle a mesma quantidade de células foi incubada em PBS na ausência das substâncias. Após o período de incubação pipetou-se 20 µL da suspensão de células e 20 µL da solução do corante azul de tripan em um tubo tipo *ependorf* deixando repousar por mais 5 minutos a temperatura ambiente.

Quinhentas células foram contadas em câmara de Neubauer e o resultado dado a partir da porcentagem de células vivas (não coradas, portanto íntegras e viáveis) e mortas (aquelas que se apresentavam azuis, devido à membrana apresentar-se permeabilizada, permitindo a entrada do corante).

A porcentagem de células viáveis foi definida pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = [\text{células vivas} / (\text{células vivas} + \text{células mortas})] \times 100$$

3.10. Citotoxicidade

A citotoxicidade do ácido ferúlico e do ferulato de etila foi avaliada por ensaio de redução do MTT com dois tipos celulares, Hepatoma humano (HepG2) e queratinócitos (HaCaT) (realizado no do laboratório de Imunologia – Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara).

As células foram cultivadas em meio de cultura *Minimum Essential Media* (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . O tapete celular foi tripsinizado, e centrifugado a 1200 rpm por 3 minutos, e então semeadas em placas de 96 poços. Para neutralização da tripsina foi utilizado MEM com soro fetal bovino. A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade com MTT foi de 1×10^6

células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para completa adesão das células.

Em seguida, as células foram tratadas com 1 mL de controle positivo (DMSO a 10%), controle negativo (MEM com soro), e diferentes concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido ferúlico e ferulato de etila (solubilizado em MEM com soro), durante 24 horas.

Após o tratamento o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com PBS (BRUGGISSER *et al.*, 2002) e 100 μL de MTT (1 mg/mL em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a 37 ± 2 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazana (3 a 5 horas).

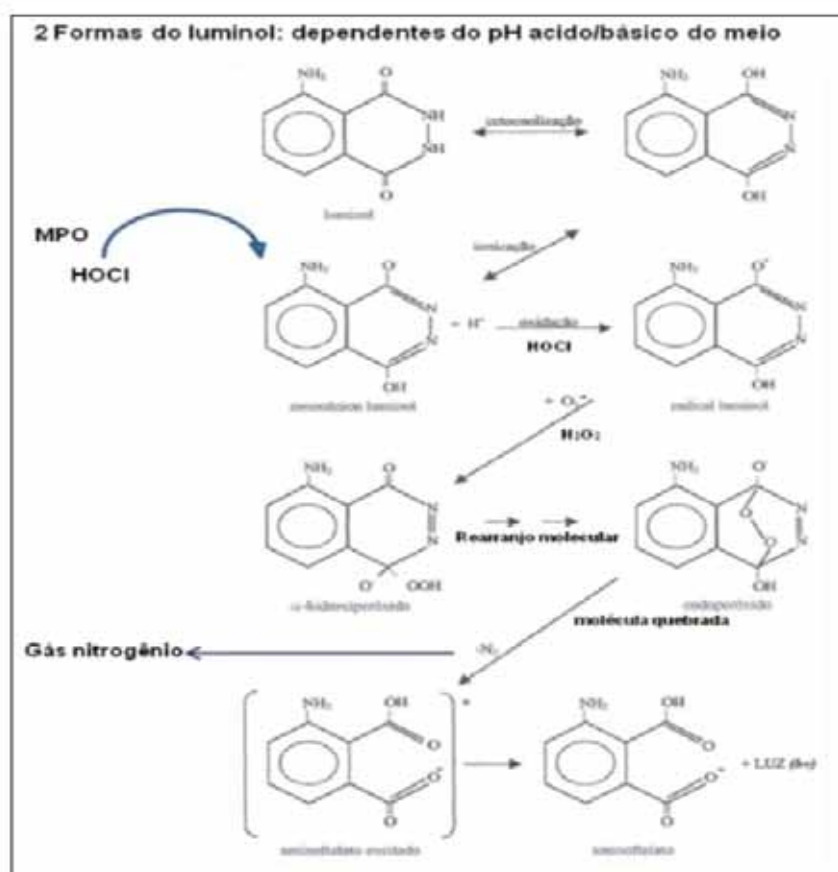
Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica, foi realizada a 595 nm em leitor de placas.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang et al. (2004) e, em seguida foi determinada também a porcentagem de células vivas.

3.11. Efeito inibitório sobre a produção EROs gerados por leucócitos ativados - quimiluminescência dependente de luminol

A oxidação do luminol em meio aquoso gera quimiluminescência, que pode ser obtida através de vários agentes oxidantes tais como: EROs, metaloproteínas, e enzimas como HRP e MPO. Em soluções tamponadas na presença de enzimas, o monoânion luminol é univalentemente oxidado por uma variedade de oxidantes, e posteriormente, o radical superóxido é introduzido, produzindo um alfa-hidroxiperóxido, com posterior adição de intramoléculas e formação de um endoperóxido. Após liberação do N_2 , forma-se o aminoftalato no estado eletronicamente excitado que ao decair ao seu estado fundamental produz fluorescência (SANTOS, SANTOS, COSTA, 1993). A quimiluminescência dependente de luminol é utilizada para a detecção de todas as EROs formadas no *burst* oxidativo, indistintamente (Figura 3).

Figura 3. Reação química dependente de luminol.



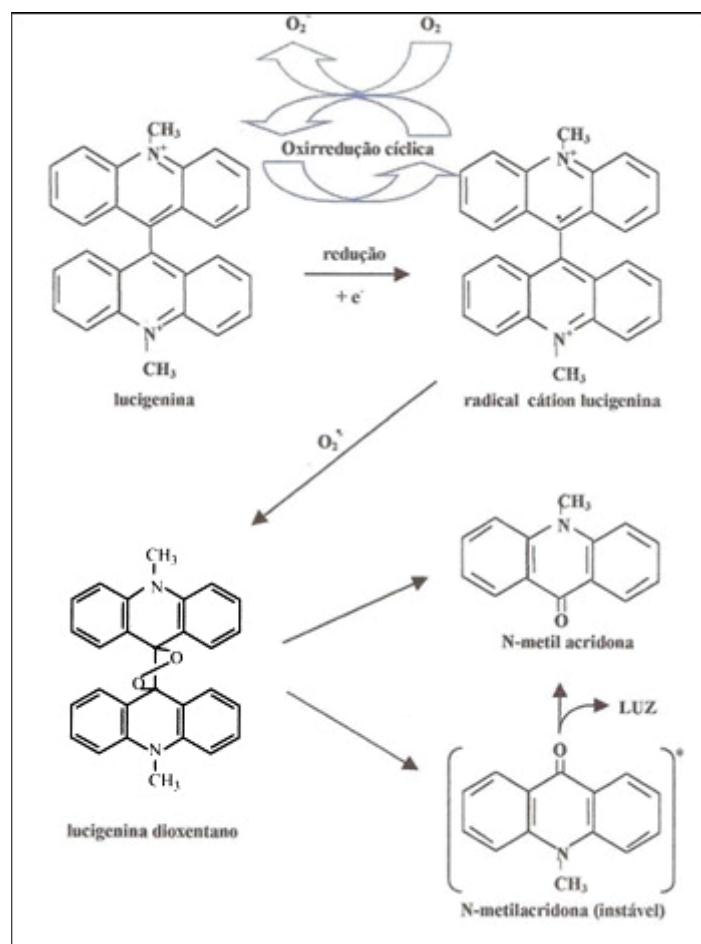
Para o ensaio células PBMC e PMN à $1,0 \times 10^6$ células/mL foram previamente incubados com ácido ferúlico ou seus ésteres alquílicos nas concentrações finais de 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 15 minutos em PBS suplementado. Em seguida foram adicionados o luminol ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e 1,0 mg/mL de zymosan.

A emissão de luz foi monitorada por 30 minutos a 37°C em um luminômetro (BioTek, Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader). A emissão de luz integrada foi utilizada com parâmetro analítico. O potencial inibidor do *burst* oxidativo foi calculado considerando-se a emissão de luz gerada pelo controle, no qual as células foram incubadas na ausência dos compostos testados (KITAGAWA et al., 2003).

3.12. Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por leucócitos ativados - quimiluminescência dependente de lucigenina

Lucigenina (nitrato *bis* – *N* – metil – acridina) tem sido usada especificamente para quantificação da geração do ânion superóxido no *burst* oxidativo de neutrófilos e outras células (GASBARRINI *et al.*, 1998, ALVES *et al.*, 2003). A reação ocorre com a redução da lucigenina para seu radical cátion lucigenina e este reage com o ânion superóxido formando um dioxientano que decompõe-se em duas moléculas de acridina, uma eletronicamente excitada e que emite luz ao voltar ao seu estado fundamental (SPASOJEVIC *et al.*, 2000) (Figura 4).

Figura 4. Esquema da reação da redução de lucigenina



No ensaio, células PMN e PBMC ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram pré-incubadas com ácido ferúlico ou seus ésteres alquílicos (10 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 15 minutos em PBS suplementado. Em seguida foram adicionados $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de lucigenina e $1,0 \text{ mg/mL}$ de zymosan opsonizado, e a luz emitida foi

detectada por 30 minutos a 37° C em um luminômetro (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader BioTek).

A emissão de luz integrada foi utilizada com parâmetro analítico. O potencial inibidor da produção de ânion superóxido foi calculado considerando-se a emissão de luz gerada pelo controle, no qual as células foram incubadas na ausência dos compostos testados (KITAGAWA *et al.*, 2003, KANEGAE *et al.*, 2007).

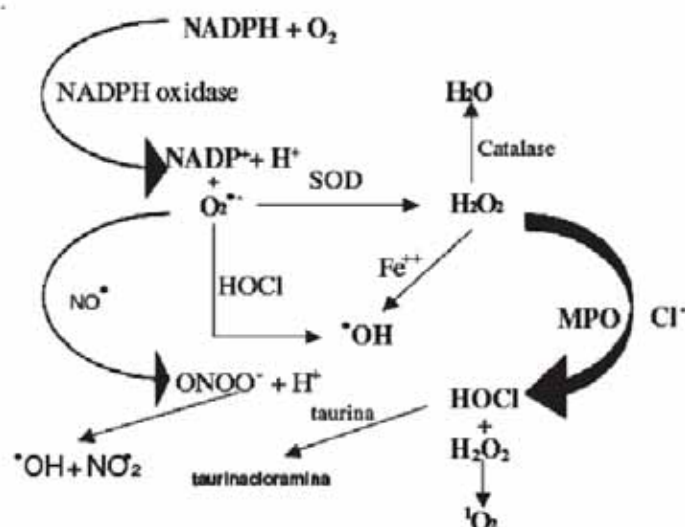
3.13. Inibição da atividade clorinante da MPO

A determinação da atividade clorinante da MPO foi baseada na reação do HOCl produzido com taurina para produzir cloraminas, que oxidam o TMB. O ensaio de TMB é extremamente sensível e foi utilizado para quantificar a produção de HOCl por meio da oxidação de cloreto mediada pela MPO (MALLE *et al.*, 2007).

As reações foram realizadas em placa de 96 poços contendo PBS, taurina (5,0 mM), ácido ferúlico ou do ferulato de etila (nas concentrações finais de 100 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), MPO purificada (20 mM) e H_2O_2 (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A reação foi desencadeada pela adição de H_2O_2 e incubação a 37° C. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 10 μL de catalase (1 mg/mL) e a taurina cloramina acumulada foi detectada pela adição de 50 μL de solução de TMB, onde o produto azul resultante foi detectado espectrofotometricamente a 655 nm usando leitor de placa (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

O potencial inibidor da atividade clorinante da MPO foi calculado considerando-se a quantidade de taurina cloramina produzida pelo controle, no qual as substâncias testadas foram ausentes.

Figura 5. Esquema de formação da taurinaclorâmida pela MPO
(HAMPTON *et al.*, 1998)



3.14. Efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados

A determinação da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos também foi baseada na reação do HOCl produzido com taurina para formar taurina clorâmida, que oxida o TMB (MALLE *et al.*, 2007). A diferença nesse caso é que a MPO e o H_2O_2 foram liberados por neutrófilos estimulados ao invés de serem adicionados à reação. Células PMN ($2,0 \times 10^6$ células/mL) foram pré-incubadas a 37°C em PBS suplementado, contendo 5,0 mM de taurina e 100 ou $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ferúlico ou do ferulato de etila ou 5-fluortriptamina (um excelente inibidor da atividade da MPO, utilizado aqui como controle/padrão), por 10 minutos. Em seguida as células foram estimuladas pela adição de PMA (100 nM) e incubadas por 30 minutos adicionais a 37°C para a liberação de MPO e H_2O_2 . A reação foi interrompida pela adição de 10 μL de catalase (1 mg/mL) e centrifugada a 2000 rpm. Em seguida, 200 μL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços, onde 50 μL de TMB foram adicionados e o ácido hipocloroso produzido mensurado como no método anterior (WORM, BEUKELMAN, BERG *et al.*, 2001).

3.15. Efeito supressor sobre ácido hipocloroso

A determinação da ação sequestradora do ácido ferúlico e do ferulato de etila também foi baseada na reação do HOCl produzido com taurina para produzir cloraminas, que oxidam o TMB. Para este ensaio o HOCl foi adicionado a reação diretamente na placa de 96 poços, já que o objetivo deste ensaio é acompanhar a possível ação sequestrante das substâncias teste.

As reações foram realizadas em placa de 96 poços contendo PBS, taurina (5,0 mM), ácido ferúlico ou o ferulato de etila, nas concentrações finais de 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A reação foi desencadeada pela adição de HOCl 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e incubação a 37° C, por 15 minutos. Após este tempo foi adicionado 50 μL de solução de TMB, onde o produto azul resultante foi detectado espectrofotometricamente a 655 nm usando leitor de placa (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). O potencial sequestrador das substâncias testadas foi calculado considerando-se a quantidade de taurina cloramina produzida pelo controle, no qual as substâncias testadas estavam ausentes (FARIA, *et al.*, 2012).

3.16. Efeito supressor sobre o radical ânion superóxido (xantina/xantina oxidase/ WST-1)

A determinação da inibição de ânion superóxido (pelas substâncias de estudo) produzido a partir da enzima xantina oxidase foi realizada utilizando o sal tetrazólio sulfonado (WST-1) como sonda cromogênica, o qual é solúvel em água e permeável a membrana. Esse ensaio baseia-se na redução do WST-1 pelo radical liberado no meio extracelular, produzindo formazana solúvel, que pode ser medida por absorção a 450 nm. (TAN & BERRIDGE, 2000).

Em microplaca foram adicionados xantina (5 mM), ácido ferúlico ou seu éster nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, WST-1 (2,5 mM) e por último xantina oxidase (0,05 U/mL). A produção de ânion superóxido foi monitorada pelo aumento de absorbância (405 nm) por 15 minutos utilizando um espectrofotômetro para leitura em microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). O efeito inibitório foi calculado tendo como controle o ensaio realizado na ausência das substâncias testes (FARIA, *et al.*, 2012).

3.17. Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados WST-1

O ensaio foi realizado segundo Tan e Berridge (2000) com pequenas modificações. Em microplaca, células PMN ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram pré-incubadas a 37° C durante 15 minutos em PBS suplementado na presença do ácido ferúlico ou do ferulato de etila (concentrações finais de 10 e 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Em seguida, WST-1 ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi adicionado à placa. PMA (100 nM) foi utilizado para estimular a produção do radical ânion superóxido pelas células e a redução do WST-1 foi medida espectrofotometricamente a 450 nm durante 30 minutos, a uma temperatura de 37° C, utilizando um leitor de placas (SpectraMax M2, Molecular Devices). O potencial de inibição foi calculado utilizando a absorbância do controle, o qual as células foram estimuladas com PMA e incubadas na ausência das substâncias testes.

PROCEDIMENTOS FARMACOTÉCNICOS

3.18. Preparo das formulações

Foram preparadas três formulações de emulsões (A, B e C) a fim de comparar seus comportamentos de estabilidade e características sensoriais. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Cosmetologia (LaCos) da FCFAR-Unesp/Araraquara, com supervisão do Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, cujas composições propostas podem ser visualizadas na Tabela 2.

TABELA 2: Composição percentual do sistema emulsionado

International Nomenclature Cosmetics Ingredients (INCI)	Nomenclatura (Língua portuguesa)	% em peso		
		A	B	C
Cetearyl Alcohol	Álcool cetoesteárico	6,00	6,00	6,00
Ceteareth-20	Álcool cetoestearílico etoxilado	3,00	1,00	1,00
Cetyl Palmitate	Palmitato de cetila	3,00	1,50	1,50
Isopropyl Myristate	Miristato de isopropila	4,00	0,00	0,00
Octyl stearate	Estearato de octila	0,00	1,50	1,50
Caprylic Capric Triglyceride	Triglicerídeo Capro-Caprílico	0,00	1,00	1,00
EDTA	EDTA	0,10	0,05	0,05
BHT	BHT	0,05	0,05	0,05
Propylene glycol	Propilenoglicol	3,00	3,00	3,00
PEG-75 lanolin	PEG-75 Lanolina	2,00	2,00	0,00
Phenova®	Phenova®	0,20	0,20	0,20
Water	Água	78,65	83,70	85,70

Os constituintes das formulações foram devidamente pesados conforme sua concentração nas fórmulas propostas em recipientes apropriados e balança semi-analítica.

As formulações foram preparadas por mistura direta, padronizada, de fase oleosa previamente pesada em béqueres de capacidade adequada, devidamente aquecida até 60-70° C, seguida pela adição da fase aquosa a 70-80° C com agitação manual ou mecânica até completa homogeneização.

As formulações propostas passaram por testes de estabilidade preliminar (centrifugação) que forneceram indicações sobre o comportamento do produto em determinado intervalo de tempo.

3.19. Escolha da formulação para continuidade dos experimentos

Esta etapa teve como objetivo, definir a formulação que foi usada para continuação dos estudos propostos e incorporação do F0 e do F2 em função dos melhores resultados obtidos dos testes preliminares de estabilidade.

O F0 e o F2 foram incorporados na fase graxa (oleosa) onde pode-se observar sua completa solubilização durante o processo de aquecimento para fusão dos materiais graxos sólidos.

3.20. Quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila

Foi utilizado um espectrofotômetro (Beckman Du® 530 – Life Science UV/VIS Spectrophotometer) e cubeta de vidro de 1,5 mL para a quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila. Utilizando os seguintes comprimentos de onda de 298 nm para o F0 e 299 nm para o F2.

3.21. Padronização da metodologia de quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila por espectrofotometria UV/VIS

Para padronizar a metodologia foram analisados: a especificidade, a linearidade, a precisão, a sensibilidade, o limite de quantificação, o limite de detecção e a exatidão deste método, segundo a Resolução-RE Nº899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

- **Linearidade:** Foram obtidas três curvas experimentais, a partir de, pelo menos, dez concentrações diferentes do F0 e do F2, sendo que cada uma das concentrações em cada uma das curvas foi preparada em triplicata.

- **Exatidão:** A exatidão foi determinada pela avaliação da recuperação, ou seja, quantidades conhecidas de F0 e do F2 foram utilizadas e a relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica foi avaliada.

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

- **Limite de detecção:** A estimativa do limite de detecção foi feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, por meio da equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações da substância ativa próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

- **Limite de quantificação:** O limite de quantificação do método pode ser calculado através da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do ingrediente ativo próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

- **Precisão:** Pode ser considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrida), Precisão intermediária (precisão inter-corridas) e Reprodutibilidade (precisão inter-manipulador).

A precisão do método analítico foi calculada como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100, \text{ onde:}$$

DPR é o desvio padrão relativo,

DP é o desvio padrão, e,

CMD é a concentração média determinada.

- **Repetitividade ou precisão intra-corrida:** A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste. Este procedimento foi repetido em um curto intervalo de tempo, ou seja, foi realizado

durante a manhã e durante a tarde de um mesmo dia, com o mesmo equipamento e operador.

- **Precisão intermediária ou precisão inter-corridas:** A precisão intermediária é a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes. Portanto, este parâmetro foi verificado em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, em dias diferentes.

- **Reprodutibilidade:** É a concordância entre os resultados obtidos com manipuladores diferentes ou aparelhos diferentes. Também foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada.

- **Especificidade e Seletividade:** é a capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, como impurezas ou produtos de degradação. Neste método foram avaliadas em três concentrações (baixa, média e alta) conhecidas do F0 e do F2 contaminadas com quantidades adequadas do creme base em triplicata. Em seguida, os resultados obtidos foram comparados com o da curva analítica construída. Onde foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

- **Robustez:** A robustez foi determinada através da variação do fabricante de um dos solventes utilizados no método, o dimetilsulfóxido (DMSO). A robustez do método foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos valores obtidos, com os descritos na curva analítica.

3.22. Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade têm como princípio básico à garantia da qualidade e manutenção das características do produto durante seu prazo de validade e foram realizados conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA, Série Qualidade, volume 1 (2004).

Alguns aspectos devem ser considerados na estabilidade: físicos (aspecto, cor, odor, uniformidade, comportamento reológico, entre outros), químicos (integridade da estrutura química, teor de ingrediente ativo, outros),

microbiológicos (conservar características microbiológicas – cumprir BPM, sistemas conservantes - teste do desafio), e além desses também é necessário considerar a manutenção das características do produto quanto à funcionalidade (atributos mantidos sem alterações) e segurança (não devem ocorrer alterações que comprometam uso).

- **Teste de Centrifugação:** Simula uma situação de estresse, foi realizado após 24 horas da preparação do creme, para avaliar a manutenção da estabilidade das formulações desenvolvidas quanto à separação de fases e coalescência. A centrifugação foi realizada a 3000 rpm durante 30 minutos com alíquota (5g) das formulações propostas (ANVISA, 2004).

- **Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo (Estabilidade preliminar):**

Este teste tem duração de 15 dias, seu objetivo é auxiliar e orientar a escolha das formulações. As formulações em teste foram submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. As amostras foram submetidas às diferentes condições como a temperatura ambiente, a exposição à luz, a temperatura elevada $T = 45 \pm 2^\circ \text{C}$ e resfriamento em refrigeradores (freezer $T = -5 \pm 2^\circ \text{C}$ e geladeira $T = 5 \pm 2^\circ \text{C}$) e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento. Durante este teste foram avaliadas características organolépticas (aspecto, cor, odor) e características físico-químicas (valor de pH, viscosidade e densidade), separação de fases e/ou coalescência.

- **Teste de Estabilidade Acelerada, Estabilidade Normal ou Exploratória:**

Tem duração de 90 dias e neste teste as amostras foram armazenadas a condições, como a temperatura ambiente, a exposição à luz, a temperatura elevada $T = 45 \pm 2^\circ \text{C}$ e resfriamento em refrigeradores (freezer $T = -5 \pm 2^\circ \text{C}$ e geladeira $T = 5 \pm 2^\circ \text{C}$), conforme preconiza o Guia de estabilidade da ANVISA, sendo útil também para estimar o prazo de validade do produto.

Nesta etapa foram avaliadas as características organolépticas, densidade, estabilidade química, pH e viscosidade.

3.23. Estudo do comportamento reológico

A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações teste e produtos finais (BARRY, 1993).

O comportamento reológico foi caracterizado para as formulações desenvolvidas, utilizando um Reômetro (AR 2000 ex), como uma ferramenta para avaliação da estabilidade do produto a fim de auxiliar a escolha da melhor formulação. Os ensaios foram realizados utilizando um sensor cone/placa (1.59) e os dados analisados pelo software Rheology Advantage Instruments Control.

Foi determinado o comportamento reológico das emulsões, realizando os ensaios de curva de fluxo utilizando para isso uma faixa de taxa de cisalhamento de 0 a 100 Pa/s⁻¹ para a curva ascendente durante 120 segundos e de 100 a 0 Pa/s⁻¹ para a curva descendente durante 120 segundos.

Os ensaios reológicos de varredura de tensão e varredura de frequência foram realizados para analisar a viscosidade dinâmica (η^*) e o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') da amostra.

Para o teste de varredura de tensão, foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0,1 a 10 Pa. O teste de varredura de frequência foi realizado utilizando uma faixa de frequência de 0,1 a 50 Hz. Deste modo, foram determinados o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'').

O ensaio de fluência e relaxação foi realizado para determinar a viscoelasticidade da amostra utilizando, para isso, tensão de cisalhamento de 1 Pa, durante 5 minutos para fluência e 5 minutos para a relaxação.

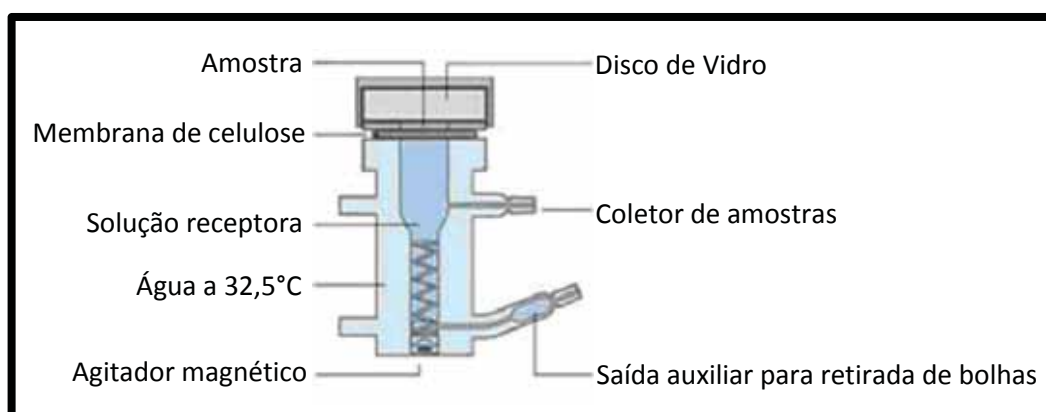
Todos os ensaios foram realizados à temperatura constante de 25° C e utilizando cerca de 1 g de amostra para cada teste. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. E os gráficos foram plotados no software GraphPad Prism 5.

3.24. Avaliação do perfil de liberação de sistemas emulsionados contendo ácido ferúlico e do ferulato de etila

A avaliação da liberação das emulsões com F0 e F2 foi efetuada de acordo com metodologia descrita por Marquele *et al.* (2006) e OECD (2004).

Os ensaios de liberação foram desenvolvidos utilizando células de Franz modificadas (Figura 6) com área de difusão de 1,77 cm², no equipamento Microette (Hanson Research) e membrana de acetato de celulose, 0,45 µmol L⁻¹ (Whatman® - Sigma-Aldrich).

Figura 6. Célula de Franz modificada (modificado de www.hansonresearch.com).



O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 7,0 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) com 5% de DMSO. Amostras de 270 mg das emulsões foram acondicionadas sobre a membrana.

A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a 32,5 ± 5° C por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas.

A quantidade de F0 e F2 liberado da formulação foi avaliada após ½, 1, 2, 4, 6 e 8 horas de ensaio.

Os experimentos foram repetidos cinco vezes para cada tempo. Como a quantidade de amostra utilizada para a quantificação era de 1,5 mL por amostra e as quantificações foram realizadas em triplicata não foi possível utilizar a reposição do meio receptor. Sendo assim, para cada tempo de coleta foram realizados experimentos independentes.

A quantidade de F0 e F2 liberado foi avaliada por meio das absorbâncias das amostras sendo descontado o valor do branco (creme base).

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Todos os testes foram realizados em triplicata com repetição de no mínimo três vezes.

Nos ensaios com células foi coletado sangue de indivíduos diferentes (grupo do laboratório).

A análise estatística e plotagem dos gráficos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

ENSAIOS QUÍMICOS

5.1. Efeito supressor sobre o radical livre DPPH

No ensaio com o radical DPPH, o F0 (Cl_{50} 23,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$) apresentou melhor atividade antioxidante comparado aos seus ésteres, tendo um valor de Cl_{50} próximo ao trolox, utilizado como antioxidante de referência (Cl_{50} 17,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Também foi utilizado o BHT (Cl_{50} 65,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$) como substância teste para comparação com o ácido ferúlico e seus ésteres, já que é muito usado no mercado como conservante em emulsões frente à oxidação (Tabela 3).

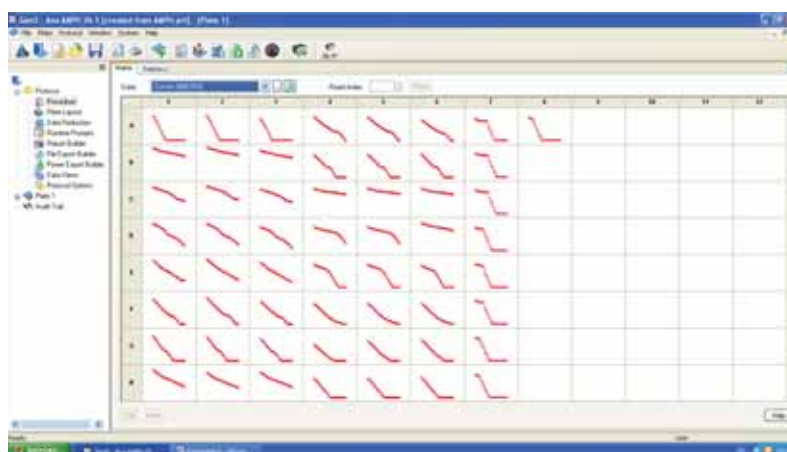
TABELA 3: Valores de Cl_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) referentes ao ensaio com radical DPPH

Substâncias	Cl_{50}	Desvio Padrão
F0	23,54	0,51
F1	85,47	0,67
F2	59,72	0,24
F4	69,06	0,19
F7	74,75	0,88
BHT	65,02	0,44
Trolox	17,44	0,33

5.2. Efeito supressor sobre os radicais peroxila (AAPH/ Piranina)

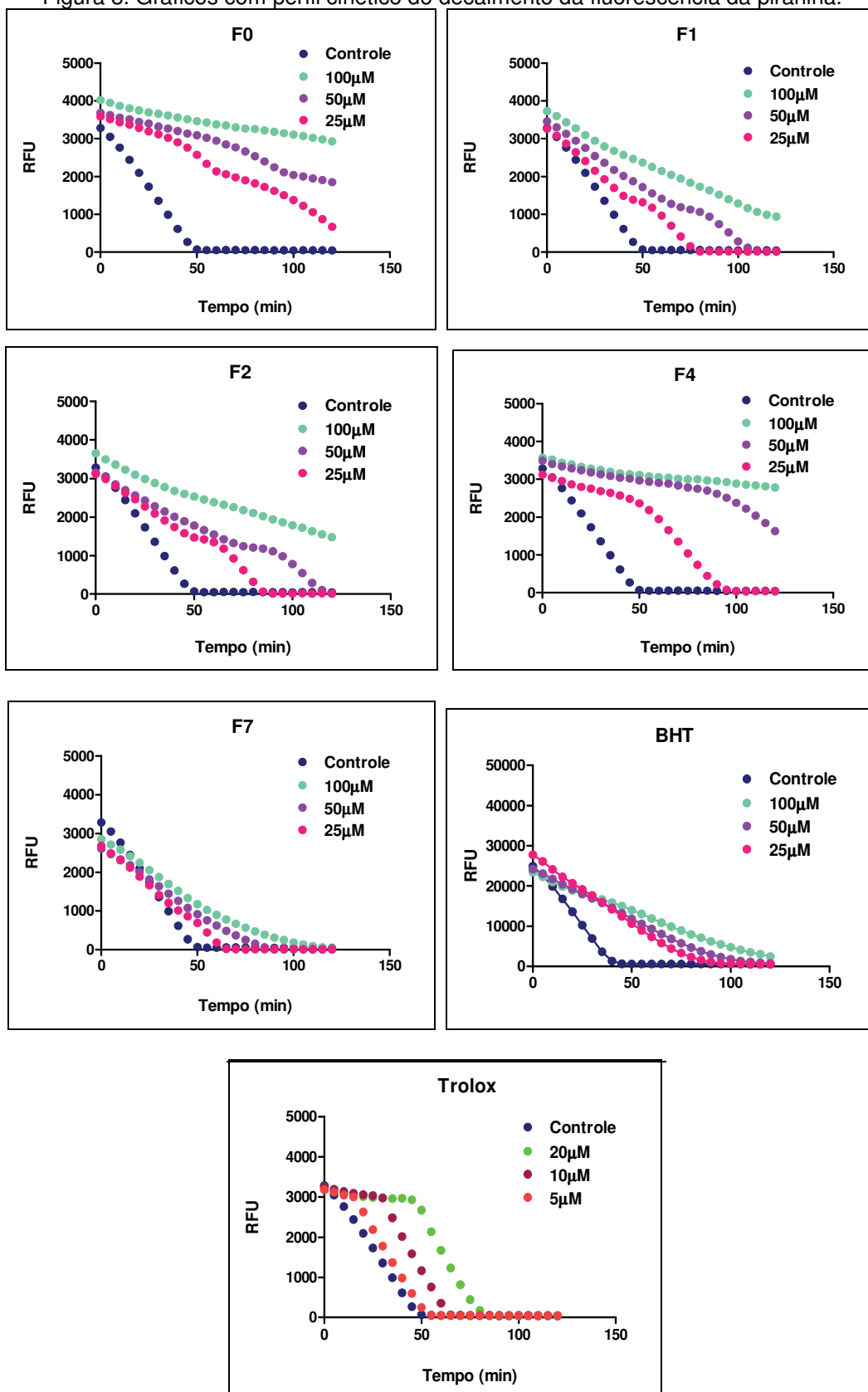
O ensaio com o azo composto AAPH foi baseado no decaimento da fluorescência da sonda piranina quando esta é submetida à oxidação por radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) (FARIA, *et al.*, 2012). Na Figura 7 podemos observar como os dados são extraídos no formato do programa.

Figura 7. Dados extraídos do programa Gen5.



A partir dos valores obtidos na Figura 7 foram realizados os gráficos com o perfil cinético das amostras (Figura 8).

Figura 8. Gráficos com perfil cinético do decaimento da fluorescência da piranina.



Então, foi calculado a diferença do controle pelas amostras, e a partir destes valores foi feito o cálculo de regressão linear, onde foi encontrado o coeficiente angular da reta (*slope*). O *slope* de cada amostra foi dividido pelo *slope* da substância padrão o trolox.

Neste ensaio de fluorescência utilizando AAPH e piranina, o ácido ferúlico apresentou atividade antioxidante mais potente que os ésteres alquílicos e ao BHT. O F0 e o F4 apresentaram 20% da atividade do trolox, enquanto os demais ésteres e o BHT apresentaram valores inferiores (Tabela 4).

TABELA 4: Avaliação da atividade antioxidante frente à ação redutora do radical peroxila (TEAC)

Substâncias	TEAC	Desvio Padrão
F0	0,22	0,04
F1	0,17	0,01
F2	0,12	0,05
F4	0,21	0,02
F7	0,02	0,05
BHT	0,07	0,03
trolox	1,00	0,22

Os valores deste ensaio foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao trolox onde compara diretamente a atividade antioxidante das amostras testadas ao trolox.

5.3. Efeito supressor sobre radicais peroxila (degradação de óleo tungue)

Neste ensaio também foi utilizado o gerador de radicais o AAPH, onde foi avaliada a inibição da peroxidação lipídica na sonda do óleo tungue medindo o decaimento da absorbância do mesmo (LAGUERRE *et al.*, 2008).

Figura 9. Potencial antioxidante do F0, F2 e do BHT.

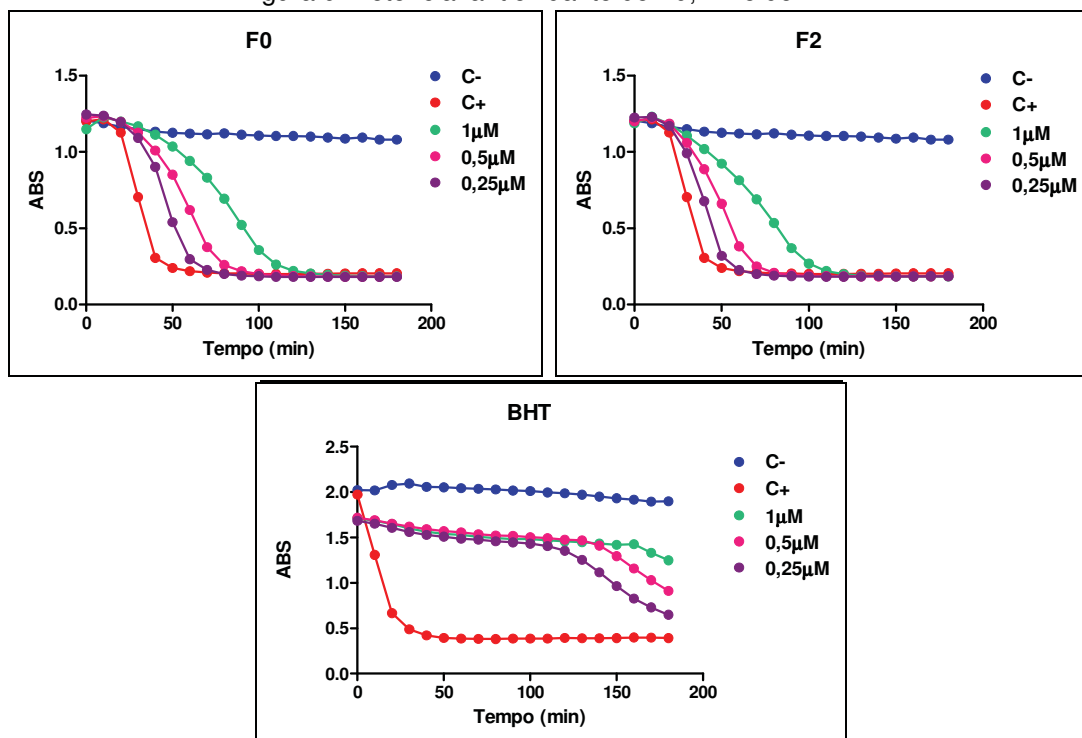


TABELA 5: Avaliação do potencial antioxidante frente ao radical peroxila

	Coeficiente angular	Amostra/Trolox (TEAC)	Desvio Padrão
F0	0,68	1,25	0,02
F2	0,59	1,09	0,02
BHT	0,39	0,72	0,08
trolox	0,54	1,00	0,03

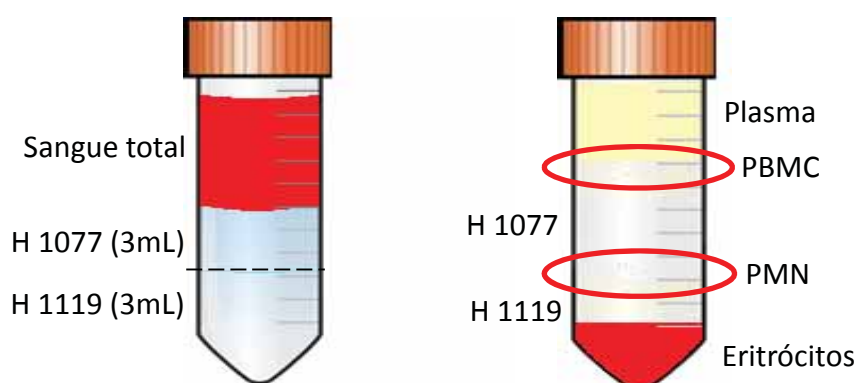
Na Tabela 5 pode-se observar que o F0 apresentou atividade 25% maior frente ao trolox e quando comparado ao BHT também apresentou o potencial antioxidante superior.

ENSAIOS CELULARES

5.4. Isolamento das células polimorfonucleares e mononucleares

A obtenção das células PMN e PBMC foi realizado utilizando dois gradientes de densidades diferentes: Histopaque 1077 e Histopaque 1119 (item 3.8.). A Figura 10 ilustra o resultado da centrifugação do sangue total com o Histopaque de diferentes gradientes de densidade.

Figura 10. Demonstração ilustrativa da separação celular por Histopaque 1077 e 1119.



5.5. Teste de viabilidade: exclusão pelo corante azul de tripan

Como relatado anteriormente no item 3.9. (Material e Métodos), esse teste foi utilizado para avaliação da viabilidade celular das células PMN e PBMC frente às diferentes concentrações do ácido ferúlico e seus ésteres.

Para todas as substâncias, nas diferentes concentrações utilizadas nos ensaios deste estudo, foi observada viabilidade celular acima de 95%, valor esse próximo aos controles sem os compostos químicos.

5.6. Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com as células HepG2 e HaCat. A primeira é uma linhagem de células de hepatoma humano, selecionada por ser um modelo muito utilizado de estudo de células metabolizadoras, permitindo a avaliação da toxicidade do metabólito formado, a partir do produto em estudo. A segunda, uma linhagem de queratinócitos, foi escolhida por se tratar de estudo com ativo para uso também dermatológico.

Na avaliação da citotoxicidade para as duas linhagens celulares a viabilidade celular foi acima de 98%, podendo-se concluir que o ácido ferúlico e

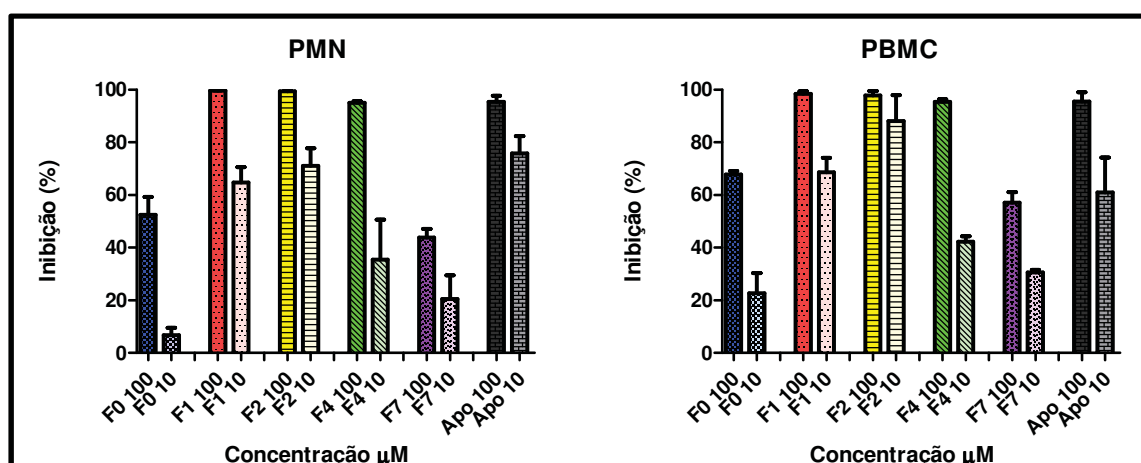
o ferulato de etila não apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens celulares testadas. Considerando a máxima concentração testada de 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5.7. Efeito inibitório sobre a produção de EROs gerados por células PMN e PBMC ativadas - quimiluminescência dependente de luminol

No presente estudo avaliamos a inibição da produção de EROs em neutrófilos (PMN) e células mononucleares (PBMC) do ácido ferúlico e ferulatos de alquila. Por meio deste ensaio observamos na Figura 11 que os ésteres, possuem um potencial de redução da QLDL superior ao ácido ferúlico (F0), mas quando comparados a Apocinina (Apo) (padrão mais utilizado para ensaios de inibição de EROs) apresentam-se em valores inferiores, sendo: Apo > F2 > F1 > F4 > F7 > F0 comparando as concentrações de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ensaio com células PMN.

O motivo dessa maior supressão das EROs, possivelmente se da pelo caráter lipofílico destes ésteres, possuindo assim maior afinidade por membranas celulares. O resultado deste ensaio difere dos químicos, por exemplo, o teste do DPPH, no qual o ácido ferúlico apresentou potencial antioxidante maior que seus ésteres.

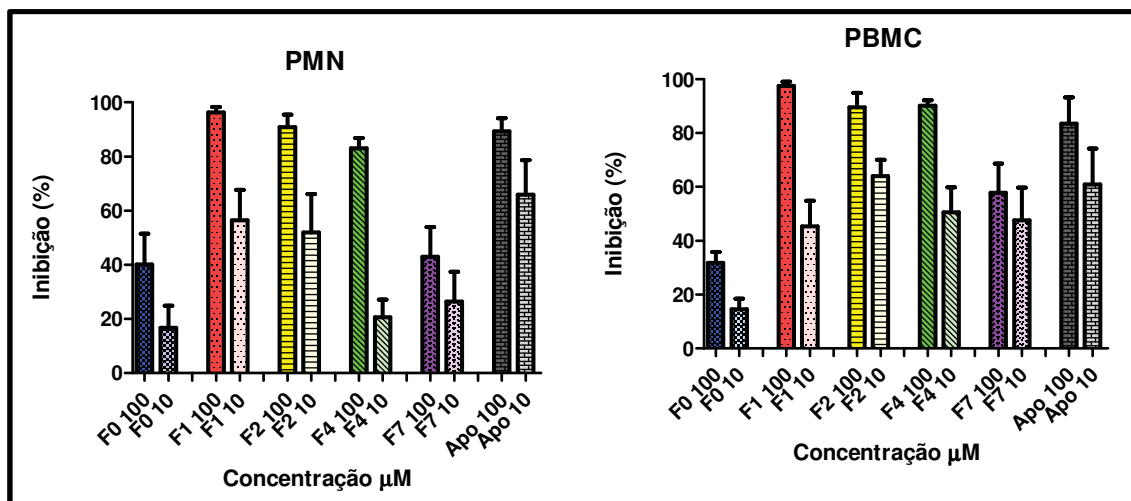
Figura 11. Porcentagem de inibição do F0 e seus ésteres em células PMN e PBMC.



5.8. Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerados por células PMN e PBMC ativadas – quimiluminescência dependente de lucigenina

Quando comparamos os gráficos de luminol e lucigenina (Figuras 11 e 12) percebemos que seus dados forma semelhantes, porém para ensaios diferentes, pois no caso do ensaio com luminol, vimos a ação inespecífica do ácido ferúlico e de seus ésteres na supressão de EROs de modo geral, já para o ensaio usando a lucigenina como sonda, os resultados se dão pela inibição de ânion superóxido responsável pelo início do *burst* oxidativo, no qual os ésteres do ácido ferúlico se mostraram melhores, supressores do que o próprio ácido ferúlico (F0), destacando-se novamente os ferulatos de metila (F1), etila (F2) e butila (F4) (Figura 12). Quando comparado a Apo tanto o F0 quanto seus ésteres possuem atividade inferior, isso fica mais evidente quando comparamos as concentrações de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde $\text{Apo} > \text{F1} = \text{F2} > \text{F7} > \text{F4} > \text{F0}$.

Figura 12. Porcentagem de inibição do ânion superóxido por F0 e seus ésteres em células PMN e PBMC.

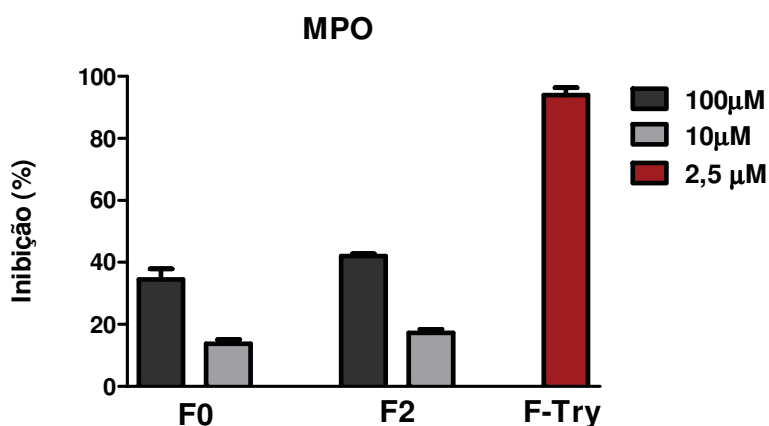


5.9. Inibição da atividade clorinante da MPO

Neste ensaio da atividade clorinante da MPO, o F0 e o F2 não apresentaram potencial inibidor significativo quando comparados ao padrão que para esse ensaio foi a 5-fluortriptamina (F-Try) (Figura 7), porém, como nos ensaios anteriores a atividade de supressão dos ferulatos de metila (F1), etila (F2) e butila (F4) foram similares, indicando que os ésteres devido a sua

cadeia alquílica aumenta lipofilicidade e assim tendo uma maior atividade frente aos ensaios *ex vivo* quando comparados com o F0, desta forma, por meio desses resultados, selecionamos para a próxima etapa do projeto, o **ferulato de etila** que é uma substância comercial (Sigma-Aldrich®) para dar início à incorporação nas bases das emulsões.

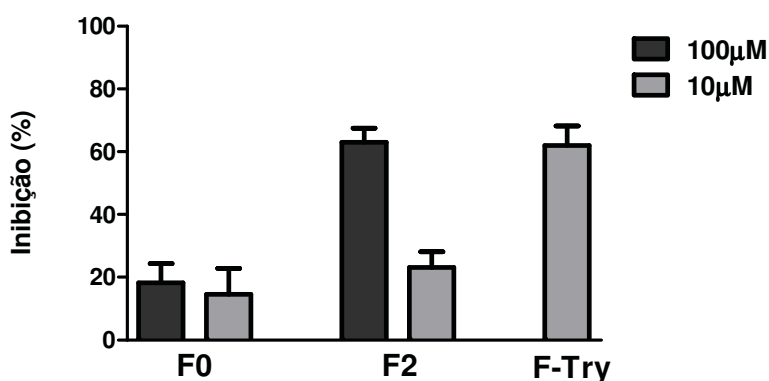
Figura 13. Porcentagem de inibição da atividade clorinate da MPO.



5.10. Efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados

Por meio deste ensaio podemos observar que o ferulato de etila (F2) apresentou potencial inibitório da produção de ácido hipocloroso significativo quando comparado ao ácido ferúlico (F0), já quando comparado ao controle 5-fluortriptamina (F-Try) na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou atividade inibitória dez vezes inferior (Figura 14).

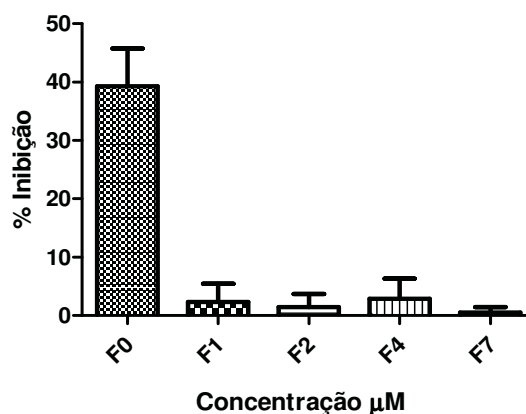
Figura 14. Porcentagem de inibição da produção de ácido hipocloroso.



5.11. Supressão do ácido hipocloroso

Neste ensaio livre de células podemos averiguar o efeito contrário aos ensaios anteriores, sendo o ácido ferúlico (F0) mais potente que seus ésteres evidenciando que a cadeia lateral dos ésteres é essencial para interação com a membrana lipídica das células (Figura 15).

Figura 15. Ação *scavenger* do ácido ferúlico e seus ésteres.

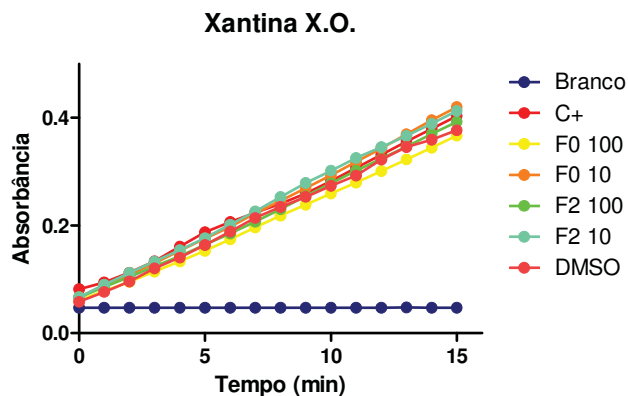


5.12. Efeito supressor sobre o radical ânion superóxido (xantina/xantina oxidase/WST-1)

Ambos os ensaios (Xantina/ XO, WST-1) foram realizados com o objetivo de confirmar o potencial inibitório das substâncias testadas no ensaio de lucigenina. Todos esses ensaios são baseados na captura do radical ânion superóxido, mais diferentes entre si (itens 3.16. e 3.17.).

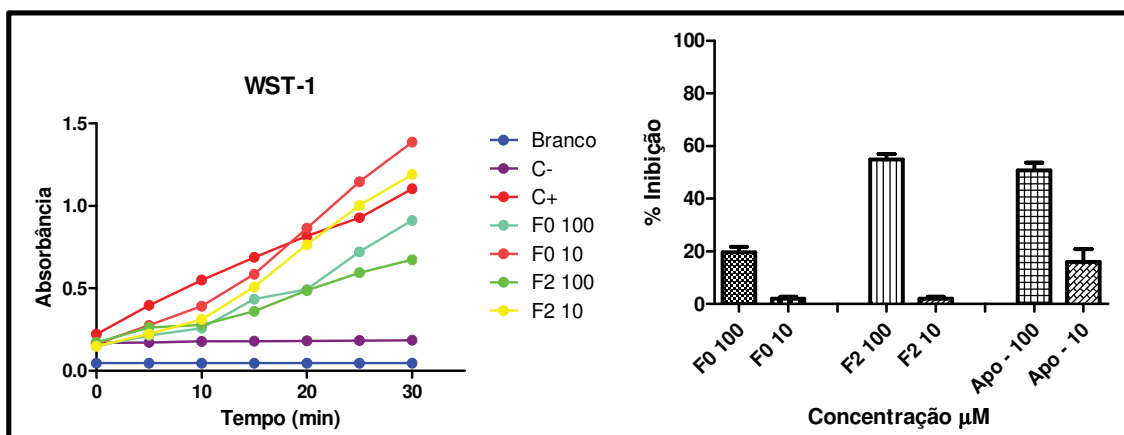
Comparando os gráficos (Figuras 16, 17 – p. 63) com o ensaio realizado anteriormente (Figura 12 – p. 60) podemos concluir que tanto o ácido ferúlico quanto seus ésteres possuem potencial inibitório da enzima NADPH - oxidase, devido ao resultado negativo observado no ensaio com a xantina na presença da xantina oxidase. Neste ensaio o que se avalia é a formação do ânion superóxido pela via da hipoxantina diferente dos outros dois que avaliam a formação do ânion superóxido pela via da NADPH - oxidase.

Figura 16. Perfil cinético do decaimento da absorvância



5.13. Efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por neutrófilos ativados (WST-1)

Figura 17. Gráficos do perfil cinético e porcentagem de inibição do ânion superóxido com WST-1



PROCEDIMENTOS FARMACOTÉCNICOS

5.14. Preparo das formulações

As formulações propostas (Tabela 2 – p. 44) passaram por testes de centrifugação, onde amostras de cada uma das formulações foram centrifugadas a fim de avaliar a manutenção da estabilidade quanto à separação de fases e coalescência. A centrifugação foi a 1000, 2000 e 3000 rpm durante 5 minutos. Não ocorreu nenhuma modificação na estrutura das formulações submetidas ao teste.

5.15. Escolha da formulação para continuidade dos experimentos

A formulação escolhida para dar continuidade aos experimentos foi a formulação C, por apresentar características sensoriais mais agradáveis e por ter mantido sua estabilidade no teste de centrifugação. As demais formulações foram descartadas.

Na formulação escolhida (C) foram incorporados em separado o ácido ferúlico e o ferulato de etila de tal forma a obter-se as formulações F0 e F2. Onde a concentração de cada um foi determinada em função dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante feitos anteriormente (Tabela 6).

TABELA 6: Composição percentual do sistema emulsionado escolhido para incorporação do ácido ferúlico e ferulato de etila.

International Nomenclature Cosmetics Ingredients (INCI)	Nomenclatura (Língua portuguesa)	% em peso (g)		
		CB	F0	F2
Ferulic acid	Ácido ferúlico	---	0,038	---
Ethyl ferulate	Ferulato de etila	---	---	0,044
Cetearyl alcohol	Álcool cetoesteárico	6,00	6,00	6,00
Ceteareth-20	Álcool cetoestearílico etoxilado	1,00	1,00	1,00
Cetyl palmitate	Palmitato de cetila	1,50	1,50	1,50
Octyl stearate	Estearato de octila	1,50	1,50	1,50
Caprylic capric triglyceride	Triglicerídeo capro-caprílico	1,00	1,00	1,00
EDTA	EDTA	0,05	0,05	0,05
BHT	BHT	0,05	0,05	0,05
Propylene glycol	Propilenoglicol	3,00	3,00	3,00
PHENOVA	PHENOVA	0,20	0,20	0,20
Water	Água	85,70	85,66	85,65

*CB= Creme base; F0= Ácido ferúlico; F2= Ferulato de etila

Tanto o ácido ferúlico quanto o ferulato de etila foram incorporados na fase oleosa da emulsão descrita na Tabela 6, onde a concentração dos mesmos foi definida de acordo com o potencial antioxidante e potencial citotóxico definidos em ensaios anteriores.

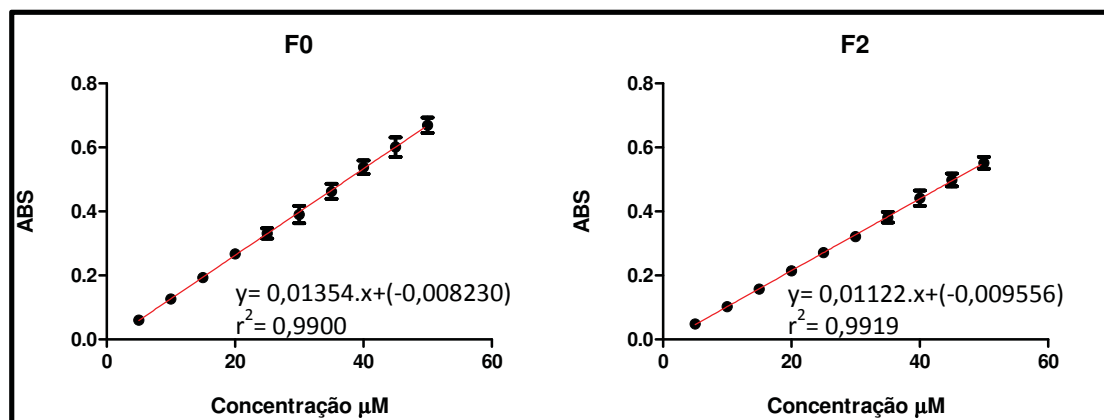
Como as concentrações dos ensaios anteriores estavam em molaridade, escolhemos trabalhar como a concentração de 2 mM para o F0 e F2, que transformando em mg/g ficaram 0,388 mg/g F0 e 0,444 mg/g F2.

5.16. Padronização da metodologia de quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila por espectrofotometria UV-VIS

- Linearidade:

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Foram construídas duas curvas analíticas diferentes utilizando 10 concentrações (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) diferentes do ácido ferúlico e do ferulato de etila.

Figura 18. Regressão linear F0 e F2



Desta forma, o método foi considerado linear, pois segundo a ANVISA (2003), para que isto aconteça os valores de R devem ser maiores que 0,99 comportamento este observado nas curvas construídas.

Nas curvas obtidas os valores dos coeficientes de correlação (R) são de 0,9900 (ácido ferúlico – F0) e 0,9919 (ferulato de etila – F2) a intersecção com o eixo y é igual a -0,008230 e -0,009556 e o coeficiente angular é igual a 0,01354 e 0,01122. Estes valores são os parâmetros necessários na obtenção

da curva analítica que foram utilizados posteriormente para a quantificação do ácido ferúlico e do ferulato de etila.

- Exatidão:

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

Para isto, concentrações conhecidas do ácido ferúlico e posteriormente do ferulato de etila, denominadas concentrações teóricas, foram submetidas à leituras no espectrofotômetro, por meio da equação obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003), como apresentado nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7: Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do ácido ferúlico

F0						
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Médias	Desvio padrão	Exatidão (%)
20	19,29	19,21	19,29	19,26	0,05	96,32
35	35,17	35,02	35,10	35,10	0,08	100,28
50	50,53	50,16	50,53	50,41	0,21	100,81

TABELA 8: Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do ferulato de etila

F2						
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Médias	Desvio padrão	Exatidão (%)
15	15,38	15,47	15,38	15,41	0,05	102,73
30	29,19	28,21	28,66	28,69	0,49	95,63
45	42,83	42,65	42,74	42,74	0,09	94,98

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o método é preciso, uma vez que não houve variações maiores que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais obtidas nos ensaios realizados (ANVISA, 2003).

- Limite de quantificação e Limite de detecção (sensibilidade):

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

O valor calculado segundo a equação descrita no item 3.22. esta descrito nas tabelas, sendo esta a menor concentração que pode ser determinada pelo método em estudo.

E o limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação descrita no item 3.22. Os valores estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9: Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do método analítico de quantificação do ácido ferúlico

F0	
Intercepção com o eixo Y	
Curva 1	-0,00178
Curva 2	-0,00213
Curva 3	-0,02078
Desvio Padrão	0,01087
Coeficiente angular	73,9367
Limite de detecção	0,00044
Limite de quantificação	0,00147

TABELA 10: Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do método analítico de quantificação do ferulato de etila

F2	
Intercepção com o eixo Y	
Curva 1	-0,017270
Curva 2	-0,006887
Curva 3	-0,004533
Desvio Padrão	0,006777
Coeficiente angular	89,16
Limite de detecção	0,00023
Limite de quantificação	0,00076

Sendo assim, o método analítico é capaz de detectar a concentração mínima de 0,00147 µg/mL de ácido ferúlico e 0,00076 µg/mL de ferulato de etila.

- Precisão:

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrida), Precisão intermediária (precisão inter-corridas) e Reprodutibilidade (precisão inter-manipulador).

- Repetitividade ou precisão intra-corrida:

Segundo a metodologia descrita pela ANVISA (2003), os valores do desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5%. Os valores obtidos neste ensaio estão descritos nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11: Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.

Repetitividade F0 (precisão intra-corrida)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	Manhã			Tarde					
20	20,55	20,03	20,03	20,10	18,85	19,07	19,80	0,61	3,08
35	33,77	33,25	33,84	33,40	33,55	34,82	33,95	0,69	2,03
50	53,94	50,60	49,94	48,46	48,61	47,87	49,92	2,03	4,06

TABELA 12: Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.

Repetitividade F2 (precisão intra-corrida)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	Manhã			Tarde					
15	15,11	15,38	15,38	13,86	14,22	13,86	14,69	0,69	4,67
30	28,48	28,83	28,66	28,66	29,73	28,30	28,95	0,65	2,25
45	44,97	45,50	45,41	42,65	43,36	43,63	44,36	1,13	2,54

Nenhuma das concentrações avaliadas apresentou $\text{DPR} > 5\%$, portanto, o método apresenta repetitividade.

- Precisão intermediária ou precisão inter-corrida:

O mesmo procedimento foi realizado para avaliação da precisão intermediária, e os valores de DPR também não foram superiores a 5% (Tabelas 13 e 14).

TABELA 13: Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do ácido ferúlico

Precisão intermediária F0 (inter-corrida)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	Dia 1			Dia 2					
20	20,99	21,58	21,65	20,55	20,03	20,03	20,69	0,73	3,51
35	35,76	36,65	-	33,77	33,25	33,84	34,86	1,32	3,79
50	51,94	52,60	51,71	53,94	50,60	49,94	51,53	1,47	2,84

TABELA 14: Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do ferulato de etila

Precisão intermediária F2 (inter-corrida)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	Dia 1			Dia 2					
15	15,29	15,64	15,73	15,11	15,38	15,83	15,36	0,26	1,71
30	31,06	30,88	30,97	28,48	28,83	28,66	29,84	1,16	3,90
45	47,55	47,19	47,91	44,97	45,50	45,41	46,22	1,28	2,76

- Reprodutibilidade:

Mais uma vez, os valores de DPR não ultrapassaram 5% (Tabelas 15 e 16).

TABELA 15: Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.

Reprodutibilidade F0 (precisão inter-laboratorial)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	1			2					
20	20,18	20,18	20,40	20,55	20,03	20,03	20,20	0,21	1,03
35	33,52	33,52	35,39	33,77	33,25	33,84	34,04	0,82	2,41
50	49,65	49,65	50,24	53,94	50,60	49,94	50,57	1,52	3,01

TABELA 16: Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.

Reprodutibilidade F0 (precisão inter-laboratorial)									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
	1			2					
15	15,55	15,20	13,95	15,11	15,38	15,83	15,08	0,53	3,53
30	30,98	28,65	28,93	28,48	28,83	28,66	29,22	0,92	3,16
45	47,55	45,32	43,19	44,97	45,50	45,41	45,28	1,28	2,82

Desta forma, o método em análise pode ser considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos são menores que 5% (ANVISA, 2003).

- Especificidade e Seletividade:

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Após a contaminação das soluções de ácido ferúlico e do ferulato de etila com concentrações adequadas do creme base (concentrações que não causaram turvação na amostra), foram lidas em espectrofotômetro, e os valores comparados com suas concentrações teóricas (concentrações conhecidas no momento do preparo das soluções), determinando-se o DPR (Tabelas 17 e 18).

TABELA 17: Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.

F0									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
20	21,36	21,36	20,99	20,55	20,03	20,03	20,62	0,62	3,02
35	36,87	36,50	37,17	33,77	33,25	33,84	35,20	1,64	4,65
50	51,12	52,45	50,39	53,94	50,60	49,94	51,21	1,48	2,89

TABELA 18: Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do ferulato de etila.

F2									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
15	13,86	14,22	13,86	14,13	13,60	14,31	14,14	0,45	3,19
30	28,66	29,73	28,30	27,05	27,23	26,97	28,28	1,26	4,46
45	42,65	43,37	43,37	40,42	40,51	40,42	41,29	1,85	4,38

Os valores de DPR foram inferiores a 5%, portanto o método foi considerado seletivo e específico.

- Robustez:

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). Para isto, foi utilizado um solvente (DMSO) de fabricantes diferentes ao utilizado na construção da curva analítica e os resultados comparados para a determinação do DPR (Tabelas 19 e 20).

TABELA 19: Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do ácido ferúlico.

F0									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
20	20,99	21,58	21,65	22,03	22,17	21,80	21,46	0,75	3,48
35	35,76	36,65	38,35	37,46	37,54	37,61	36,91	1,18	3,19
50	51,94	52,60	51,71	52,71	52,31	52,23	51,92	0,91	1,76

TABELA 20: Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do ferulato de etila.

F2									
Concentração teórica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração experimental em triplicata ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						Médias	Desvio padrão	DPR
15	15,29	15,64	15,73	15,38	15,47	15,38	15,41	0,24	1,55
30	31,06	30,88	30,97	29,19	28,21	28,66	29,85	1,18	3,95
45	46,75	47,19	47,10	42,83	42,65	42,74	44,89	2,14	4,77

O método também foi considerado robusto.

5.17. Estudo de estabilidade

Teste de centrifugação: As emulsões base (CB), com ácido ferúlico (F0) e com ferulato de etila (F2) foram submetidas a teste de centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos, sendo que nenhuma delas apresentou sinais de instabilidade.

Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo (Estabilidade preliminar):

As formulações CB, F0 e F2 foram submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade.

Essas amostras foram submetidas a condições de temperatura ambiente, a exposição à luz, a temperatura elevada controlada em estufa $T = 45 \pm 2^\circ \text{C}$, a baixas temperaturas controladas em geladeira ($T = 5 \pm 2^\circ \text{C}$) e freezer ($T = -5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclos de congelamento e descongelamento, onde a amostra permaneceu 24 horas a $45 \pm 2^\circ \text{C}$, e 24 horas a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$.

Avaliaram-se as características organolépticas e físico-químicas dessas amostras nos quais os resultados após 15 dias não tiveram grandes alterações, apenas as amostras do freezer e do ciclo apresentara-se ligeiramente modificadas. Como podemos observar nas Tabelas 21 e 22.

TABELA 21: Características organolépticas das emulsões estudadas

Creme base e Emulsões com F0 e F2															
Dias	Ambiente			Luz			Estufa			Geladeira			Freezer		
	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	N

A Aspecto; C- Cor e O- Odor

TABELA 22: Características organolépticas dos cremes base, F0 e F2 frente ao estresse do ciclo (freezer e estufa).

Dias	Ciclo			Condições
	Aspecto	Cor	Odor	
1	N	N	N	Freezer
2	N	N	N	Estufa
3	L	N	N	Freezer
4	N	N	N	Estufa
5	L	N	N	Freezer
6	N	N	N	Estufa
7	L	N	N	Freezer
8	N	N	N	Estufa
9	M	N	N	Freezer
10	M	N	N	Estufa
11	M	N	N	Freezer
12	M	N	N	Estufa
13	M	N	N	Freezer
14	M	N	N	Estufa
15	M	N	N	Freezer

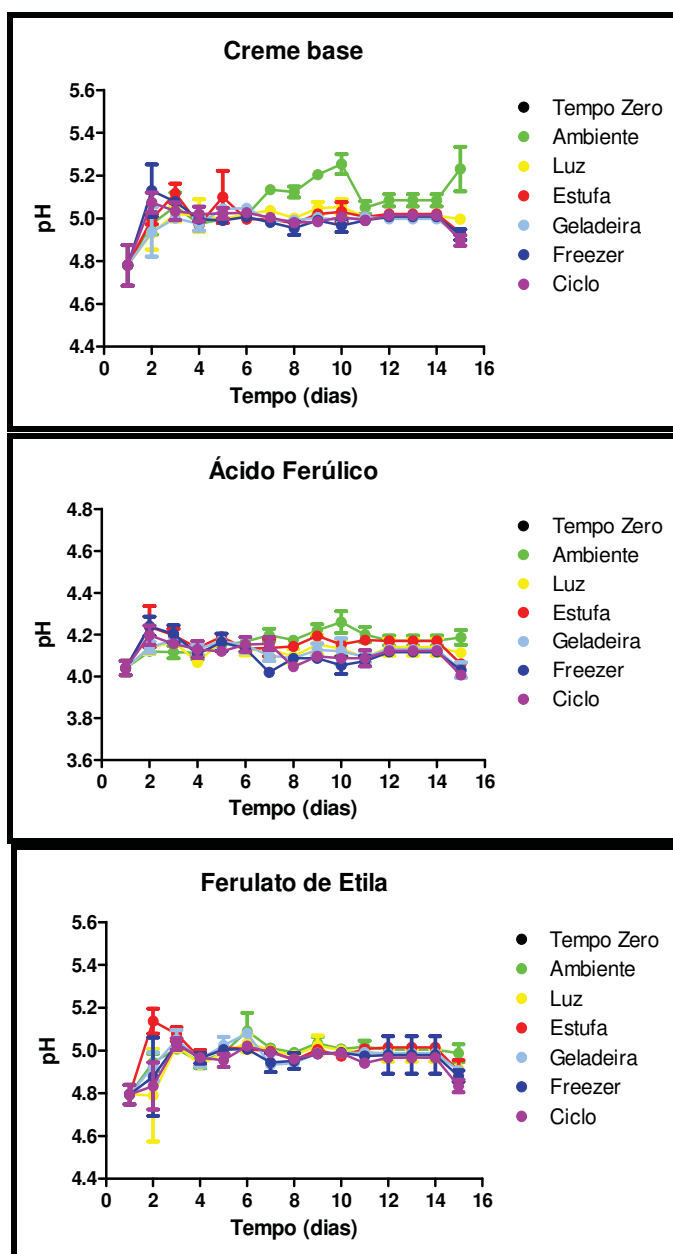
N - normal sem alteração; L - levemente ou ligeiramente modificado; M – modificado; I - intensamente modificado.

Deste modo podemos concluir que não houveram mudanças significativas nas características organolépticas, já que apenas as amostras do ciclo e do freezer se tiveram alguma modificação, o que já era esperado, devido ao estresse elevado das amostras.

Características físico-químicas:

Avaliação do pH – foi efetuada durante os 15 dias de teste em triplicata, onde os valores de pH variaram dentro do limite aceitável (10%) (DAVIS, 1997)(Figura 19).

Figura 19. Avaliação do pH dos cremes base, F0 e F2.

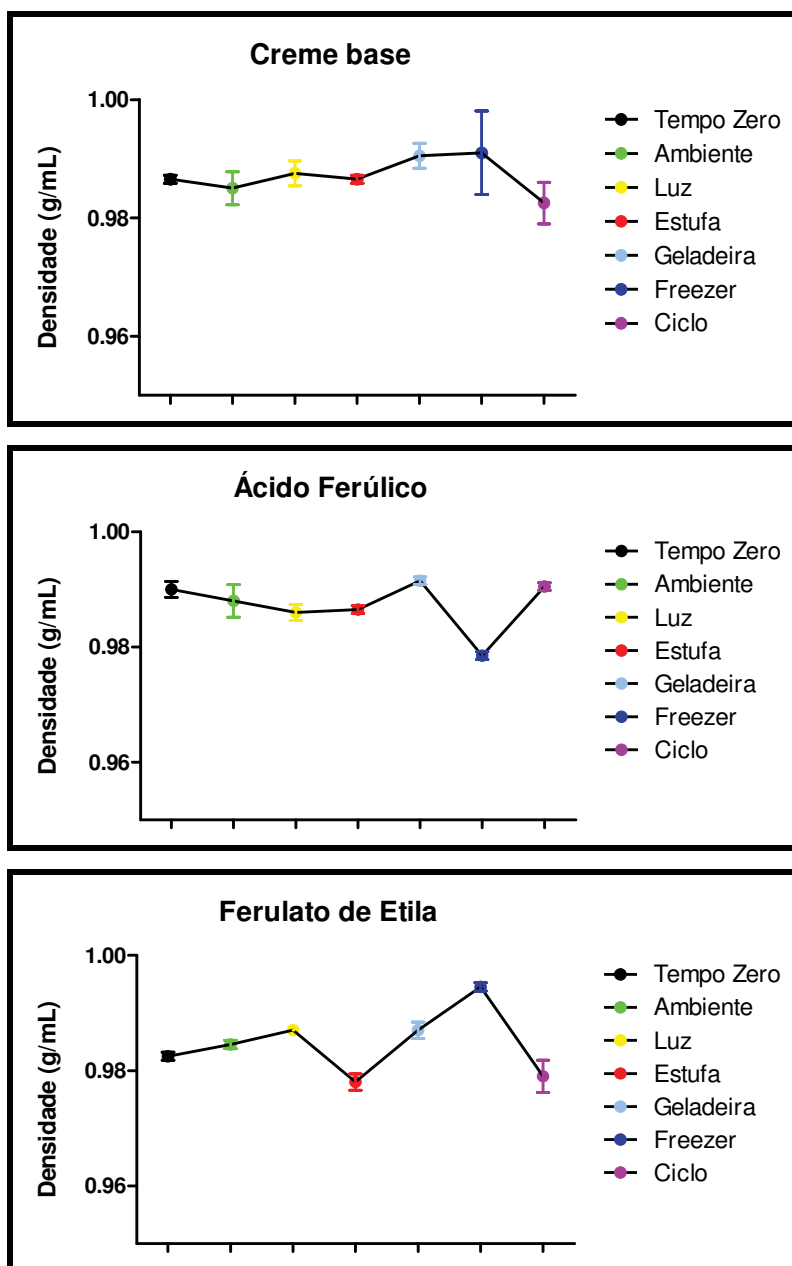


Avaliação da densidade:

Como podemos visualizar nos gráficos abaixo (Figura 20), a densidade se manteve dentro dos 15 dias de teste, já que foi avaliada no primeiro dia e no fim dos 15 dias, sem que pudéssemos observar diferença significativa.

A densidade é um parâmetro importante quando pensamos em perda de água da formulação, ou seja, como os valores de densidade se mantiveram as mesmas, significa que as formulações estudadas não sofreram perda de água, demonstrando boa estabilidade.

Figura 20. Densidade medida durante 15 dias.



Teste de Estabilidade Acelerada, Estabilidade Normal ou Exploratória:

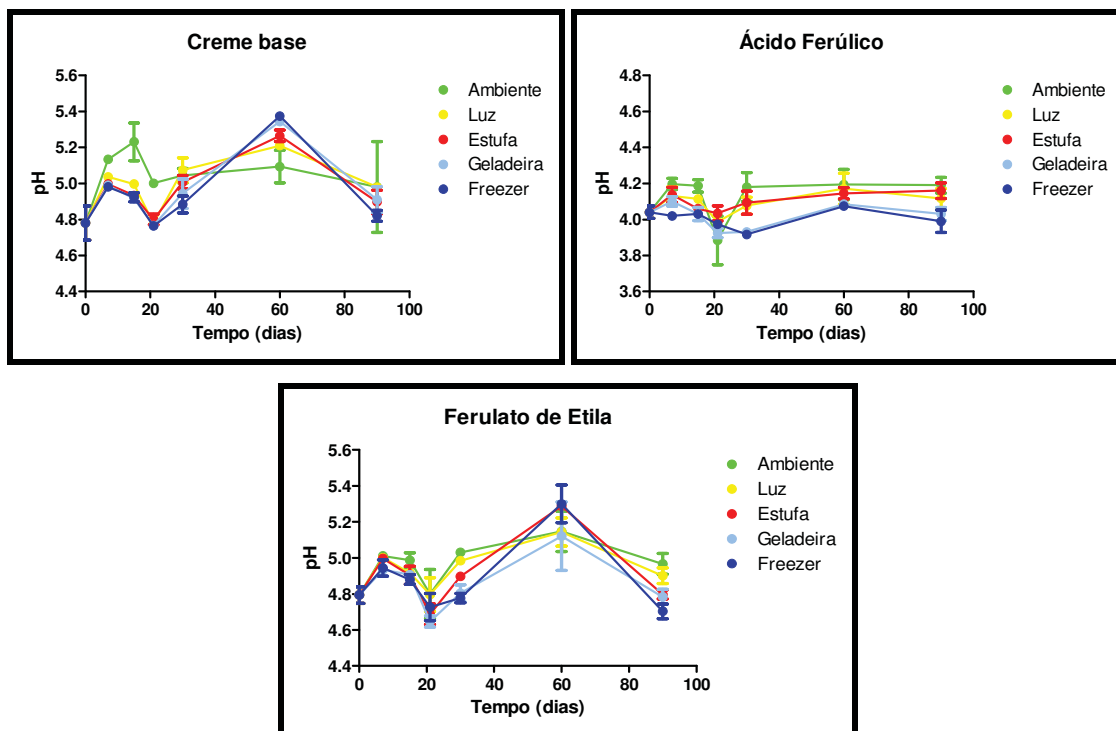
Nesta etapa as amostras não sofreram estresse extremo como nas condições do ciclo no teste de triagem, e foram avaliadas durante 90 dias conforme preconiza o Guia de Estabilidade da ANVISA (2004).

- **Determinação da aparência visual macroscópica** – as formulações propostas foram observadas quanto às suas propriedades organolépticas (cor, odor) e à aparência macroscópica respectivamente, imediatamente após o preparo.

A partir do 15º dia de experimentos todas as formulações apresentaram modificações leves a moderadas nas condições extremas de temperatura (freezer e estufa).

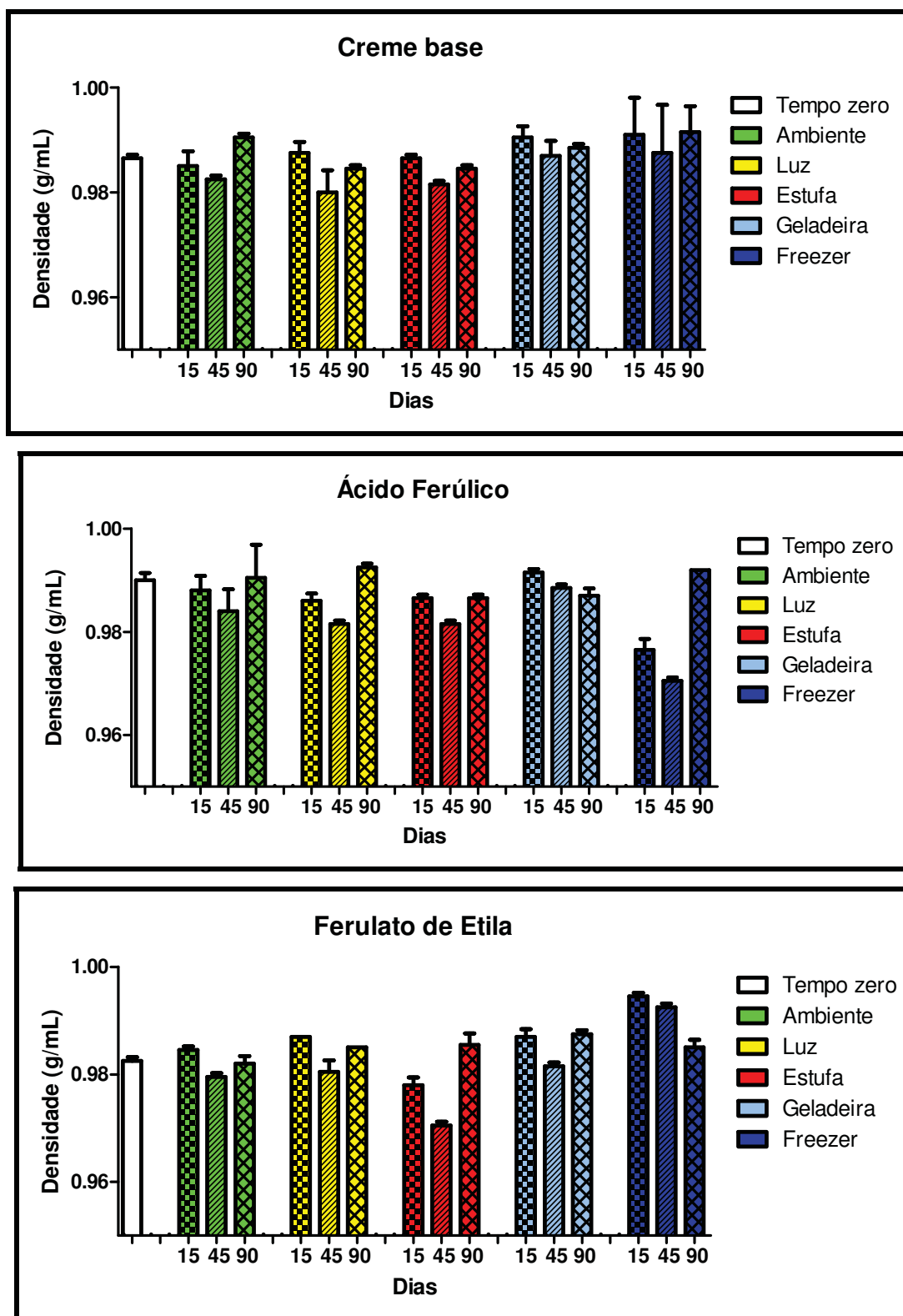
- **Avaliação do pH** – o pH foi medido em triplicata nos respectivos dias 1, 7, 15, 21, 30, 60 e 90. Mantendo a variação permitida dentro de 10% (DAVIS,1977), podendo - se concluir que dentre os 90 dias de teste a partir do pH as formulações se mantiveram estáveis (Figura 21).

Figura 21. Avaliação do pH durante 90 dias.



- **Densidade** – foram medidas as densidades em duplicata nos dias 1, 15, 45 e 90. Sem alteração significativa das mesmas, confirmando a estabilidade nas formulações estudadas (Figura 22).

Figura 22. Densidade avaliada durante 90 dias.



- Estabilidade química:

A estabilidade química foi avaliada por espectrofotometria UV-VIS, onde pode-se observar pelo perfil traçado nos gráficos da figura 23 que tanto o ácido ferúlico quanto o ferulato de etila mantiveram os valores de concentração muito próximos ao inicial, concluindo - se que por este parâmetro avaliada as formulações se mantiveram estáveis, com pequenas variações devido a amostras de partes diferentes das emulsões avaliadas.

Figura 23. Perfil da estabilidade química do F0 e do F2

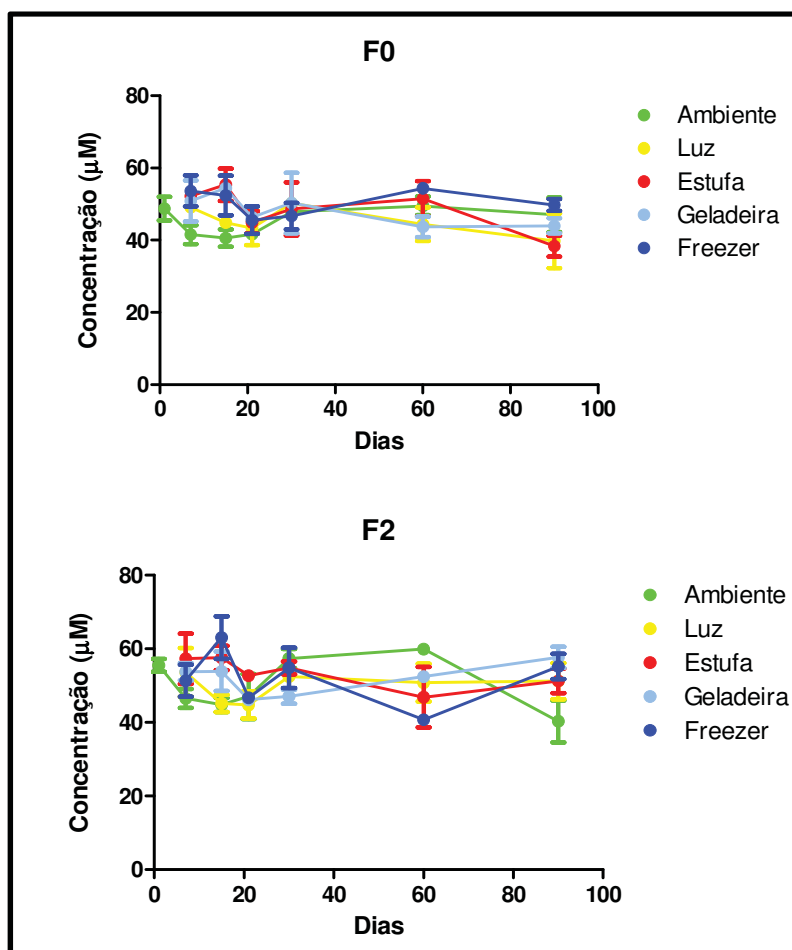
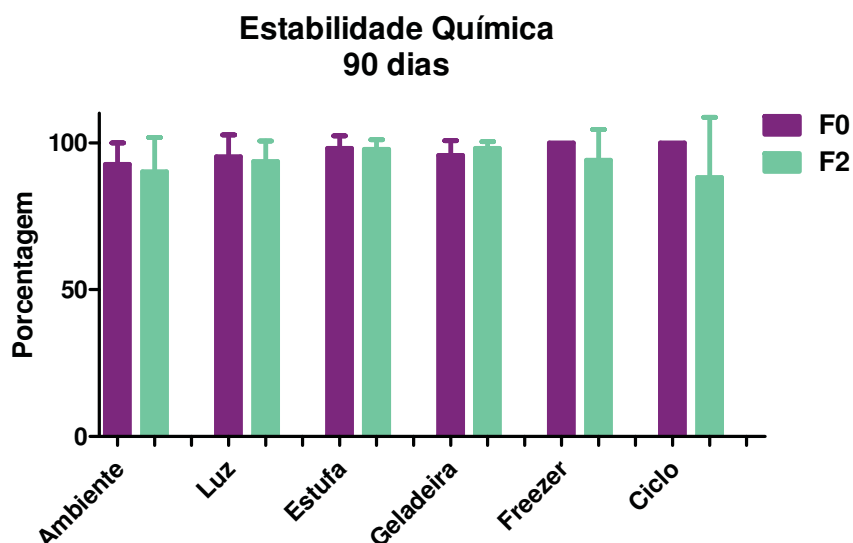


Figura 24. Estabilidade química do F0 e F2 em todas as condições estudadas



- **Teste Viscosidade** – o teste para determinar a viscosidade das emulsões submetidas às condições de estresse foi realizado pelo ensaio reológico de curva de fluxo, tendo como parâmetros uma faixa de taxa de cisalhamento de 0-100 para a curva de ascendente no período de 120 segundos e de 100-0 para a curva de descendente também por 120 segundos. O reograma foi avaliado quanto à viscosidade (Pa.s) em relação à taxa de cisalhamento. O teste foi realizado a 25° C em triplicata.

A viscosidade foi média no primeiro dia, e depois nos dias 30, 60 e 90, onde podem ser observadas abaixo (Tabelas 23, 24 e 25):

TABELA 23: Avaliação da viscosidade (Pa) do creme base nos dias 1, 30, 60 e 90.

Creme base					
Dias/ Condições	Ambiente (28 ± 2° C)	Estufa (45 ± 2° C)	Freezer (-5 ± 2° C)	Geladeira (5 ± 2° C)	Luz (30 ± 2° C)
1	12,05				
30	11,70	20,67	15,39	16,63	21,40
60	18,64	28,58	27,49	23,17	30,14
90	18,66	28,34	19,75	28,47	28,61

TABELA 24: Avaliação da viscosidade (Pa) do ácido ferúlico nos dias 1, 30, 60 e 90.

Ácido ferúlico					
Dias/ Condições	Ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$)	Estufa ($45 \pm 2^\circ \text{C}$)	Freezer ($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)	Geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$)	Luz ($30 \pm 2^\circ \text{C}$)
1	11,68				
30	21,72	28,85	16,43	17,23	25,76
60	25,75	37,18	18,30	21,24	30,79
90	40,96	27,05	15,48	25,17	33,04

TABELA 25: Avaliação da viscosidade (Pa) do ferulato de etila nos dias 1, 30, 60 e 90.

Ferulato de etila					
Dias/ Condições	Ambiente ($28 \pm 2^\circ \text{C}$)	Estufa ($45 \pm 2^\circ \text{C}$)	Freezer ($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)	Geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$)	Luz ($30 \pm 2^\circ \text{C}$)
1	11,60				
30	21,11	29,52	24,84	27,72	24,48
60	26,06	29,71	23,20	24,66	28,18
90	37,25	25,95	21,18	22,29	29,33

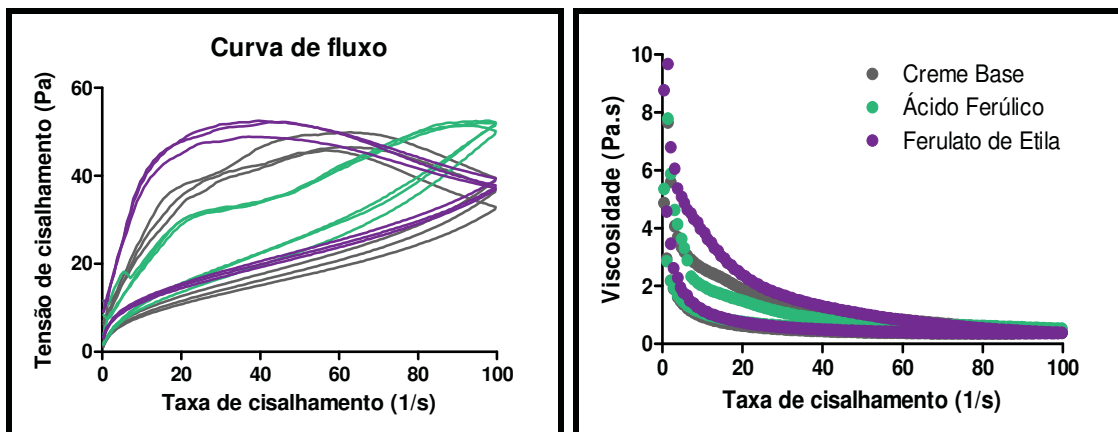
Podemos concluir que as viscosidades variaram pouco (dentro dos 10% aceitáveis), significando que as amostras são estáveis nestes parâmetros avaliados.

5.18. Estudo do comportamento reológico:

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Reologia representa o estudo das propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças, com o objetivo central de descrever as relações entre as tensões e deformações, através das leis constitutivas ou de comportamento de fluxo (BARNES, 2004).

- **Curva de fluxo:** Todas as amostras estudadas (Figura 25) possuem um comportamento reológico não-newtoniano, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura é parcialmente recuperada quando a taxa de cisalhamento diminui até zero. Ambas as amostras tem característica tixotrópica.

Figura 25. Curva de fluxo X viscosidade do CB, F0 e F2

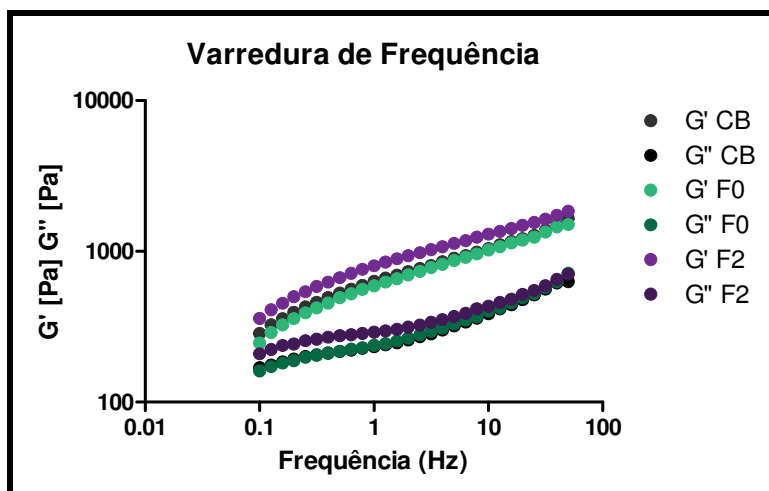


Através das curvas de fluxo, também foi possível avaliar qual o modelo reológico que descreve o comportamento dos fluidos analisados, que foi o modelo de Herschel-Bulkley.

- **Varredura de frequência:** A varredura de frequência determina os valores de G' (módulo de estocagem) e G'' (módulo de perda) das formulações. Quando os valores de G' são superiores a G'' é possível dizer que a formulação apresenta uma característica mais estruturada.

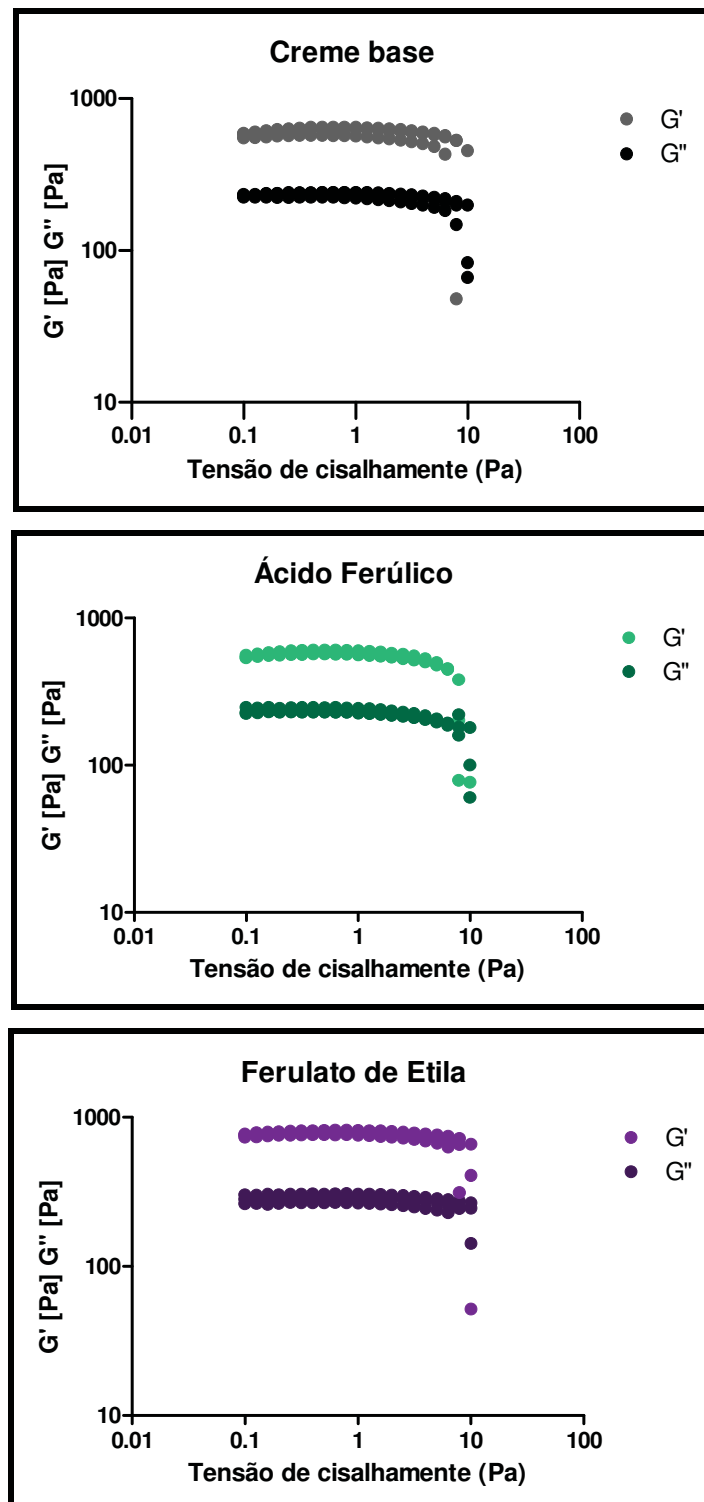
A varredura de frequência mostrou que na faixa estabelecida (0,1 a 50 Hz) existe pequena variação entre CB, F0 e F2 (Figura 26). Além disso, foi possível observar um comportamento estruturado para toda a faixa de frequência aplicada, uma vez que os valores de G' (módulo de armazenamento) são superiores aos valores de G'' (módulo de perda) em toda faixa de frequência aplicada.

Figura 26. Varredura de frequência do CB, F0 e F2



- **Varredura de tensão:** Foi realizada a fim de se encontrar a faixa de viscoelasticidade linear, ou seja, a faixa na qual existe linearidade entre a tensão aplicada e a resposta sem desestruturar a amostra (Figura 27).

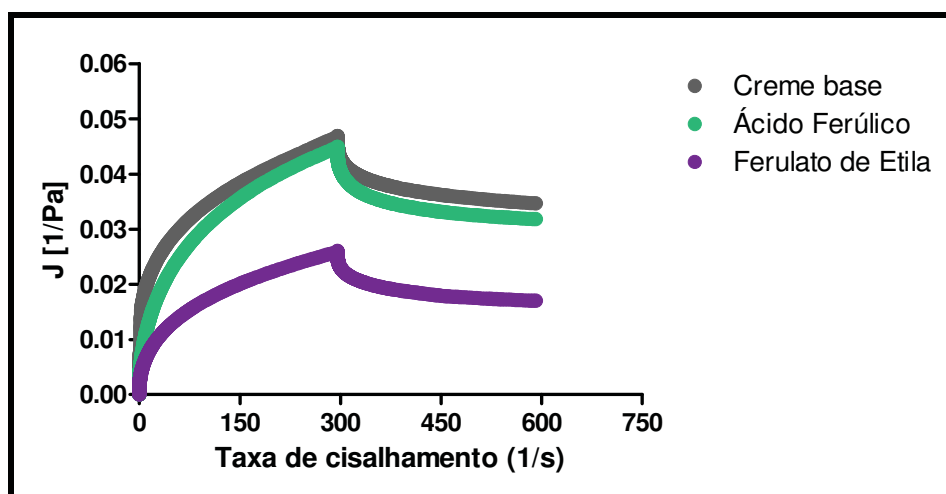
Figura 27. Varredura de tensão do CB, F0 e F2



- **Fluência e Relaxação:** O perfil de resposta observado (Figura 28) demonstra que as emulsões testadas, são realmente formulações viscoelásticas, como já haviam sido verificadas na varredura de frequência.

Ao analisar o gráfico 28, podemos observar que o creme base e o ácido ferúlico tem maior facilidade em fluir em relação ao ferulato de etila, que necessita de uma tensão maior para começar a fluir, apesar da fluência diferenciada nenhuma das amostras apresentou deformação. Em ambas as emulsões ocorreram à recuperação da parte elástica, sendo que essa recuperação fica mais evidente na emulsão com ferulato de etila.

Figura 28. Fluência e Relaxação



5.19. Avaliação do perfil de liberação de sistemas emulsionados contendo ácido ferúlico e do ferulato de etila

A fase receptora constituída por tampão fosfato com 5 % de DMSO foi coletada das células de Franz e, em seguida submetida à avaliação do teor de ácido ferúlico (F0) e ferulato de etila (F2). A partir dos valores de absorbância obtidos no espectrofotômetro, a concentração de F0 e F2 na solução receptora foi calculada. Através destes valores, foram construídos os gráficos abaixo (Figuras 29 e 30).

Figura 29. Valores de Absorvância X Tempo e porcentagem de F0 liberado pela emulsão através das membranas sintéticas nos tempos de 0.5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.

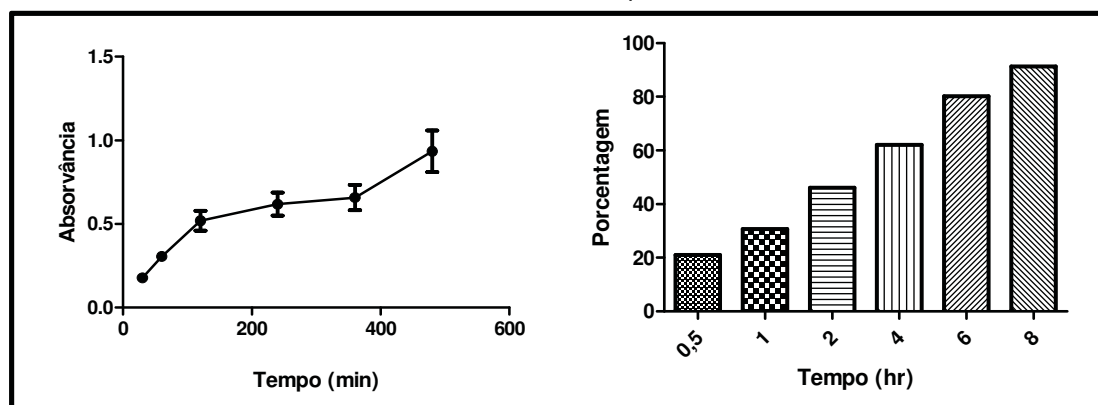


Figura 30. Valores de Absorvância X Tempo e porcentagem de F2 liberado pela emulsão através das membranas sintéticas nos tempos de 0.5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.

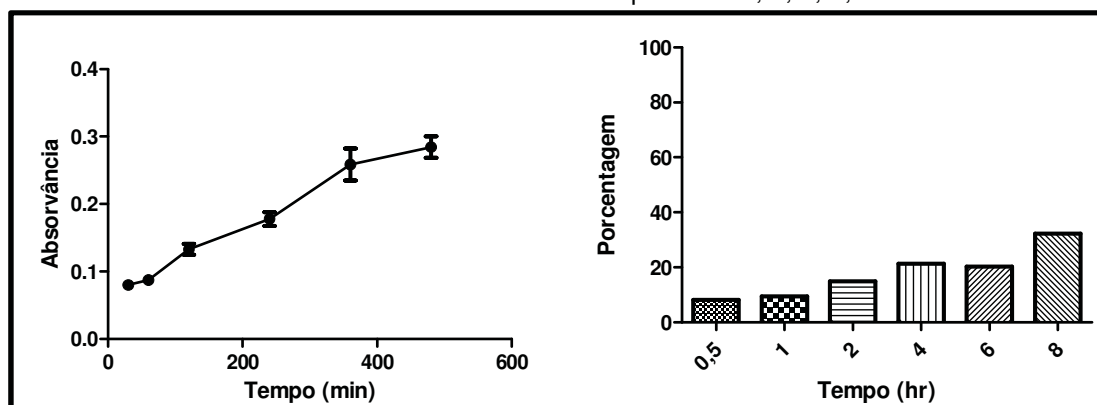
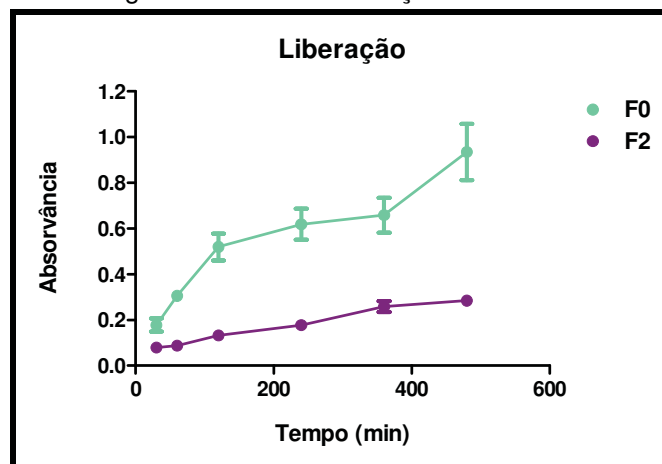


Figura 31. Perfil de liberação do F0 X F2



Os resultados sugeriram que existe um aumento na concentração de F0 e F2 com o decorrer do tempo, no entanto a quantidade de F2 liberada é baixa em relação à quantidade liberada pelo F0, o que pode ser explicado pelo tamanho das moléculas já que nesse experimento a passagem das substâncias se dá por difusão.

6. DISCUSSÃO

As substâncias fenólicas são encontradas em abundância na natureza. O maior interesse de estudo destas substâncias é devido suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, podendo substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido sua toxicidade (LAGUERRE, LECOMTE, VILLENEUVE, 2007). Uma grande vantagem das substâncias fenólicas como fármaco em potencial, é sua baixa toxicidade em relação a outros fármacos (PASTENE et al, 2009).

Antioxidantes atuam como protetores contra processos oxidativos que ocorrem no organismo, podendo de certo modo prevenir doenças causadas por EROs, câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS e doenças cardíacas (BRENNAN & PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI & KARA, 2002).

Esta prevenção se dá devido às substâncias fenólicas possuírem propriedades de oxido redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio singlete ou decompondo peróxidos (DEGASPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estas substâncias fenólicas, em particular seus ácidos são hidrofílicos e a sua capacidade antioxidante *ex vivo* aparentemente pode ser potencializada pela obtenção de seus ésteres, com o conseqüente aumento de sua lipofilicidade e maior interação dessas moléculas com membrana lipídicas de células eucarióticas (XIMENES et al, 2010).

O ácido ferúlico é uma substância ácida fenólica que apresenta uma grande variedade de propriedades biológicas, entre elas a antioxidante (SHIYI OU & KIN – CHOR KWOK, 2004).

Partindo da hipótese de que uma maior lipofilicidade poderia potencializar sua atividade antioxidante, em trabalho anterior foram sintetizados os ésteres metílico, etílico, butílico e heptílico do ácido ferúlico (ferulato de metila, etila, butila e heptila) (Tabela 1 – p. 29). Que foram avaliados num primeiro momento quanto a seu potencial antioxidante, sua citotoxicidade e sua capacidade de inibir o *burst* oxidativo de células polimorfonucleares e mononucleares em diferentes ensaios *in vitro* e *ex vivo*. Num segundo momento, avaliou-se a incorporação do ácido ferúlico e do ferulato de etila (por apresentarem melhores resultados frente aos outros ésteres) em uma emulsão dermatológica e seu comportamento de estabilidade e perfil de liberação.

A atividade antioxidante do ácido ferúlico e de seus ésteres alquílicos foi medida por meio de ensaios supressores do radical DPPH e radicais peroxila (AAPH/ piranina e degradação do óleo de tungue). Nestes três ensaios químicos livres de células, o ácido ferúlico apresentou potencial antioxidante maior do que dos ésteres testados, como podemos observar nas Tabelas 3, 4 e 5 (p. 54, 56 e 57).

Os ensaios *ex vivo* foram realizados visando a integridade celular para os ensaios dependentes de células PMN e PBMC. Por meio deste ensaio foi avaliada a viabilidade celular dos neutrófilos frente ao ácido ferúlico e seus ésteres, para que pudéssemos assegurar que os mesmos não apresentassem potencial citotóxico.

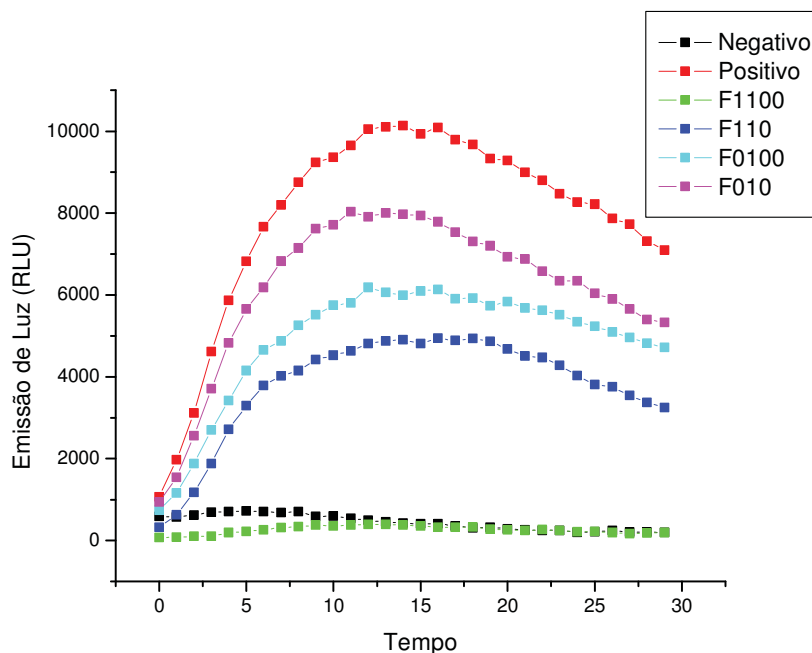
Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas na patogenia de diversas doenças, inclusive câncer, doenças neurodegenerativas, desordens reumáticas e doenças inflamatórias agudas e crônicas, imunes e não imunes (PARIJ et al, 1998). Uma grande fonte endógena de EROs provem da estimulação de fagócitos como os neutrófilos e monócitos/macrófagos, por meio do *burst* oxidativo, cuja finalidade é a destruição de microrganismos fagocitados.

Há bastante tempo é sabido que a quimiluminescência dependente de luminol é largamente dependente das reações do sistema MPO - H_2O_2 - Cl^- ($\pm$ 95% das emissões) (DAHLGREEN, STENDHAL, 1983).

Seguindo este conceito, o ensaio de inibição de EROs do *burst* oxidativo - QLDLum foi realizado com células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (PBMC) estimuladas por zymosan. Por meio deste ensaio podemos observar na Figura 11 (p. 59) que os ésteres possuem um potencial de redução da QLDLum superior ao ácido ferúlico. Este mesmo perfil pode ser avaliado no ensaio do efeito inibitório sobre a produção do radical ânion superóxido gerado por células PMN e PBMC ativados – QLDLuc (Figura 12 – p. 60).

O que ocorre nestes dois ensaios quimiluminescentes é a diminuição da emissão de luz gerada dos sistemas PMN ou PBMC/ luminol/ zymosan e PMN ou PBMC/ lucigenina/ PMA de maneira dose dependente. A título de ilustração mostramos na Figura 32 esse fenômeno.

Figura 32. Gráfico da emissão de luz gerada no ensaio QLDLuc com células PMN.



A inibição de luz dependente de lucigenina pode ser decorrente da captura do O_2^- e/ou inibição da enzima NADPH-oxidase pelo ácido ferúlico e seus ésteres de alquila. Essa substância inibe a liberação e /ou produção de O_2^- que suprime o *burst* respiratório de forma dose dependente impedindo danos às biomoléculas, visto que esse radical pode ser fonte para a produção de outras EROs. Nas reações dependentes de luminol, a atividade clorinante da MPO bem como o seu produto, o HOCl, deve ser considerada para a oxidação dessa sonda. A inibição de luz do seu sistema PMN ou PBMC/ zymosan/ F0 ou seus ésteres alquílicos pode ser decorrente da inibição enzimática e/ou captura do ácido HOCl pelas substâncias testadas (KITAGAWA, 2008).

Entre as EROs, o HOCl pode ser considerado o oxidante mais tóxico e produzido em abundância por PMNs. Esse potente oxidante reage com uma variedade de moléculas, como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos, ascorbato e ácidos graxos polinsaturados (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). Complementando esta ideia foram feitos os ensaios de inibição da MPO, efeito inibitório sobre a produção de ácido hipocloroso gerado por neutrófilos ativados e efeito supressor sobre ácido hipocloroso, (itens 3.13

à 3.15) afim de descobrir em qual ponto as substâncias testadas inibem a produção de EROs. Como nos ensaios anteriores a atividade de supressão dos ferulatos de metila, etila e butila foram similares. Desta forma, seguiu-se com o trabalho comparando o ácido ferúlico e o ferulato de etila. Estes três ensaios se basearam na reação do HOCl produzido com taurina para formar taurinacloramina (Figura 5 – p. 41), que oxida o TMB, gerando uma substância de cor azul que foi medida por absorvância (MALLE et al, 2007). E nestas três etapas o ácido ferúlico e o ferulato de etila não obtiveram resultados inibitórios significativos frente ao padrão utilizado fluortriptamina (F-try) (Figuras 13, 14 e 15 – p. 61 e 62).

Por conta destes resultados negativos nos ensaios com HOCl, voltamos a pensar no efeito inibitório sobre o radical ânion superóxido ou na inibição da enzima NADPH-oxidase, visto inicialmente no ensaio QLDLuc, e assim fizemos dois ensaios diferentes: o primeiro com xantina/xantina oxidase/WST-1, onde a produção do radical anion superóxido ocorre a partir da via da hipoxantina e no segundo caso é gerado por neutrófilos ativados com a sonda WST-1 (via enzimática NADPH-oxidase), comparando os gráficos (Figuras 16, 17 – p. 63) com o ensaio realizado anteriormente (Figura 12 – p. 60) podemos concluir que tanto o ácido ferúlico quanto seus ésteres testados possuem potencial inibitório da enzima NADPH - oxidase, devido o resultado negativo observado no ensaio com a xantina na presença da xantina oxidase. Já que o ensaio com neutrófilos ativados e WST-1 apresentou resultados muito semelhantes aos do ensaio de QLDLuc, no qual os ésteres apresentaram maior atividade frente ao ácido ferúlico. A explicação mais convincente para esses achados diz respeito à lipofilicidade dos ésteres em relação à membrana lipídica das células PMN e PBMC. Essa evidência já foi demonstrada anteriormente para outro ácido fenólico e seus ésteres, o ácido gálico (XIMENES et al, 2010). A interação dos ésteres com a membrana lipídica aproxima mais os grupamentos hidroxilas das fontes geradoras de EROs dos neutrófilos, favorecendo sua propriedade sequestradora. Outra possibilidade que deve ser levada em consideração é que a membrana dos fagócitos tem que estar absolutamente íntegra, para que a NADPH oxidase inicie o processo de formação de EROs (STYRT, B.; KIEMPHER, 1986).

Evidentemente a interação das cadeias carbônicas com essa membrana deve propiciar algum grau de desestabilização da mesma, todavia não o suficiente a ponto de causar qualquer ruptura, pois como demonstramos o teste de exclusão do azul de tripan não evidenciou lesão mais contundente das membranas dos neutrófilos quando expostos às concentrações dos ferulatos que avaliamos neste trabalho, evidenciando, ao contrário, a integridade das membranas celulares.

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada e foi determinante para o prosseguimento do projeto, uma vez que, se o ácido ferúlico e seus ésteres apresentassem citotoxicidade não poderiam ser incorporados nas formulações cosméticas. No entanto, foi possível observar que o ácido ferúlico e os seus ésteres não apresentaram citotoxicidade frente às células de hepatoma humano (HepG2) e queratinócito (HaCat). Esses dados se assemelham com os ensaios feitos por meio da técnica de azul de tripan nas células PMN e PBMC mostrando segurança para dar continuidade ao projeto.

Dando continuidade ao trabalho utilizamos o ácido ferúlico e o ferulato de etila para incorporação em sistema emulsionado. Foram propostas três emulsões diferentes para avaliar a que melhor apresentasse características sensoriais e de estabilidade preliminar e, a partir deste resultado, foi escolhida a formulação C. O F0 e o F2 foram incorporados, separadamente, na fase oleosa (Tabela 2 p. 44) originando as formulações a serem estudadas: a emulsão com F0, a emulsão com F2, sempre comparadas ao creme base. Fizemos a padronização destas duas substâncias como preconizado pela ANVISA (ANVISA, 2003) a fim de utilizar estes dados para quantificação dos mesmos no ensaio de liberação.

Também foi realizado o estudo de estabilidade e comportamento reológico destas formulações, para que pudéssemos obter maiores informações do ponto de vista da integridade e características de espalhabilidade do produto final.

Quanto à estabilidade os F0 e F2 se apresentaram estáveis dentro dos parâmetros estudados.

E de acordo com os resultados dos ensaios reológicos a maior liberação da emulsão contendo o F0 ocorre devido a maior fluência da emulsão contendo o F0 (Figura 28 p. 82) em relação à emulsão contendo o F2,

mostrando maior facilidade de desestruturação da formulação contendo o F0. O fato do F2 apresentar menor fluência poderia ser considerado uma desvantagem, entretanto como esta emulsão será proposta para aplicação na área dos olhos, esta desvantagem torna-se irrelevante, uma vez que a dificuldade é pequena frente à área de aplicação (CHIARI et.al., 2012).

7. CONCLUSÃO

Nos ensaios livres de células os ésteres apresentaram atividade antioxidante menos potente quando comparados ao ácido ferúlico, isso pode ser justificado devido à cadeia alquílica dos ésteres que representa baixa solubilidade em meio aquoso.

Já nos ensaios celulares, os ésteres (com exceção do F7) apresentaram maior atividade antioxidante, isso se explica pela capacidade de interação da cadeia alquílica com a membrana lipídica das células.

A validação do método de quantificação do ácido ferúlico e de seu éster foi realizada segundo a Resolução–RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, onde a linearidade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade, especificidade e seletividade, e robustez puderam ser considerados ótimos uma vez que não houve variações maiores que 5% (valor permitido pela ANVISA).

Ao incorporar o ácido ferúlico e do ferulato de etila nas emulsões cosméticas pode-se notar que ambos foram devidamente estáveis nas formulações propostas, os estudos de estabilidade foram realizados como preconizado pela ANVISA durante 15 dias (teste de triagem) e depois durante 90 dias (teste de estabilidade acelerada).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.M.O.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CARVALHO, I.F.; VALIM, Y.M.L. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcy and complement receptors in stimulating the oxidative *burst* in neutrophils. *Talanta*. v.60, p.601-608, 2003.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em: 20 set. 2011.

ANVISA. **Resolução-RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 20 set. 2011.

AZIZ, N.H.; FARAG, S.E.; MOUSA, L.A.; ABO-ZAID, M.A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios** (Cambridge). ,v. 93, p.43-54, 1998.

BABIOR, B. M.; COHEN, H. J. Phagocytes and oxidative stress. **Am J. Med.**, v.109, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B.M. NADPH Oxidase: an Update **Blood.**, v.93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Basic Life Sci.**, v. 49, p. 815-821, 1988.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p.741-744, 1973.

BARNES, P.J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 515–548, 2004.

BARRY, B.W. Dermatological formulations. In: BARRY, B.W. **Rheology of dermatological vehicles**. New York : Marcel Dekker, 1993. p.351-403.

BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free-radicals. **The J. Sports Med. Physical Fitness**, v.33, p.205-222, 1993.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J ClinLab. Invest** v.21, suppl 97, p.77, 1968.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRUGGISSER, R. Developmet of a screening system to evaluates selective estrogen receptor modulators of plant origin (phytoSERMs) PhD Thesis (Inaugural dissertation) Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Base University, 2001.

BRUGGISSER, R.; DAENIKEN,K.V.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT H.; Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. **Planta Med.**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

CAMPOS, A. M.; SOTOMAYOR, C. P.; PINO, E. LISSI, E. A Pyranine based Procedure for Evaluation of the Total Antioxidant Potential (TRAP) of Polyphenols. A Comparison with closely related Methodologies. **Biol. Res.** , v.37, p. 287-292, 2004.

CHAN, M.; ROCHA, S.; LEHMAN, M.; WHITE, S.; SANTANA, I.; NIP, J. Clinical and in vitro investigation of the effects of ferulic acid on human skin pigmentation. **Journal of Investigative Dermatology** , v.122, p.157, 2004.

CHANOCKF, S.J.; BENNAS, J.E.L.; SMITHLL, R.M.; BABIOR, B.M. Minireview. The Respiratory *Burst* Oxidative. **The Journal of Biological Chemistry.**, v.269, p. 24519-24522, 1994.

CHIARI, B. G.; ALMEIDA M.G.J.; CORRÊA M.A.; ISAAC V.L.B., *Cosmetics' Quality Control* Edited by ISIN AKYAR. Latetst Research Quality Control. Printed Rijeka, Croatia.InTech. c. 16, p. 337-364, 2012.

CUVELIER, M. E.; RICHRD, H.; BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure activity relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n.2, p. 235-324, 1992.

D'ARCHIVIO M; FILES C; DI BENEDETTO R; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA R. Poly-phenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanita**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.

DAHLGREN, C.; STENDHAL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, v. 39, n. 2, p. 736-741, 1983.

DAL'BELO, S. E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas constando extratos de Chá verde e Ginkgo biloba 2008. 176 f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ. N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica** (Curitiba), v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEVARY, Y.; ROSETTE, C.; DIDONATO, J. A.; KARIN, M. NF-kappa-B Activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science.*, v. 261, p.1442–1445,1993.

FARIA, C. M. Q. G.; NAZARE, A. C.; PETRONIO, M. S.; PARACATU, L. C.; ZERAIK, M. L.; REGASINI, L.O.; SILVA D. H. S.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. P. Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase. **Current Medicinal Chemistry** 19: 4885-4893, 2012.

FERNANDEZ, M.A.; SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** (London). 50: 1183-1186, 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**. 43: 61-8, 1997.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.** v.64, p. 190-195, 1975.

FRANZ, T.J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. **Curr. Prob. Dermatol.**, v.7,p.58-68, 1978.

GAMACHE, P.; RYAN, E.; ACWORTH, I.N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography** (Amsterdam), v.635, p.143-150, 1993.

GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; DE NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of postischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic Biol Med**, v.15, p.211-216, 1998.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radic BiolMed.**, v. 13, p.435-448, 1992.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p.291-299, 2004.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood.**, v.92, p. 3007-3017, 1998.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement** (Berlin), v. 20, p. 237-248, 1998.

ISAAC, V.L.B. Desenvolvimento, estabilidade e liberação in vitro de preparações lipolíticas. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

IVANOVA, A.; MILKOVA, T.; GALABOV, A.S.; NIKOLAEVA, L.; VOYNOVA, E. Transformation of cholanolic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. **Zeitschrift fuer Naturforschung** (Tuebingen) v.52, p.516-521, 1997.

KANEGAE, M.P.P.; FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; SILVA, S.O.; XIMENES, V.F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem Pharmacol**, v.74, p. 457-464, 2007.

KITAGAWA, R.R.; da FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; RADDI M.S.G. Ascorbic acid potentiates the cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2205-2208, 2008.

KITAGAWA, R.R.; RADDI, M.S.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; da FONSECA, L.M. Effect of the isocoumarin paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biol Pharm Bull**, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003.

KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J.Leukoc.Biol.** v.77, p. 598 - 625, 2005.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v.46, p. 244-282, 2007.

LAGUERRE, M.; LÓPEZ-GIRALDO, L. J.; LECOMTE, J.; BARÉA, B.; COMBON, E.; TCHOBO, P. F.; BAROUCH, N.; VILLENEUVE, P. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. **Anal. Biochemistry**, v. 308, p. 282-290, 2008.

LAURINDO, F.R.M.; PEDRO, M.A.; DA LUZ, P.L. Oxygen-derived free radicals as signaling mediators in the vascular system. **Ciênc. Cul.**, v.46, n.4, p. 18-27, 1996.

LIN, F. H.; LIN, J. Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, M. A. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p.826–832, 2005.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v.100, p. 1409-1418, 2007.

MALLE, E.; FURTMULLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br. J. Pharmacol.**, v.152, n.6, p. 838-54, 2007.

MARQUELE, F.D.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S.; LARA, M.G.; FONSECA, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v.41, p.461-468, 2006.

MATTILA, P.; HELLSTROM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 152–160, 2007.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicol In vitro**, v.1, p.21-28, 2004.

MOHANTY, J. G.; JAFFE, J. S.; SCHULMAN, E. S.; RAIBLE, D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. **J. Immunol. Meth.**, v.202, p.133–141, 1997.

NAGEN, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** (Curitiba), v.35, p. 129-138, 1992.

OECD-ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document for the conduct of skin absorption studies, n.28, Paris, 2004.

OU, S.; KWOK, K.C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n. 11, p. 1261-1269, 2004.

PARIJS, L.V.; ABBAS, A.K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 243-248, 1998.

PELEG, H.; BODINE, K.K.; NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses** (Oxford). v.23, p. 371-378, 1998.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; DE PASQUALE, A. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p.476–480, 1999.

SALIOU, C.; KITAZAWA, M.; MCLAUGHLIN, L.; YANG, J.; LODGE, J.K.; TETSUKA, T.; IWASAKI, K.; CILLARD, J.; OKAMOTO, T.; PACKER, L. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 26, p.174 - 183, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76 p. 270-276, 1998.

SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Quimioluminescência e bioluminescência. **Quim Nova**, v.16, n.3, p.200-209, 1993.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition** (Boca Raton). , v.32, p.67-103, 1992.

SILVA, S.O. Oxidação de melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativados. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPASOJEVIC, I.; LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Lucigenin: Redox potencial in aqueous media and redox cycling O₂ production. **Archiv Biochem Biophys**, v.373, p. 447-50, 2000.

SPENCER, J. P.; ABD, E. I.; MOHSEN, M. M.; MINIHANE, A. M.; MATHERS, J.C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **Br. J. Nutr.**, v. 99, n. 1, p. 12-22, 2008.

TAN, S.A. ; BERRIDGE, M.V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST – 1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory *burst* activation and for screening anti-inflammatory agents. **Journal of Immunological Methods**, v. 238, n. 1-2, p. 59-68, 2000.

UNITED STATES PATENT, TANIGUCHI H.; NOMURA E.; TSUNO T.; MINAMI S., **Ferulic acid ester antioxidant UV/absorbent**. US005908615A, 1999.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Minireview. Toll Receptors: A Central Element In Innate Immune Responses. **Infection and Immunity**, v. 70, p.1033-1041, 2002.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D. PINTO, C. A. S. O., KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da Rutina com *p*-Metoxicinamato de octila e Benzofenona-3: Avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n.1, p.23-27, 2008.

WANG, B. H.; OU-YANG, J. P. Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 23, p. 161–172, 2005.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p. 365-376, 1989.

WORM, E.V.; BEUKELMAN, C.J.; BERG, A.J.J.V.; KROES B.H.; LABADIE, R.P.; DIJK, H.V. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 433, p.225-230, 2001.

XIMENES, V.F.; LOPES, M.G. PETRÔNIO, M.S.; REGASINI L.O.; SILVA, D.H.S.; da FONSECA, L.M. Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-Induced Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 9, p. 5355–5362, 2010.

YAGI, K.; OHISHI, N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. **The Journal of Nutritional Science Vitaminology**, v.25, p.127–130, 1979.

YIN, Z. Z. L. Y.; Xu, L. N. The effect of danggui (*Angelica sinensis*) and its ingredient ferulic acid on rat platelet aggregation and release of 5-HT. **YaoXueBao**, v. 15, p. 321, 1980.

ZHANG, M. Advances in research on the antiatherogenic effects of ferulic acid. **ZhongCaoYao** v.21, p.41-43, 1990.

ZHANG, Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. **Mutation Research**, v. 555, n. 1-2, p.173-90, 2004

Anexo 1

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 18/2011

Interessada: ANA CAROLINA NAZARÉ

Projeto: Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas de oxigênio (EROs) do ácido ferúlico e seus ésteres e de sua permeabilidade cutânea em emulsões cosméticas

Parecer nº 42/2012 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, reunido em 27 de setembro de 2012, analisou e aprovou o relatório parcial referente ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade "Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas de oxigênio (EROs) do ácido ferúlico e seus ésteres e de sua permeabilidade cutânea em emulsões cosméticas" apresentado pela pós-graduanda ANA CAROLINA NAZARÉ, sob orientação do Professor Doutor Luiz Marcos da Fonseca, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, e considerou o referido relatório estruturado dentro dos padrões éticos estabelecidos pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS. Por essa razão, manifesta-se FAVORAVELMENTE à sua aprovação.

O relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em AGOSTO DE 2013.

Araraquara, 28 setembro de 2012.



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Coordenador do CEP

Capítulo 2

----- Mensagem encaminhada -----

De: "International Journal of Pharmaceutics"

Para: vfximenes@fc.unesp.br

Enviadas: Terça-feira, 17 de Setembro de 2013 8:50:33

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Ximenes,

Your submission entitled "Ethyl ferulate, a component with anti-inflammatory properties for emulsion-based creams" has been received by International Journal of Pharmaceutics

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

Your username is: vfximenes@fc.unesp.br

If you need to retrieve password details, please go

to: http://ees.elsevier.com/ijp/automail_query.asp

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

International Journal of Pharmaceutics

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

--

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Departamento de Química

Faculdade de Ciências

Universidade Estadual Paulista

Campus de Bauru