



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO
MULTICOMPONENTES COM ÁCIDO FERÚLICO E OBTENÇÃO DE
MEMBRANA PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO EM FORMULAÇÕES
SEMISSÓLIDAS

AUTOR DISCENTE: Fernanda Ílary Costa Duarte

ORIENTADOR: Ádley Antonini Neves de Lima

COORIENTADOR: Ana Paula Barreto Gomes

NATAL-RN

2020

FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

**DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO
MULTICOMPONENTES COM ÁCIDO FERÚLICO E OBTENÇÃO DE
MEMBRANA PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO EM FORMULAÇÕES
SEMISSÓLIDAS**

**Tese apresentada à Coordenação do Programa
de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
como requisito do curso de Doutorado em
Ciências Farmacêuticas.**

AUTOR DISCENTE: Fernanda Ílary Costa Duarte

ORIENTADOR: Ádley Antonini Neves de Lima

COORIENTADOR: Ana Paula Barreto Gomes

NATAL-RN

2020

Duarte, Fernanda Ílary Costa.

Desenvolvimento de complexos de inclusão multicomponentes com ácido ferúlico e obtenção de membrana para avaliação da liberação em formulações semissólidas / Fernanda Ílary Costa Duarte. - 2020.

177f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2020.

Orientador: Adley Antonini Neves de Lima.

Coorientador: Ana Paula Barreto Gomes.

1. Polifenóis - Ácido Ferúlico - Tese. 2. Ciclodextrinas - Tese. 3. Polímeros - Tese. 4. Complexos multicomponentes - Tese. 5. Célula de Franz - Tese. I. Lima, Adley Antonini Neves de. II. Gomes, Ana Paula Barreto. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 547-3

Atm

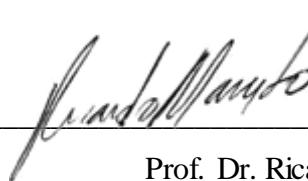
FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

DESENVOLVIMENTO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO MULTICOMPONENTES COM ÁCIDO FERÚLICO E OBTENÇÃO DE MEMBRANA PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO EM FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS

Banca examinadora:



Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima
Presidente- UFRN



Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto
Examinador Externo – UFG



Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho
Examinador Externo – UFPI



Prof. Dr. Atílio Converti
Examinador Externo – UniGe



Prof. Dr. Leandro de Santis Ferreira
Examinador Interno – UFRN

Natal, 30 de outubro de 2020.

NATAL-RN

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo em todos os momentos dessa jornada, me concedendo forças, sabedoria e coragem para enfrentar o caminho que me propus seguir. “Tudo por ele e para ele”.

Aos meus pais Célia e Fernando por todo amor, apoio, companheirismo, confiança e incentivo. Vocês foram fundamentais durante este processo, me mostrando sempre que eu seria capaz e que era possível concluir esta etapa. Obrigada por todo esforço que fazem para nos verem felizes (Fernanda, Mairla e Maria Luiza).

As minhas irmãs Mairla e Maria Luiza por todo amor e carinho que me concedem, pelos maravilhosos momentos de felicidade quando visito nossa casa. Mesmo distante fisicamente, meu coração segue sempre com vocês.

Aos demais componentes da minha família (avós, tios e primos) que me acolhem tão bem e sempre fazem com que me sinta muito querida.

A Verônica Maria Nunes por toda compreensão e aconchego, fazendo-me sentir como se eu fosse da sua família. Um vínculo que vai além do âmbito profissional, serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim.

Ao meu namorado Habacuque, pessoa com quem compartilho grande parte desse trajeto. Obrigada por se fazer presente em tantos momentos, me mostrando sempre o lado bom das situações. Sou grata por toda paciência e compreensão.

A família Lintro Ferreira pela rede de apoio que me concederam em Natal, me proporcionando momentos de muita descontração.

Ao professor Dr. Ádley Antonini por sua dedicação, paciência e confiança ao longo desses quatro anos de supervisão. É um exemplo de pesquisador, professor e pai. Que Deus o abençoe sempre!

A professora Dr. Ana Paula Barreto por ter sido meu primeiro contato na UFRN, me abrindo os caminhos para concretização deste sonho. Pelos momentos de espiritualização, fazendo-me lembrar que através da fé somos fortes. Sua trajetória sempre me inspirou.

A professora Dr. Elissa Ostrosky por toda confiança depositada para auxiliar na orientação de seus alunos. Pelo incentivo, apoio, momentos de descontração e inserir a paixão pela cosmetologia em minha vida. Suas contribuições foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Às minhas companheiras de apartamento Alaine Maria e Bruna Cirineu, exemplo de mulheres independentes e que lutam pelo lugar ao sol. Em especial a minha grande amiga Alaine, na qual temos um laço eterno (minha madrinha de crisma) e que sinto falta na minha rotina.

A todos os alunos de iniciação científica na pessoa de Anne Beatriz, Jonas Fernandes, Victoria Louise, Jamile Vitória, Maria Clara, Ingrid Albuquerque e Maria Eduarda que me auxiliaram na construção deste trabalho, como sempre disse “um trabalho de formiguinhas que se tornou gigante”. Em especial a Jonas, Victoria e Jamile pela confiança e por dividirem comigo diversos momentos (estresse, angústia, alegrias) durante os experimentos. Tenho muito orgulho de todos vocês!

A professora Dr. Júlia Beatriz (UFMG – Campus Cuieté) por toda orientação ao longo da graduação, por introduzir o universo da pesquisa científica em minha vida, por tanta paciência ao me ensinar pessoalmente como proceder nas atividades laboratoriais. Minha primeira inspiração profissional e exemplo de resiliência.

Aos colegas de trabalho da UPA Bancários – João Pessoa, em especial a equipe da farmácia que tanto se dedica e se esforça em busca da melhor assistência aos pacientes. Muito honrada em fazer parte dessa equipe. Vocês são profissionais que inspiram e despertaram em mim o interesse pela farmácia hospitalar.

As minhas amigas Sabrina Vieira e Daniele Figueredo por todo amparo em João Pessoa, sempre de portas abertas para me receberem em qualquer situação que necessite.

A Ízola Ramalho, Natan Sobral e Nathália Brandão por tantos momentos divididos, mesmo cada um seguindo caminhos distintos, sei que sempre posso contar com vocês. Grata especialmente a Natan que me auxiliou na mudança de Campina Grande- PB para Natal-RN.

A Alan Ramos, Marcone Jr. e Jéssica Guimarães pela amizade que ultrapassou os limites de Cuieté-PB e se estendeu para a vida. Sempre extremamente pacientes comigo e dispostos a me ouvir.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade (LCQmed) - UFRN na pessoa do professor Dr. Cícero Aragão que gentilmente me introduziu na rotina laboratorial, onde sempre me senti muito bem recepcionada. Conheci pessoas incríveis as quais admiro muito, em especial Geovana Quixabeira, Jéssica Cabral, Emanuel Justo e Dona Nilma.

Ao Laboratório de Cosméticos (LACOS) - UFRN na pessoa do professor Dr. Márcio Ferrari, pela disponibilidade do espaço e equipamentos para realização dos experimentos. Em especial a técnica Nara Cristina por todo auxílio e momentos de descontração durante os experimentos.

Ao Laboratório Escola de Farmácia Industrial (LEFI) e Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LDM) – UFRN, na pessoa do professor Dr. Túlio Moura e pelo técnico Ednaldo, pelas análises de infravermelho (FTIR-ATR).

Ao Laboratório de Caracterização de Materiais, do departamento de Engenharia de Materiais (DEMAT-UFRN) na pessoa de Igor Damasceno, pelas análises de MFA, MEV e DR-X.

Ao Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) - UFRN, na pessoa do professor Dr. Sócrates Egito pela realização da análise térmica das amostras.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica Computacional – UFRN, na pessoa do professor Dr. Euzébio Guimarães e a mestrandia Sofia Silva pelo estudo molecular computacional.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (LABIOPOL) - UFRN na pessoa do professor Dr. Hugo Alexandre e ao doutorando Wesley Paiva pelo auxílio no desenvolvimento dos ensaios antioxidantes.

A central analítica do Instituto de Química – UFRN na pessoa da Dr. Verônica Oliveira por todo auxílio, disponibilidade e paciência.

Ao professor Dr. Attilio Converti (UniGEN, Genova, IT), pela parceria, disponibilidade e colaboração para com nossas produções científicas. Contribuindo efetivamente para nosso aprendizado e amadurecimento do nosso raciocínio crítico.

Ao grupo de Pesquisa INOFARM, na pessoa do meu orientador professor Dr. Ádley Antonini Neves de Lima, pelo incentivo a nos reinventarmos cada dia mais, buscando sempre inserir nossa pesquisa a um nível prático, dinâmico e inovador. Agradeço pelo apoio de todos que compõem a família INOFARM, especialmente a Gabriela Cavalcanti, Sávio Bulhões, Simone Braga, Thalita Sévia, Elayne Barros e Barbara Queiroz.

“O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã”

Salmo 30:5

RESUMO

O ácido ferúlico (AF) é um constituinte fitoquímico pertencente ao grupo dos polifenóis encontrado principalmente no farelo de arroz e de milho, com destaque para sua atividade fotoprotetora e antioxidante. Assim, o AF vêm sendo amplamente estudado para aplicação em formulações fotoprotetoras e antienvhecimento cutâneo. No desenvolvimento de formulações tópicas os ensaios de liberação *in vitro* apresentam-se como um ensaio rápido, de baixo custo e que possibilitam resultados preliminares. O uso do AF é limitado pela instabilidade da molécula frente à luz e/ou oxidação. Diante disto, sua estabilidade pode ser melhorada através da complexação com ciclodextrinas, dispersão em polímeros ou inclusão em ciclodextrinas seguido da associação de um polímero formando um sistema multicomponente. Assim, objetivou-se o desenvolvimento de sistemas multicomponentes com ciclodextrinas e polímeros hidrofílicos utilizando ácido ferúlico e a obtenção de um modelo de membrana que seja semelhante à composição da pele humana para ensaios de liberação *in vitro*. A membrana foi obtida pela impregnação de uma solução lipídica em membrana sintética e caracterizadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Microscopia de Força Atômica (MFA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Formulações gel e gel-creme contendo AF 0,5% (p/p) foram avaliadas quanto à estabilidade e liberação *in vitro* na membrana otimizada através da célula de difusão de Franz. No desenvolvimento dos complexos multicomponentes procedeu-se estudos de dinâmica molecular e solubilidade em fase aquosa. Após seleção da ciclodextrina e polímero para compor os sistemas, os mesmos foram obtidos pelos métodos de malaxagem e rotaevaporação, caracterizados por DSC e TG (termogravimetria), difração de raios-X (DR-X) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Além disto, foram avaliados quanto à estabilidade oxidativa e atividade antioxidante. As técnicas utilizadas para a caracterização da membrana obtida, permitiram demonstrar a ocorrência de impregnação da solução lipídica. As formulações foram estáveis quando armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os resultados da liberação *in vitro* utilizando a membrana otimizada sugerem que esta pode ser aplicada como uma membrana acessível e simples na liberação *in vitro* de substâncias ativas. Com relação ao desenvolvimento dos sistemas multicomponentes, através das técnicas de caracterização foi possível compreender as interações entre o AF, ciclodextrinas e polímeros. As técnicas de obtenção dos sistemas mostraram-se adequadas, com alto teor de incorporação do ativo. Destacando-se o método de obtenção por malaxagem, que apresentou rendimento consideravelmente maior quando comparado ao método por rotaevaporação. As ciclodextrinas e os polímeros selecionados possuíram potencial para serem empregados em sistemas multicomponentes. Uma vez que aumentaram a estabilidade do AF frente a altas temperaturas, como também auxiliaram na transição do estado cristalino para amorfo do fármaco, devido à inserção do ativo dentro da cavidade e interação com o polímero. Para a estabilidade oxidativa verificou-se, que os componentes do sistema conferiram significativa estabilidade para o AF. Na atividade antioxidante, em geral, os complexos multicomponentes potencializaram a atividade do AF. Os resultados sugerem a formação de sistemas multicomponentes estáveis, viabilizando otimização do ativo. Fornecendo subsídios para incorporação destes sistemas em formulações semissólidas.

Palavras-chaves: Ácido Ferúlico. Ciclodextrinas. Polímeros. Complexos multicomponentes. Célula de Franz.

ABSTRACT

Ferulic acid (FA) is a phytochemical constituent part of the polyphenols group which are found mainly in rice and corn meal, with emphasis on its photoprotective and antioxidant activity. Thus, FA has been widely studied for application in photoprotective and anti-aging skin formulations. In the development of topical formulations, *in vitro* skin release assays present themselves as a fast, low-cost assay that enable preliminary results. The use of FA is limited by the instability of the molecule in the face of light and/or oxidation. In view of this, its stability can be improved through complexation with cyclodextrins, dispersion in polymers or inclusion in cyclodextrins followed by the association of a polymer forming a multicomponent system. Thus, the objective was to obtain a membrane model that is similar to the composition of human skin for *in vitro* skin release assays and development of multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers using ferulic acid. The membrane was obtained by impregnation of a lipid solution in synthetic membrane and characterized by Differential Exploratory Calorimetry (DSC), Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Gel and cream-gel formulations containing AF 0.5% (w/w) were evaluated for stability and *in vitro* release through the optimized membrane in Franz diffusion cell. In the development of multicomponent complexes, studies of molecular dynamics and solubility in aqueous phase were carried out. After selection of cyclodextrin and polymer to make up the systems, they were obtained by the methods of kneading and evaporation rotary, characterized DSC and TG (thermogravimetry), X-ray diffraction (DR-X) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In addition, they were evaluated for oxidative stability and antioxidant activity. The techniques used to characterize the obtained membrane allowed to demonstrate the occurrence of impregnation of the lipid solution. The formulations were stable when stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. The results of *in vitro* release using the optimized membrane suggest that it can be applied as an accessible and simple membrane in the *in vitro* release of active substances. Regarding the development of multicomponent systems, through characterization techniques it was possible to understand the interactions between FA, cyclodextrins and polymers. The techniques of obtaining the multicomponent systems were adequate, with high incorporation content of the asset. The method of obtaining by kneading was highlighted, which presented considerably higher yield when compared to the method by evaporation rotary. The cyclodextrins and polymers selected had the potential to be used in multicomponent systems. Since they increased the stability of FA against high temperatures, they also assisted in the transition from crystalline to amorphous state of the drug, due to the insertion of the active inside the cavity and interaction with the polymer. For oxidative stability, it was verified that the components of the system conferred significant stability for FA. In antioxidant activity, in general, multicomponent complexes enhanced FA activity. The results suggest the formation of stable multicomponent systems, enabling optimization to the asset. Providing subsidies for the incorporation of these systems in cosmetic formulations.

Keywords: Ferulic Acid. Cyclodextrins. Polymers. Multicomponent complexes. Franz's cell.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos artigos discutidos ao longo desta seção com informações sobre autores, ano de publicação, país, aplicação e atividade investigada.....	33
Tabela 2. Principais patentes sobre formulações de ácido ferúlico e atividade de investigação.....	40
Tabela 3. Propriedades físico-químicas das CDs	43
Tabela 4. Valores de Kc e a força de ligação correspondente entre a molécula hospede e a CD.....	48
Tabela 5. Polímeros comumente utilizados para obtenção de sistemas multicomponentes com CDs.....	50
Tabela 6. Composição (% p/p) das formulações semissólidas.....	64
Tabela 7. Dados termoanalíticos da membrana sintética após 24h e da membrana otimizada após 24 horas e 15 dias.....	81
Tabela 8. Dados da estabilidade preliminar.....	88
Tabela 9. Dados da estabilidade acelerada.....	94
Tabela 10. Coeficientes de correlação (r) de modelos cinéticos usados para se adequar ao perfil de liberação do AF.....	99
Tabela 11. Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos testes <i>in vitro</i> de liberação do AF.....	100
Tabela 12. Temperaturas e valores ΔH obtidos nas curvas DSC para o pico de fusão característico do AF nas amostras.....	107
Tabela 13. Dados termogravimétricos das misturas binárias (1:1) na razão de aquecimento a 10 °C.min ⁻¹	109
Tabela 14. Análise do rendimento e teor do AF dos complexos multicomponentes obtidos por malaxagem e rotaevaporação.....	122
Tabela 15. Análise termogravimétrica do AF e complexos multicomponentes na razão de aquecimento 10 °C.min ⁻¹	125
Tabela 16. Atividade antioxidante para quelação de ferro e cobre do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado ou rotaevaporação.....	136
Tabela 17. Atividade antioxidante para sequestro do radical hidroxila do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado ou rotaevaporação.....	138

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do AF.....	22
Figura 2. Representação esquemática das duas formas isoméricas do AF encontradas na natureza (a) conformação <i>cis</i> e (b) conformação <i>trans</i>	23
Figura 3. Número de patentes sobre o uso do AF em formulações tópicas por ano de publicação no período de 2008 a 2019.....	35
Figura 4. Percentual de patentes com uso do AF em formulações tópicas coletadas por país.....	36
Figura 5. (A) Representação esquemática α -, β - e γ -CD (ciclodextrina); (B) Representação da inclusão de uma molécula hospede na CDs.....	42
Figura 6. Permeação da molécula de hidrocortisona através da pele a partir de uma CDs	45
Figura 7. Representação esquemática da formação de complexos de inclusão em meio aquoso.....	46
Figura 8. Diagrama de solubilidade de fases.....	47
Figura 9. Representação esquemática de um sistema multicomponente fármaco-CD-polímero.....	51
Figura 10. Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	52
Figura 11. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular, via intercelular e via apendicular.....	54
Figura 12. Representação esquemática da célula de Franz.....	59
Figura 13. Curva DSC do colesterol, Lipoid [®] E80, 1-octanol e solução lipídica. Na razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	79
Figura 14. Curvas DSC da membrana sintética e otimizada na razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.	80
Figura 15. Curvas DSC da membrana sintética após 24 horas e da membrana otimizada após 24 horas e 15 dias. Razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	81
Figura 16. Gráficos da Microscopia de Força Atômica em duas e três dimensões da (a) membrana sintética e (b) membrana otimizada.....	83
Figura 17. Fotomicrografias das seções transversais da (a) membrana sintética com ampliação de 10.000x (b) membrana otimizada com ampliação de 10.000x (c) membrana sintética com ampliação de 30.000x (d) Membrana otimizada com ampliação de 30.000x.....	84
Figura 18. Valores de pH da formulação (a) gel e (b) gel-creme no estudo de estabilidade preliminar.....	85
Figura 19. Atividade antioxidante da formulação gel-creme durante estudo de estabilidade preliminar.....	86
Figura 20. Atividade antioxidante da formulação gel durante estudo de estabilidade preliminar.....	87
Figura 21. Valores de pH da formulação (a) gel e (b) gel-creme no estudo de estabilidade	

acelerada.....	89
Figura 22. Atividade antioxidante a 250 µg/mL das formulações gel e gel-creme no estudo de estabilidade acelerada após 90 dias.....	91
Figura 23. Cromatogramas obtidos pelo CLUE-DAD para a formulação gel-creme (a) e gel (b) em diferentes condições de temperatura após 90 dias.....	95
Figura 24. Cromatogramas obtidos pelo CLUE-DAD para a elucidação do pico de degradação nas formulações de estufa após 90 dias.....	97
Figura 25. Perfis de liberação <i>in vitro</i> do AF a partir das formulações (a) gel-creme e (b) gel, em membrana sintética e membrana otimizada.....	98
Figura 26. Curvas DSC e TG/DTG (razão de aquecimento em 10 °C.min ⁻¹) (a). AF; (b) β-ciclodextrina; (c) hidroxipropil-β-ciclodextrina; (d) metil-β-ciclodextrina; (e) PVP K30; (f) PEG6000; (g) HPMC; (h) Kollidon®; (i) Soluplus®.....	105
Figura 27. Curvas DSC das misturas físicas binárias (1:1) na razão de aquecimento 10 °C.min ⁻¹	107
Figura 28. Curvas TG das misturas físicas binárias (1:1) na razão de aquecimento 10 °C min ⁻¹	108
Figura 29. Difrátogramas das misturas físicas binárias (1:1).....	111
Figura 30. Espectros no infravermelho e correlação de Pearson para as misturas físicas binárias (1:1). (a) AF:β-CD; (b)AF: HP-β-CD; (c) AF:M-β-CD; (d)AF:PVP; (e)AF:PEG6000; (f) AF:HPMC; (g) AF:Kollidon®; (h) AF:Soluplus®.....	112
Figura 31. Fotomicrografias (a) AF; (b) AF:β-CD; (c)AF: HP-β-CD; (d) AF:M-β-CD; (e)AF:PVP; (f)AF:PEG6000; (g) AF:HPMC; (h) AF:Kollidon®; (i) AF:Soluplus®.....	115
Figura 32. Representação esquemática da geometria otimizada dos complexos de inclusão entre o AF e as CDs. (A) AF:β-CD, (B) AF:M-β-CD e (C) AF:HP-β-CD.....	116
Figura 33. Diagrama de solubilidade de fases do AF a 25°C na presença da HP-β-CD em triplicata.....	117
Figura 34. Curvas do diagrama de solubilidade do AF com polímeros realizados em triplicata.....	118
Figura 35. Diagrama de solubilidade do AF em concentração fixa de HPβC utilizando Soluplus® e PVP K30 em concentrações crescentes.....	120
Figura 36. Curvas DSC dos componentes isolados e complexos multicomponentes na razão de aquecimento de 10 °C. min ⁻¹ : (a) Complexos obtidos com AF:HP-β-CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF:HP-β-CD:Soluplus.....	123
Figura 37. Curvas TG dos componentes isolados e complexos multicomponentes na razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ : (a) Complexos obtidos com AF:HP-β-CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF:HP-β-CD:Soluplus.....	124

Figura 39. Difractogramas dos componentes isolados e complexos multicomponentes: (a) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF: HP- β -CD:Soluplus...	126
Figura 40. Espectros infravermelho dos componentes isolados e complexos multicomponentes: (a) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:Soluplus.....	127
Figura 41. Perfil espectral das amostras em solução de H ₂ O ₂ a 3% durante 24 hrs em espectrofotômetro UV-Vis entre 200 e 400 nm.....	130
Figura 42. Representação esquemática do perfil de degradação do AF nas amostras ao longo do tempo de 8 h, acompanhando a redução na absorbância no comprimento de onda em 319 nm como parâmetro de degradação.....	130
Figura 43. Capacidade antioxidante total do AF, complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado (M) ou rotaevaporação (R).....	132
Figura 44. Poder redutor do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado (M) ou rotaevaporação (R).....	134

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 Ácido ferúlico.....	22
2.1.1 Características químicas da molécula.....	23
2.1.2 Evidências farmacológicas.....	24
2.1.3 Atividade do AF em formulações de uso tópico.....	26
2.1.3.1 Associação do AF com vitaminas antioxidantes.....	27
2.1.3.2 Associação do AF com outras substâncias.....	30
2.1.3.3 AF em novos sistemas de liberação.....	31
2.1.4. Pesquisa e avaliação de patentes.....	35
2.1.4.1 Atividade antioxidante.....	36
2.1.4.2 Atividade antienvhecimento.....	37
2.1.4.3 Atividade anti-inflamatória.....	37
2.1.4.4 Prevenção de sobrecarga adiposa.....	38
2.1.4.5 Clareamento.....	38
2.1.4.6 Melhoria das características do AF.....	39
2.2 Ciclodextrinas.....	42
2.2.1 Aspectos Gerais.....	42
2.2.2 Complexo de inclusão entre fármacos e CDs.....	43
2.2.3 Complexos multicomponentes.....	49
2.3 Pele e vias de permeação cutânea.....	52
2.4. Formulações de aplicação tópica.....	54
2.5. Promotores de permeação.....	55
2.5.1. Uso de CDs como promotores de permeação.....	57
2.6. Estudo de liberação <i>in vitro</i>.....	58
3. OBJETIVOS.....	60
3.1. OBJETIVO GERAL.....	60
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1. MATERIAIS.....	61
4.2 MÉTODOS.....	62

4.2.1 Obtenção e caracterização da membrana sintética e otimizada	62
4.2.1.1 Preparação de solução lipídica.....	62
4.2.1.2 Obtenção da membrana otimizada por impregnação.....	62
4.2.1.3 Métodos de caracterização.....	63
4.2.1.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	63
4.2.1.3.2 Microscopia da Força Atômica (MFA).....	63
4.2.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
4.2.2 Preparação das formulações semissólidas	63
4.2.3 Ensaios de estabilidade preliminar	65
4.2.3.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH).....	65
4.2.3.2 Análise da viscosidade.....	65
4.2.3.3 Atividade antioxidante das formulações.....	66
4.2.4 Ensaios de estabilidade acelerada	66
4.2.5 Avaliação do AF por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência (CLUE-DAD)	66
4.2.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	67
4.2.6.1 Modelos cinéticos de liberação.....	68
4.2.7 Obtenção dos sistemas multicomponentes com AF	68
4.2.7.1 Misturas binárias.....	69
4.2.7.2 Análise térmica.....	69
4.2.7.3 Difração de raios-X (DR-X).....	69
4.2.7.4 Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR).....	69
4.2.7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
4.2.7.6 Determinação da energia de interação.....	70
4.2.7.7 Diagrama de solubilidade com CD.....	71
4.2.7.8 Solubilidade do AF frente aos polímeros.....	71
4.2.7.9 Efeito dos polímeros, em concentrações fixas da CD.....	72
4.2.7.10 Obtenção dos complexos multicomponentes.....	72
4.2.7.10.1 Método por malaxagem.....	72
4.2.7.10.2 Método por rotaevaporação.....	72
4.2.7.10.3 Rendimento e análise quantitativa dos complexos multicomponentes.....	73
4.2.8 Caracterização físico-química dos complexos multicomponentes	73
4.2.9 Avaliação da estabilidade oxidativa dos complexos de inclusão	73
4.2.10 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	74

4.2.10.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	74
4.2.10.2 Avaliação do poder redutor.....	75
4.2.10.3 Capacidade quelante de ferro (Fe ²⁺).....	75
4.2.10.4 Capacidade quelante de cobre (Cu ²⁺).....	75
4.2.10.5 Capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH ⁻).....	76
4.2.11 Análise estatística.....	77
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1 Obtenção e caracterização da membrana sintética otimizada.....	77
5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	78
5.1.3 Microscopia de Força Atômica.....	82
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	83
5.2 Estudos de estabilidade das formulações.....	85
5.2.1 Estabilidade preliminar das formulações.....	85
5.2.1.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH).....	85
5.2.1.2 Análise da viscosidade.....	86
5.2.1.3 Atividade antioxidante das formulações.....	86
5.2.2 Estabilidade acelerada das formulações.....	88
5.2.2.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH).....	89
5.2.2.2 Análise da viscosidade.....	90
5.2.2.3 Atividade antioxidante das formulações.....	91
5.2.2.4 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD).....	95
5.3 Testes de liberação <i>in vitro</i> e cinética de liberação do AF.....	97
5.4 Obtenções dos sistemas multicomponentes com AF.....	98
5.4.1 Caracterização térmica das matérias-primas.....	99
5.4.2 Caracterização térmica das misturas binárias.....	101
5.4.3 Difração de raios-X.....	110
5.4.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	111
5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	114
5.4.6. Determinação da energia de interação.....	115
5.4.7 Diagrama de solubilidade com CD.....	117
5.4.8 Seleção dos polímeros hidrofílicos.....	119
5.4.9 Efeito dos polímeros, em concentração fixa de CD.....	120
5.4.10 Obtenção e quantificação dos complexos multicomponente.....	122

5.4.11 Caracterização físico-química dos complexos multicomponentes.....	123
5.4.11.1 Análise térmica.....	123
5.4.11.2 Difração de Raios X.....	126
5.4.11.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	128
5.4.12 Estabilidade oxidativa.....	130
5.4.13 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	132
5.4.13.1 Capacidade Antioxidante Total (CAT).....	133
5.4.13.2 Poder redutor.....	134
5.4.13.3 Quelação de íons ferro e cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{2+}).....	136
5.4.13.4 Sequestro de Radical Hidroxila (OH^\cdot).....	138
6. CONCLUSÃO.....	141
REFERÊNCIAS.....	143
APÊNDICES.....	172

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida tem estimulado o estudo do processo de envelhecimento (MONTAGNER; COSTA, 2009). Aproximadamente 80% dos sinais mais significativos do envelhecimento cutâneo são causados pela radiação ultravioleta (UV) e incluem rugas, aspereza, aparência de linhas finas, falta de elasticidade e marcas de hiperpigmentação (BUCHLI, 2002; SARAF; KAUR, 2010).

A radiação UV aumenta os níveis celulares de espécies reativas do oxigênio (ERO's), sendo um potente gerador de estresse oxidativo na pele, causando danos a estruturas celulares e contribuindo para as reações de queimadura solar, fotocarcinogênese, bem com o próprio envelhecimento (ZHANG et al., 2010). O uso de filtros solares e os antioxidantes endógenos, como alternativas para impedir danos oxidativos tem sido insuficientes. Com isto, a prevenção destes danos utilizando antioxidantes naturais é sugerida como uma abordagem promissora. Entre muitos antioxidantes disponíveis, o ácido ferúlico (AF) tem ganhado destaque devido à forte atividade antioxidante (OU; KWOK, 2004; STEINER, 2011).

Ácido ferúlico ou ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (AF) é uma molécula de ocorrência natural, sendo um composto fenólico encontrado em diferentes vegetais de folhas verdes, berinjela, beterraba, alcachofra, café e até mesmo no açaí. Apresentando altas concentrações no trigo, farelo de arroz e milho. Destaca-se por sua atividade antioxidante e pela capacidade de minimizar os efeitos dos dímeros de timina que são agentes carcinogênicos. Com isto o AF e seus compostos relacionados estruturalmente vêm sendo amplamente estudados, com aplicação na área alimentícia, farmacêutica e cosmética (ANSEMI et al., 2006; DU et al., 2009; GRAF, 2010; DE PAIVA et al., 2013; BEZERRA et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2020).

O AF apresenta isomeria cis-trans, sendo a isoforma trans mais encontrada na natureza. As duas formas apresentam resultados comprovados em diversas terapias que envolvem o câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, fotoprotetora e antioxidante, sendo esta última atividade a mais evidente na molécula (LIN, et al., 2005; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007; DE PAIVA et al., 2013; CAO et al., 2015; GHOSH et al., 2017).

Novas técnicas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, com ativos que possuam limitações quanto as suas características físico-químicas são empregadas, sem que se altere sua estrutura química ou a dimensão molecular espacial. Assim, a formação de sistemas

multicomponentes de CDs com polímeros hidrofílicos é uma alternativa (SOARES-SOBRINHO et al., 2012; CHANDER JHAWAT et al., 2013; CARNEIRO et al., 2019).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que contém uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica, a qual pode acomodar uma variedade de substâncias. No sistema multicomponente os polímeros interagem com as CDs e com o complexo fármaco-CD (ALMEIDA et al., 2020; FERREIRA, E. B. et al., 2018; SILVA JÚNIOR et al., 2019; QUINTANS et al., 2017; SOARES-SOBRINHO et al., 2012). Este sistema pode aumentar a solubilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade do fármaco, atuando sinergicamente, sendo até possível a redução de custos, pois a quantidade necessária de CD para incremento na solubilidade é menor (SZENTE; SZEJTLI, 1999; RIBEIRO et al., 2003; ALOISIO; OLIVEIRA; LONGHI, 2016) No âmbito da indústria farmacêutica, a formação destes complexos de inclusão proporcionam melhor solubilidade aquosa, estabilidade físico-química e absorção cutânea da molécula (ANSELMINI et al., 2006).

O desenvolvimento de formulações tópicas utilizando antioxidantes pode possibilitar maior proteção cutânea, alcançando resultados mais significativos do que com a ingestão oral dos mesmos (LIN et al., 2005). Entretanto, a aplicação do AF nestas formulações é limitada pela baixa solubilidade em meio aquoso e instabilidade da molécula, que pode decompor-se em produtos inativos, induzidos pela luz e/ou oxidação (MONTI et al., 2011).

Para formulações de uso tópico, a absorção cutânea é um pré-requisito para uma atividade terapêutica eficaz (ZILLICH et al., 2013). Variadas abordagens experimentais e metodológicas tem facilitado a compreensão do processo de absorção através da pele. Na avaliação *in vitro*, o sistema de difusão de Franz é bastante utilizado devido ao seu baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados e realização em pequeno período de tempo, quando comparado a outras técnicas (LEVEQUE et al., 2004).

Assim propõe-se a utilização de uma membrana impregnada com lipídios que mimetizem as barreiras biológicas. O emprego de membranas artificiais biomiméticas possibilita prever a permeabilidade passiva da substância ativa através de membranas biológicas, pois simulam a composição lipídica *in vivo* do estrato córneo. O modelo, portanto, é uma estratégia promissora com potencial de fornecer uma análise mais criteriosa sobre a eficácia e segurança dos sistemas de liberação aplicados na pele em tempo hábil, de forma menos onerosa (ENGESLAND et al., 2013; BERMEJO et al., 2004; CORTI et al., 2006; DUARTE et al., 2020).

Diante deste contexto, pretende-se o desenvolvimento de formulações semissólidas com AF e a avaliação das características de liberação *in vitro* destas formulações, pelo

emprego de membrana sintética otimizada. Além disto, o presente estudo também propõe a obtenção de sistemas multicomponentes para superar as limitações de estabilidade inerentes ao AF e assim possa ser utilizado de forma segura e eficaz.

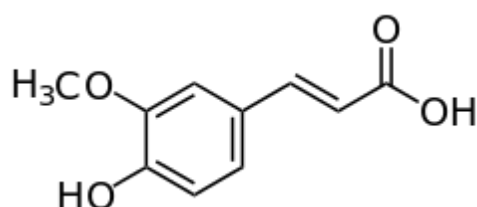
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÁCIDO FERÚLICO

2.1.1 Características químicas da molécula

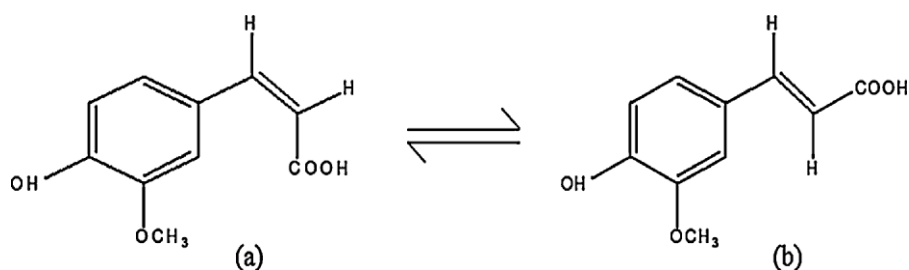
O ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico ou ácido férulico (AF) é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos. Foi extraído pela primeira vez em 1866 a partir da planta *Ferula foetida*, responsável pela sua denominação e é formado a partir do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina da parede celular vegetal. O AF (Figura 1) é abundantemente encontrado no trigo, milho, aveia e especialmente rico na forma de éster em farelos de arroz. Também encontrado em diferentes vegetais de folhas verdes, berinjela, beterraba, alcachofra, café e até mesmo no açaí. Apresenta coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) a 1,67 com base em ensaio realizado em pH 7,4 a 25°C utilizando lipossomas de 1- α -fosfatidilcolina ou micelas de 1-hexadecilfosforilcolina (BEZERRA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2020; PAIVA et al., 2013; ROLEIRA et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química do AF



A molécula do AF, possui isomeria *cis-trans* subdividindo-se em ácido *trans*-férulico e ácido *cis*-férulico (Figura 2), sendo a isoforma *trans* mais encontrada na natureza. O ácido *cis* se apresenta como um óleo amarelado, possuindo absorção no UV em 316 nm, já o ácido *trans* possui formato de cristais com duas regiões de absorção em 284 e 317 nm. Embora contenha em sua estrutura os grupamentos hidroxila e ácido carboxílico, a presença do anel aromático e a cadeia de hidrocarbonetos associada conferem a molécula caráter apolar e a consequente baixa solubilidade aquosa (GRAF, 1992; URBANIAK; SZELA, 2013).

Figura 2. Representação esquemática das duas formas isoméricas do AF encontradas na natureza (a) conformação *cis* e (b) conformação *trans*.



Fonte: Kumar; Pruthi, 2014.

A forma de obtenção do AF ocorre por vias naturais ou sintéticas. As vias naturais ocorrem através de hidrólise ou ação enzimática de microorganismos, já por vias sintéticas se dá através da reação de condensação entre vanilina e o ácido malônico, catalisadas por aminas terciárias (GRAF, 1992; PERES et al., 2018).

O AF destaca-se pelo seu potencial antioxidante e esta atividade pode estar atribuída aos seguintes fatores estruturais da molécula: **(I)** A presença do hidrogênio lábil presente no grupo fenólico, formando um sistema conjugado, que permite a formação de produtos estáveis de menor energia; **(II)** A existência na cadeia lateral de uma ligação dupla C=C insaturada, concede locais de ataque adicionais para radicais livres e, assim, evita de danificar as membranas biológicas; **(III)** O grupamento carboxílico pode permitir a interação da molécula com a bicamada lipídica das membranas, atuando como um amparo contra a peroxidação lipídica (GRAF, 1992; KANSKI et al., 2002; ITAGAKI et al., 2009; DE PAIVA et al., 2013; GHOSH et al., 2017).

Uma característica marcante da molécula, ocorre no fato desta possuir dois valores de pKa, um referente a ionização do grupamento carboxílico (pKa = 4,5) e o outro referente a ionização da hidroxila (pKa = 8,6). Em formulações cosméticas com pH entre 5,5 e 6,5 a molécula mantém o grupamento hidroxila preservado na sua forma não ionizada (região principal relacionada a sua atividade antioxidante) (COUTEAU; MATHALY, 1997; MONTI et al., 2011).

Devido às suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, especialmente a pouca solubilidade hídrica e a baixa estabilidade oxidativa, a veiculação do AF em formas farmacêuticas é limitada, podendo decompor-se em produtos inativos induzidos por luz e/ou ERO's (COUTEAU; MATHALY, 1997; STRAŽIŠAR; ANDRENŠEK; ŠMIDOVNIK, 2008; MONTI et al., 2011)

2.1.2 Evidências farmacológicas

O AF, um produto natural, ganhou importância como potencial agente terapêutico em virtude de sua fácil disponibilidade comercial, baixo custo e efeitos colaterais mínimos. De acordo com Tada; Tayama; Aoki 1999 a DL_{50} oral aguda do AF em ratos machos e fêmeas foi de 2445 mg.kg^{-1} e 2133 mg.kg^{-1} , respectivamente, considerado como de baixa toxicidade. Os efeitos terapêuticos desta molécula são mediados pelas suas propriedades antioxidantes capazes de eliminar os radicais livres e ativar a resposta ao estresse celular. Ainda exibe diferentes atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, anti-apoptótica, anticarcinogênica, antidiabética, hepatoprotetora, cardioprotetora, neuroprotetora, antibacteriana, antifúngica, protetora da radiação UV e radioprotetora (MATTILA; HELLSTRÖM; TÖRRÖNEN, 2006; PAN et al., 2008; PAIVA et al., 2013; MANCUSO; SANTANGELO, 2014; CAO et al., 2015; PANWAR et al., 2016; VILLANUEVA-BERMEJO et al., 2016; SHAKEEL et al., 2017; GHOSH et al., 2017; KOLAWOLE; AGABA; OLUWOLE, 2017).

A farmacocinética desfavorável, que reduz a biodisponibilidade do AF após administração oral e o número restrito de estudos clínicos realizados com o objetivo de comprovar sua eficácia limitam sua utilização mediante respaldos científicos (ZHAO; EGASHIRA; SANADA, 2004).

O AF demonstrou aumentar a capacidade celular de resposta ao estresse através da regulação de várias enzimas, cujo principal mecanismo de ação é neutralizar os danos induzidos por radicais livres, como o sistema heme oxigenase / biliverdina redutase (HO / BVR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a proteína de choque térmico acompanhante (Hsp) -70 (MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

Panwar et al., 2016 realizou um estudo com AF encapsulado em nanopartículas de quitosana, para avaliar sua eficácia como agente antibiofilme contra *Candida albicans*. Verificou-se que as nanopartículas do AF obtidas, eram citocompatíveis, quando testadas em linhagens celulares de Rim Embrionário Humano (HEK-293). O ensaio para medição da atividade metabólica através da redução do XTT revelou que as mesmas reduziram a atividade metabólica celular de *C. albicans* a 22,5% após 24 h de incubação. Os resultados destacaram o potencial do AF-CSNPs para ser usado como uma alternativa eficaz à terapêutica antifúngica convencional. De acordo com Jeong; Jae & Keun, 2000 o AF também inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Escherichia coli*), estando assim presente na composição de medicamentos anti-inflamatórios utilizados no Oriente.

Rukkumani et al., 2004 avaliou o efeito hepatoprotetor do AF sobre a toxicidade induzida pelo álcool e ácidos graxos poliinsaturados em ratas Wistar, administrados por 45 dias. As enzimas fosfatase alcalina, glutamyl transferase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase apresentaram atividades significativamente diminuídas após o tratamento com AF. Enzimas com atividade antioxidante apresentaram atividades aumentadas e a redução do estresse oxidativo foi mais significativa na dose de 20 mg AF / kg. Já Kim et al., 2011 investigou o efeito hepatoprotetor do AF contra lesão hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Os camundongos foram tratados intraperitonealmente com o AF (20, 40 e 80 mg / kg). O tratamento atenuou o aumento das atividades das aminotransferases, o nível hepático de malondialdeído, o nível sérico e a expressão de RNAm do fator de necrose tumoral α , os níveis de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e das proteínas ciclooxygenase-2.

Ramar et al., 2012 investigou o efeito do AF e resveratrol em camundongos diabéticos, através da análise de parâmetros bioquímicos básicos, atividades enzimáticas, peroxidação lipídica e estudos imuno-histoquímicos. Neste estudo, o AF foi administrado oralmente em camundongos diabéticos na concentração de 10 mg AF / kg. Os ratos diabéticos tratados exibiram menores níveis de peroxidação lipídica, maiores níveis de antioxidantes no fígado, rim e soro, ocorrendo também uma diminuição acentuada na imunorreatividade em comparação com camundongos diabéticos não tratados. Prabhakara, Prasad & Alib, 2013 conduziram um estudo em que foi investigada a interação sinérgica do AF com agentes hipoglicemiantes em ratos diabéticos (induzidos por estreptozotocina). Durante 3 semanas foi administrado de 10 a 40 mg/kg do AF e houve potencialização do efeito hipoglicêmicos da metformina e tiazolidinediona, onde ocorreu também a melhora no perfil lipídico destes animais diabéticos.

Sudheer et al., 2005 exibiu que o AF provoca um aumento significativo na defesa antioxidante endógena, diminuindo o dano celular oxidativo provocado pelo uso da nicotina. Estudos demonstram o aumento da capacidade antioxidante em circulação, ocorrendo a redução da pressão sanguínea em ratos hipertensos depois de 2 horas de ingestão oral do AF (1 a 100 mg/Kg), bem como a diminuição dos índices lipídicos, inibição da agregação plaquetária e diminuição da formação de trombos (SUZUKI et al., 2002; WANG et al., 2004; RDIANSYAH et al., 2008).

A formação de ERO's é a principal causa de dano cutâneo induzido por radiação UV, uma vez que a exposição à radiação pode gerar oxigênio singlete capaz de ativar as ERO's e toda cascata de oxidação de proteínas, ácido nucléico e lipídios resultando a longo prazo no

fotoenvelhecimento e câncer de pele. O arranjo molecular do AF é semelhante à da tirosina, com base nisto acredita-se que este inibe a formação de melanina por meio da inibição competitiva com tirosina. Assim, é considerado como uma alternativa de proteção contra o eritema de pele induzido por radiação UVB e UVA. O interesse maior pelo AF tem sido demonstrado pela indústria cosmética, pois é bem absorvido pela pele em pH ácido e neutro, como também na forma molecular ou ionizada (SAIJA et al., 2000; GRAF, 1992; BARONE; CALABRESE, 2009; BLUME, 2013; KUMAR; PRUTHI, 2014).

A concentração usual do AF em formulações cosméticas ocorre a 0,5%, estando presente no mercado em múltiplas formulações para uso tópico que contém vitaminas C e E. Esta associação foi patenteada e é utilizada não só na prevenção de eritema, mas também na prevenção de rugas e áreas de hiperpigmentação típica dos idosos (LIN, et al., 2005).

Zhang et al., 2010 em seu estudo avaliaram macroscopicamente o uso de formulações cutâneas contendo AF, com o objetivo de verificar a segurança quanto ao surgimento ou não de danos cutâneos após administração tópica do AF. Os resultados indicaram que não houve ocorrência de irritação cutânea, demonstrando assim que a administração é segura e eficiente.

Staniforth et al., 2012 analisou os efeitos supressores do AF, na pele de camundongos através de análise imuno-histoquímica. Análises histológicas mostraram que a AF atenua a degradação das fibras de colágeno, acúmulo anormal de fibras elásticas e hiperplasia epidérmica, demonstrando a relevância funcional e fisiológica dos efeitos da AF em tecidos da pele.

Pesquisadores investigaram se o pré-tratamento com AF protege os fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) contra danos celulares induzidos pela radiação UVA. Constatou-se que o AF aumentou significativamente a proliferação e a progressão do ciclo celular nos FDHs, exercendo efeitos protetores sobre os danos celulares induzidos por UVA via mecanismos celulares antioxidantes e pelo estresse em FDHs (HAHN et al., 2016).

2.1.3 Atividade do AF em formulações de uso tópico

Embora as primeiras publicações sobre o AF datem de 1992, graças aos estudos realizados por Graf, seu uso em formulações tópicos começou a ser bastante explorado em 2000. Saija et al., 2000 investigaram a permeação cutânea *in vitro* e a fotoproteção *in vivo* dos ácidos cafeico e ferúlico em soluções aquosas, demonstrando que ambos poderiam ser usados

com sucesso como agentes de proteção tópica contra danos à pele induzidos pela radiação UV. Especificamente, o AF mostrou melhor permeação na pele *in vitro*, e ambos se mostraram eficazes na proteção da pele contra o eritema induzido por UVB.

2.1.3.1 Associação do AF com vitaminas antioxidantes

Um estudo pioneiro sobre o assunto foi realizado por Lin et al., 2005 que explorou a eficácia de vários antioxidantes puros de baixo peso molecular na melhoria da estabilidade das vitaminas C (ácido L-ascórbico) e E (α -tocoferol) em formulações tópicas. Após 30 dias a 45 ° C, o AF melhorou a estabilidade da vitamina C e da vitamina E em mais de 90% e 100%, respectivamente, com uma concentração de 0,5% garantindo a melhor combinação de estabilidade e eficácia, dobrando a fotoproteção da pele, reduzindo de forma eficiente a formação de dímeros de timina e apoptose de queratinócitos e proteção contra fotoenvelhecimento e câncer de pele. Mesmo que o mecanismo de efeito estabilizador do AF nas vitaminas C e E seja desconhecido, provavelmente agiu como um substrato sacrificial ou interagiu com intermediários pró-oxidativos também graças ao baixo pH da formulação, enquanto seu efeito fotoprotetor provavelmente estava relacionado à sua atividade antioxidante.

Posteriormente Tournas et al., 2006, que realizaram um estudo comparativo da formulação acima (0,5% AF, 15% vitamina C e 1% vitamina E) com outra contendo ubiquinona, idebenona e cinetina, observaram que a presença do AF melhorou consideravelmente o efeito fotoprotetor contra UVA e UVB *in vivo*. Murray et al., 2008 um dia após aplicar a mesma formulação contendo FA e seu veículo na pele humana por 4 dias consecutivos e irradiar cada adesivo com UV solar simulado, examinou a pele para eritema e células queimadas e analisou imunohistoquimicamente para dímeros de timina e p53, a formação de citocinas induzidas por UV, incluindo interleucinas IL-1a, IL-6, IL-8 e IL-10, e fator de necrose tumoral- α . Este estudo demonstrou que a aplicação tópica de tal combinação de vitaminas antioxidantes na pele foi capaz de protegê-la contra danos oxidativos induzidos por UV e mutações de DNA associadas ao câncer de pele. Os autores concluíram o artigo afirmando que o mecanismo de ação dessa formulação é distinto dos protetores solares e que seu uso pode ser complementar ao deles para garantir a máxima fotoproteção da pele.

Burns et al., 2013 exploraram os efeitos diferenciais do tratamento tópico de 15 semanas com vitamina E sozinha ou em combinação com AF e vitamina C no desenvolvimento de tumor de pele induzido por radiação UVB de 10 semanas em

camundongos Skh-1. O modelo imitou mulheres expostas a UVB regularmente entre a infância e o início da idade adulta, reduzindo drasticamente a exposição ao sol e começando a aplicar antioxidantes tópicos antes de sofrer qualquer lesão. O presente estudo demonstrou que o tratamento tópico com a formulação complexa reduziu efetivamente o número e a carga tumoral, evitando o desenvolvimento de tumores malignos em camundongos fêmeas Skh-1.

Wu et al., 2013 conduziram um estudo para avaliar a eficácia da mesma formulação tópica na proteção da pele contra a fotolesão induzida por radiação solar UV simulada em 12 mulheres saudáveis. Após a aplicação de cada formulação (antioxidante e veículo) por 4 dias nas áreas demarcadas nas costas e exposição aos raios ultravioleta, foram tiradas fotografias digitais, a cor da pele foi comparada à anterior à irradiação e a biópsia da pele foi obtida 24 h após a exposição para análise imunohistoquímica. O uso tópico do complexo antioxidante mostrou reduzir os sinais clínicos relacionados à fotolesão aguda e conferir proteção significativa contra eventos biológicos na pele humana em comparação com outros locais irradiados sem a aplicação da formulação.

Waibel et al., 2016 investigaram se a administração de uma fórmula tópica semelhante no período pós-operatório de laser ablativo fracionado poderia melhorar a cicatrização de feridas. Quinze indivíduos saudáveis entre 30 e 55 anos de idade foram tratados com vitamina C, vitamina E e fórmula do AF dentro de 2 minutos imediatamente após a cirurgia a laser fracionado ablativo de CO₂ e examinados diariamente por 7 dias durante o processo de cicatrização por meio de fotografias, questionários e avaliação molecular. O uso de lasers ablativos fracionados para fornecer agentes bioativos a um paciente por meio de canais de profundidade predeterminada no tecido cutâneo tem amplas implicações clínicas, pois após a lesão cutânea, ocorre um conjunto de eventos bioquímicos complexos para reparar o dano. Embora seja geralmente recomendado que produtos tópicos devem ser evitados durante a primeira semana de recuperação, sua administração pode auxiliar no processo de cicatrização. O tratamento com esses antioxidantes ácidos levou a uma melhora no reparo da ferida nos primeiros dias após a lesão e uma redução do tempo de inatividade pós-operatório, provavelmente devido a um bloqueio da regulação negativa da expressão do fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) induzida por laser, que por sua vez aumento da atividade de fibroblastos.

Kim et al., 2020 abordaram o uso de aplicação tópica de uma formulação semelhante como um adjunto após o tratamento de melasma com laser Nd: YAG Q-switch de 1064 nm em 18 homens e mulheres entre 26 e 53 anos de idade. Após a administração da formulação em um lado aleatório da face imediatamente após o tratamento a laser e duas vezes por dia

durante duas semanas, os pacientes foram registrados fotograficamente e analisados quanto aos índices de melanina e eritema, pontuação de gravidade do melasma e pontuação de melhora geral. O lado que recebeu a solução antioxidante apresentou redução significativamente maior no índice de melanina, enquanto não houve diferença significativa no eritema pós-tratamento. Ao demonstrar que o uso de um antioxidante tópico imediatamente após o tratamento com laser é seguro e bem tolerado, os autores reconheceram que mais estudos são necessários para avaliar o possível efeito clínico em longo prazo e elucidar os mecanismos envolvidos na redução da hiperpigmentação da pele.

Oresajo et al., 2008 investigaram a ação protetora de uma formulação contendo 2% de fletina, um antioxidante vegetal, 10% de vitamina C e 0,5% do AF, contra danos à pele humana induzida por irradiação UV. Após ajuste do pH da solução para 2,5 para atingir a absorção tópica máxima, 10 indivíduos com idade entre 18 e 60 anos foram tratados com o produto antioxidante na região lombar por 4 dias consecutivos. No dia seguinte, imagens digitais foram tiradas e biópsias de punção de 4 mm foram coletadas em ambos os locais de teste para estudos morfológicos e imunohistoquímicos. A irradiação UV aumentou significativamente o eritema da pele humana, queimou algumas células e induziu a formação de dímeros de timina, a expressão da metaloproteinase-9 da matriz e a da proteína p53, mas a formulação atenuou todas essas alterações provavelmente devido à atividade antioxidante da fletina. Como os filtros solares geralmente não oferecem 100% de proteção contra a radiação UV devido à aplicação não uniforme na superfície da pele e seu mecanismo de ação é diferente do dos antioxidantes, espera-se que sejam complementares.

Uma vez que os hidrogéis podem aumentar a penetração da droga e melhorar os efeitos farmacológicos da administração transdérmica, que é dificultada pela propriedade de barreira do estrato córneo, Cassano et al., 2009 para melhorar a distribuição tópica e a estabilidade sob exposição direta à radiação UV, testaram um hidrogel de dextrano contendo AF e vitamina E. Em particular, eles se concentraram na capacidade do hidrogel de inibir a peroxidação lipídica induzida *in vitro* nas membranas microssomais do fígado de rato por radicais produzidos pela decomposição do hidroperóxido de terc-butila, bem como sobre seu padrão de liberação e deposição do fármaco na pele de coelho. O hidrogel contendo FA provou ser mais eficaz do que seu equivalente livre na proteção da vitamina E da fotodegradação, o que sugere seu uso potencial para fins cosméticos e farmacêuticos como um transportador de vitamina E.

2.1.3.2 Associação do AF com outras substâncias

Trombino et al., 2009 relataram a preparação bem-sucedida de um novo hidrogel de celulose contendo AF pela introdução de porções do AF no esqueleto da celulose por copolimerização radical de acrilcelulose (AcrC) com N-dimetilacrilamida (DMAA) e testaram sua atividade antioxidante *in vitro* por inibição de peroxidação lipídica em membranas microsomais de fígado de rato induzida por 2,20-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) e terc-butil hidroperóxido (terc-BOOH) ou pelo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) ensaio de redução. Como o hidrogel se mostrou um eliminador muito eficaz de DPPH•, os autores sugeriram que esse biopolímero antioxidante pudesse ser usado na área farmacêutica como um carreador para melhorar a estabilidade de drogas foto e termossensíveis.

Para aumentar a taxa de liberação *in vitro* do AF, Ouimet et al., 2015 adicionaram grupos de etilenoglicol como ligantes entre duas moléculas do AF e discutiram perfis de síntese, caracterização e citotoxicidade de polímeros modificados por glicol, bem como seu comportamento de liberação de drogas. Verificou-se que a adição de etilenoglicol aumenta a atividade antioxidante do polímero e melhora a liberação do AF a taxas e concentrações adequadas para aplicações tópicas na pele.

Para o preparo de filtros solares multifuncionais com eficácia fotoprotetora e antioxidante, Peres et al., 2018 exploraram a combinação do AF com etilexil triazona e bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazina, dois filtros UV com características ideais para fotoprotetores, como baixa permeação na pele e alta eficácia em baixa concentração. Emulsões óleo-em-água foram desenvolvidas usando um agente auto-emulsificante aniônico. Os pesquisadores avaliaram a segurança clínica de filtros solares bioativos e a capacidade do AF de melhorar seus poderes fotoprotetores e antioxidantes por Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT) e potencial fototóxico / fotossensibilidade, ensaio de atividade antioxidante *ex vivo* baseado na técnica de striping, estimativa de sol *in vivo* fator de proteção (FPS) e fator de proteção UVA *in vitro* (UVA-PF). As amostras mostraram boa biocompatibilidade da pele e nenhuma fototoxicidade ou fotossensibilidade. Foi demonstrado que o AF exerce um efeito sinérgico com filtros UV e aumenta o FPS *in vivo* em 37% e o UVA-PF *in vitro* em 26%, enquanto nenhuma tendência de aumentar a atividade antioxidante na pele foi observada após o tratamento com a formulação.

2.1.3.3 AF em novos sistemas de liberação

Para preparar um sistema vesicular adequado para a liberação cutânea do AF, Chen; Liu; Farh, 2010 investigaram a absorção percutânea do AF de diferentes sistemas vesiculares contendo AF (lipossomas convencionais, lipossomas deformáveis baseados em Tween 80, invasomas e etossomos), que foram caracterizados quanto à distribuição do tamanho de partícula, potencial zeta, forma vesicular e morfologia da superfície, in vitro permeação de pele humana e deposição de pele. O perfil de permeação do AF através da membrana e do estrato córneo humano, juntamente com sua deposição na pele, foram notadamente melhorados com o uso desses sistemas vesiculares. Em particular, o melhor desempenho foi observado com o sistema etossômico contendo 18,0 mg / ml do AF, o que permitiu obter fluxo cutâneo e deposição do fármaco na pele 75 e 7,3 vezes maior do que o AF que seria alto o suficiente para exercer efeitos antioxidantes.

Harwansh et al., 2015 desenvolveram um gel baseado em nanoemulsão carregado com AF para garantir maior permeabilidade e máxima atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por UVA em ratos. A pele abdominal sem pelos dos ratos foi colocada na célula de difusão de Franz com o lado do estrato córneo voltado para o compartimento doador e o lado dérmico voltado para o receptor. As nanoemulsões foram distribuídas uniformemente na pele do compartimento doador e as amostras foram coletadas em intervalos de tempo predeterminados por 24 h. A eficácia das formulações de gel carregadas com AF como agentes fotoprotetores contra a exposição UVA foi testada na pele dorsal de ratos por 8 dias tomando enzimas específicas como marcadores bioquímicos antioxidantes no tecido cutâneo. A nanoemulsão preparada por nanoemulsificação espontânea, na proporção 20: 30: 50% (p/p/p) de óleo (isoestearil isoestearato), sistema aquoso e Smix [surfactante (Labrasol) e co-surfactante (Plurol isostearique)], e incorporado ao gel Carpobol 940, apresentou a maior permeabilidade à atividade do AF e proteção UV, elevou o nível de marcadores antioxidantes e interrompeu os efeitos indesejáveis gerados pela radiação UV. Os autores sugeriram que esta formulação deveria ser explorada como um portador promissor para distribuir compostos bioativos na pele.

Bairagi et al., 2018 investigaram o potencial do hidrogel baseado em nanopartículas poliméricas carregadas com AF na cicatrização de feridas diabéticas in vivo. Nanopartículas do AF-poli (ácido lático-co-glicólico) preparadas por nanoprecipitação foram otimizadas usando um projeto de composto central, caracterizado por tamanho, eficiência de encapsulamento e morfologia e, finalmente, testadas por via oral ou tópica quanto ao efeito do

AF liberado na cura de feridas em ratos diabéticos induzidas por estreptozotocina usando o modelo de rato de ferida de excisão. Estudos *in vivo* mostraram que os tratamentos tópicos e orais de nanopartículas carregadas com AF foram eficazes no aumento do conteúdo de hidroxiprolina, que é um índice de renovação de colágeno e, portanto, de cicatrização de feridas.

Para preparar novas formulações tópicas, Aitipamula; Das, 2020 desenvolveram cocristais de AF usando três ingredientes cocristalinos relevantes para o cuidado da pele, como uréia, nicotinamida (NA) e isonicotinamida (INA), e os incorporou em um óleo gel. O cocristal AF-INA apresentou maior solubilidade do que os demais, e o AF foi mais estável nos cocristais AF-INA ou AF-uréia. Após a caracterização dos cocristais por análise térmica e difração de raios-X, estudos de liberação *in vitro* realizados na célula de difusão de Franz e membrana HT Tuffryn (polissulfona) revelaram que a liberação / permeação do AF na AF-INA foi a mais prolongada, provavelmente devido à dissociação de cocristal mais lenta em óleo gel antes da permeação, que seria uma propriedade desejável para aplicação na pele.

A tabela 1 apresenta a síntese dos artigos com informações sobre autores, ano de publicação, país, aplicação e atividade investigada.

Tabela 1. Resumo dos artigos discutidos ao longo desta seção com informações sobre autores, ano de publicação, país, aplicação e atividade investigada.

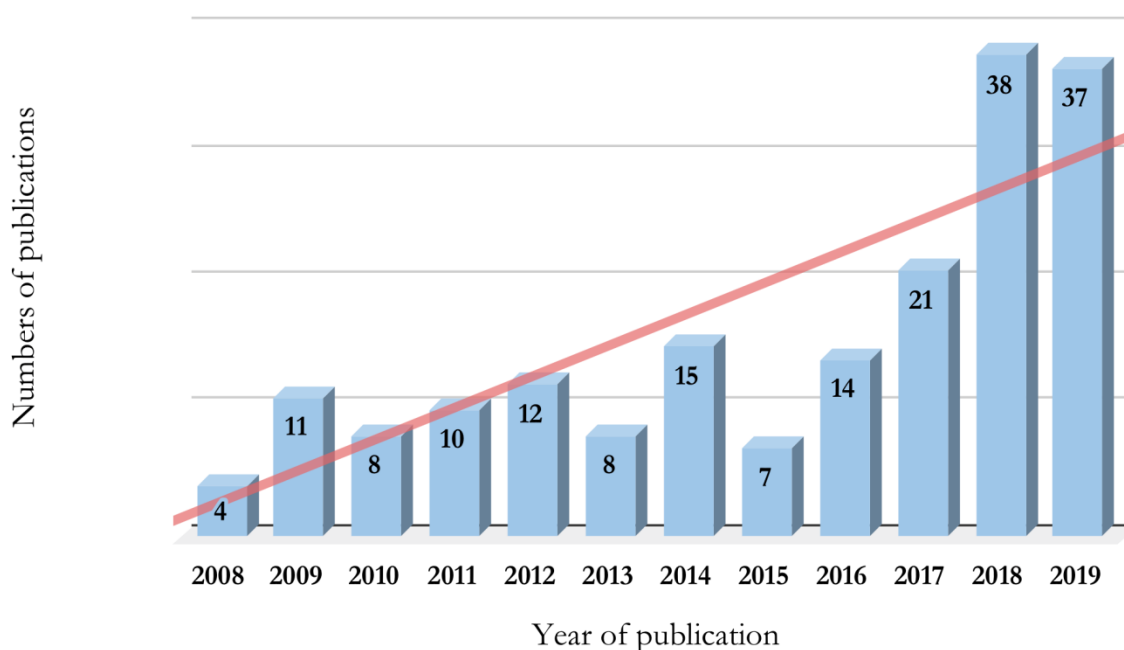
Título	Associação do AF com outros ativos	Atividade principal	Ensaio	Ano	País
Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Estabilidade e fotoproteção	Estabilidade química da formulação baseada no fator de proteção antioxidante e outros aspectos, Formação de dímeros de timina e apoptose de queratinócitos.	2005	EUA
Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamins C and E with ferulic acid	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Fotoproteção	Testes <i>in vivo</i> , medição colorimétrica do eritema cutâneo induzido, análise da presença de dímeros de timina.	2011	EUA
A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid protects human skin against damage caused by ultraviolet irradiation	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Estabilidade, fotoproteção e atividade antioxidante	Testes de patch com medição de células de eritema e queimaduras solares, análise imunohistoquímica para dímeros de timina e p53	2008	EUA
Differential effects of topical vitamin E and CE Ferulic® treatments on ultraviolet light B induced cutaneous tumor development in Skh-1 mice	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Fotoproteção e atividade antitumoral	<i>Teste in vivo</i> glutationa peroxidase e ensaio de atividade de catalase para detectar tumores malignos da pele em camundongos.	2013	EUA
Protective effects of a topical antioxidant complex containing vitamins C and E and ferulic acid against ultraviolet irradiation-induced photodamage in Chinese women	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Atividade antioxidante e fotoproteção	Avaliação <i>in vivo</i> de fotolesão, eritema da pele e biópsia de uma área de pele irradiada por UV.	2013	China
Laser assisted delivery of vitamin C, vitamin E and ferulic acid formula serum decreases fractional laser postoperative recovery by increased beta fibroblast growth factor expression	Associação com vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Cicatrização	Teste <i>in vivo</i> dos efeitos e eficácia de um soro, utilizando fotografias, questionários do paciente e avaliação molecular para investigar o processo de cura.	2016	EUA
Effect of at topical antioxidant serum containing vitamin C, vitamin E, and ferulic acid after Q-switched 1064-nm Nd: YAG laser for treatment of environment-induced skin pigmentation	Associação com laser e vitaminas antioxidantes - vitaminas C e E	Atividade contra a hiperpigmentação	Estudo único cego e randomizado, onde os efeitos foram avaliados com fotografia digital, índice de melanina e eritema, escore de gravidade melasma e melhora global.	2013	EUA
Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin	Associação com vitamina C e floretina	Atividade antioxidante e fotoproteção	Eritema, presença de células queimadas solares, formação de dímeros de timina, expressão de matriz metaloproteinase-9 e proteína p53.	2008	EUA

A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E	Associação com hidrogel e vitamina E	Atividade antioxidante e fotoproteção	Inibição da peroxidação lipídica nas membranas microssômicas de ratos induzidas <i>in vitro</i> por radicais livres, Caracterização do comportamento de liberação e deposição na pele de coelho.	2008	Itália
Synthesis and antioxidant activity evaluation of a novel cellulose hydrogel containing trans-ferulic acid	Associação com outras substâncias – hidrogel de celulose	Atividade antioxidante	Inibição <i>in vitro</i> de ensaio de peroxidação lipídica, atividade antioxidante pelo ensaio radical de limpeza DPPH.	2008	Itália
Ferulic acid-based polymers with glycol functionality as a versatile platform for topical applications	Associação com outras substâncias – grupos de etileno glicol	Atividade antioxidante	Liberação <i>in vitro</i> , atividade antioxidante por teste radical de limpeza DPPH, citocompatibilidade <i>in vitro</i> usando células de fibroblastos de camundongos.	2015	EUA
Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF	Associação com outras substâncias – triazone de etilxyl e bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	Atividade antioxidante e fotoproteção	Potencial fototóxico/fotosensibilidade, ensaio de atividade antioxidante <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> FPS (fator estimado de proteção solar) e <i>in vitro</i> UVA PF (fator de proteção).	2018	Brasil
Skin delivery of ferulic acid from different vesicular systems	Associação com outras substâncias – sistemas vesiculares	Atividade antioxidante e permeação cutânea	Permeação <i>in vitro</i> na pele humana, deposição de drogas na pele.	2010	Alemanha
Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress	Associação com outras substâncias – nanoemulsão	Permeação de pele, fotoproteção e atividade antioxidante	Permeação cutânea <i>ex vivo</i> na célula de difusão de Franz, Avaliação da eficiência de nanoemulsão do AF como fotoprotetor.	2015	Índia
Preparation, characterization and <i>in vivo</i> evaluation of nano formulations of ferulic acid in diabetic wound healing	Associação com outras substâncias – nanopartículas em formulações de gel	Atividade antioxidante e cicatrização de feridas	Liberação <i>in vitro</i> de medicamentos, Exame <i>in vivo</i> da área da ferida, Avaliação do percentual de fechamento das feridas	2018	Índia
Cocrystal formulations: A case study of topical formulations consisting of ferulic acid cocrystals	Associação com outras substâncias – formulações contendo ureia, nicotinamida e cocristsais de isonicotinamídeos	Estabilidade, solubilidade e permeação da pele	Teste de liberação <i>in vitro</i> (permeação de membrana), teste de solubilidade, caracterização térmica, difração de raios-X.	2020	Singapura

2.1.4. Pesquisa e avaliação de patentes

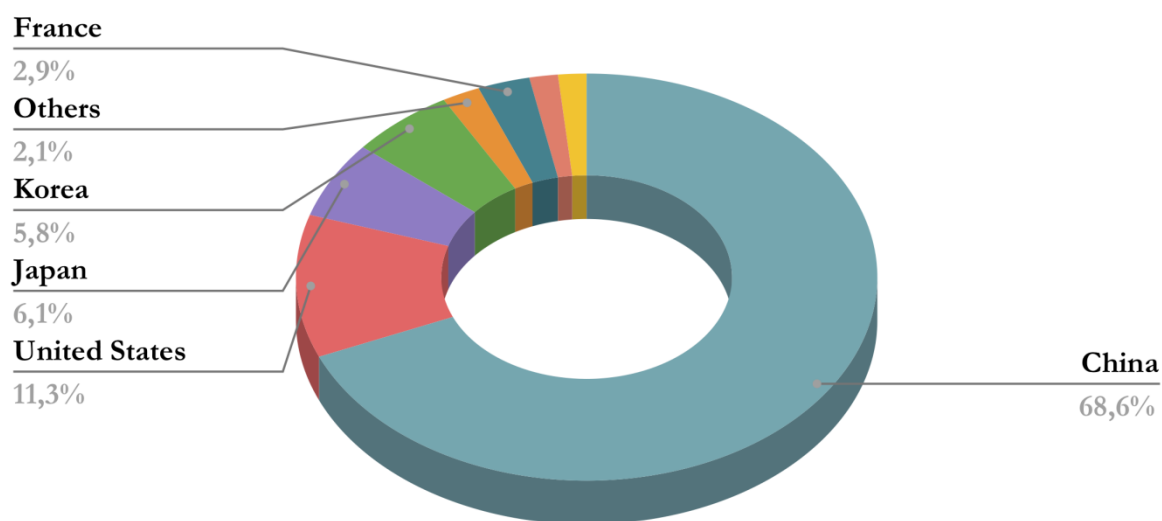
O número de patentes com uso do AF em formulações tópicas aumentou consideravelmente nos últimos 10 anos. Como pode ser visto na Figura 3, o número de patentes aumentou significativamente, passando de apenas 4 em 2008 para um máximo de 38 em 2018 e uma produção semelhante em 2019 com 37.

Figura 3. Número de patentes sobre o uso do AF em formulações tópicas por ano de publicação no período de 2008 a 2019.



Quanto aos países de origem das patentes, observou-se uma diferença significativa entre os países asiáticos (principalmente China) e os ocidentais, o que está de acordo com a tendência de uso do AF em formulações tópicas. A China é o país com maior percentual de patentes sobre o tema (68,6%), seguida pelos Estados Unidos (11,3%), Japão (6,1%), Coreia (5,8%), França (2,9%) e Brasil (1,6%) (Figura 4).

Figura 4. Percentual de patentes com uso do AF em formulações tópicas coletadas por país.



2.1.4.1 Atividade antioxidante

A patente US20140107046 aborda a combinação de pelo menos um flavonóide (baicalina e taxifolina) e AF em formulação aquosa em uma proporção que varia de cerca de 0,01 a 20% com base no peso total (PAN et al., 2014). Um hidrótropo (cafeína ou nicotinamida) ou um diol foi adicionado para aumentar a solubilidade antioxidante em água. Usando o ensaio da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), foi demonstrado que a combinação do AF com vitamina C levou a um forte aumento na atividade antioxidante em comparação com os compostos individuais. Esse efeito sinérgico foi confirmado em formulações em que o AF foi usado em combinação com baicalina e outro antioxidante, como vitamina C ou resveratrol, em que a remoção de baicalina ou resveratrol da formulação reduziu significativamente sua atividade antioxidante.

A patente KR20180073305 relatou para o AF um valor muito mais baixo (4,5 ppm) da quantidade de composto necessário para reduzir os radicais DPPH• livres em 50% (IC50), em comparação com a vitamina C (7,0 ppm), confirmando o excelente poder antioxidante do AF (HWAN; EUN; JAE, 2018).

2.1.4.2 Atividade anti-envelhecimento

A invenção KR20110101727 relatou uma composição de Peonyflorin, Cardamonina e AF que atua inibindo a atividade da colagenase, melhorando a produção do AF e estimulando a síntese de colágeno (HYUN; GYOO; NA, 2011). A inibição da colagenase foi inicialmente testada colorimetricamente com um fluorômetro em amostras contendo os ativos acima em diferentes proporções (1-3: 1-3: 8-4), usando ácido retinóico a 1% como controle positivo. O controle positivo mostrou uma taxa de inibição (40%) muito menor do que as amostras contendo ativo (62 a 68%). Em um teste *in vitro* com cultura de fibroblastos, as mesmas amostras contendo o ativo apresentaram produção de colagenase 26% superior ao controle positivo à base de vitamina C (52,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$), destacando assim uma ação sinérgica. Quanto à expressão do ácido hialurônico em uma cultura de fibroblastos de camundongo, o AF foi o mais eficaz entre os ativos testados isoladamente nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$, enquanto um comportamento sinérgico evidente foi evidente quando eles foram usados em combinação.

A invenção BR102017016356-3 propôs uma formulação de AF e ácido hialurônico em combinação com terapia de radiofrequência, que é amplamente utilizada em tratamentos anti-envelhecimento para melhorar a elasticidade da pele (AZEVEDO; MEYER; OLIVEIRA, 2017).

2.1.4.3 Atividade anti-inflamatória

A patente KR20110068258 mostrou o efeito sinérgico do AF em composições com pelo menos um dentre Polidatina e 2-metoxicinamaldeído, variando a razão em peso entre dois dos componentes acima de 1: 0,1 a 1:20 (JIN et. al., 2011). O efeito de 21 composições diferentes foi avaliado inicialmente medindo a produção de Prostaglandina 2 (PGE2) e a inibição relativa da fosfodiesterase 2 (PDE2) em cultura de células, em comparação com α -bisabolol selecionado como controle positivo. A comparação subsequente das duas melhores formulações em uma faixa de concentração mais ampla (0,0001-0,1%) mostrou que a combinação do AF com um agente anti-inflamatório teve um potente efeito inibidor sinérgico na produção de PGE 2 sem toxicidade na concentração mais alta. O efeito anti-inflamatório foi avaliado *in vivo* pela administração de 2 mg de ácido araquidônico na orelha direita de camundongos uma vez ao dia por quatro dias e deixando a esquerda como controle, medindo o edema e calculando a inibição induzida por cada formulação. A combinação de 2-

metoxicinamaldeído com AF teve um efeito anti-inflamatório 3 vezes maior do que quando usado sozinho. Esses resultados, juntamente com aqueles do poder antioxidante, sugerem que essa associação pode ter sucesso em uma ampla variedade de aplicações terapêuticas.

2.1.4.4 Prevenção de sobrecarga adiposa

A sobrecarga adiposa tem se tornado cada vez mais comum devido a hábitos pouco saudáveis, principalmente em países desenvolvidos, com alta ingestão de alimentos industrializados e pouca prática de atividades físicas. Uma consequência desse estilo de vida é o acúmulo de excesso de gordura na hipoderme, que está intimamente ligado a uma reação inflamatória sistêmica do corpo e também a uma diminuição da sensibilidade à insulina levando a doenças crônicas e graves. Este tema tornou-se antes de tudo um problema de saúde, mais do que uma preocupação estética (NARASIMHAN et. al., 2015).

Estudando o efeito lipolítico do AF, a patente FR2907338 mostrou que a adição de 0,2% do AF a uma cultura de adipócitos humanos aumentou em 24% a liberação de glicerol, apontando uma ação lipolítica significativa (YVES; JACQUES, 2008). O AF também mostrou competir por 34% com a insulina por seus receptores nos adipócitos, agindo como um mediador que inibe a lipogênese. Dessa forma, o AF inibe a atividade da insulina na lipogênese, reduzindo a síntese e a secreção da lipase.

2.1.4.5 Clareamento

A inibição da tirosinase leva à diminuição da produção de melanina, aumentando o brilho e inibindo a hiperpigmentação da pele, principalmente quando a pele é exposta ao sol. A invenção CN105581919 apresentou um complexo fosfolipídico do AF que visava ter um efeito de clareamento, especialmente aumentando a biodisponibilidade do AF ao melhorar suas propriedades físico-químicas (LI et. al., 2016). A patente também mostrou resultados promissores in vitro em termos de inibição da tirosinase e inibição da síntese de melanina celular. Um experimento realizado em 30 voluntários entre 25-45 anos mostrou um aumento no brilho da pele e redução das manchas de melanina faciais na pele. A solubilidade do AF em água, capacidade de eliminação de radicais livres, permeabilidade e permeação transdérmica foram significativamente melhoradas em comparação com AF livre. Com base nesses resultados, três formulações, a saber, um creme, uma emulsão e um óleo para a pele, foram sugeridas.

A patente US2013345307 descreve outro sistema para rejuvenescimento da pele, incluindo primeiro um peeling químico e, em seguida, um reforço que deve ser aplicado após a esfoliação e remoção das células mortas da pele, o que deve permitir que o reforço penetre mais efetivamente na pele (SANMIGUEL; NUNEZ; SAMORA, 2013). Ao comparar o efeito do AF e outros compostos fenólicos, isoladamente ou em combinações, AF em associação com floretina, vitamina C e vitamina E mostrou o melhor resultado, provavelmente porque tanto AF quanto floretina exercem efeitos clareadores com mecanismos diferentes, modulando melanócitos e fibroblastos. A eficácia desses produtos, contendo de 2 a 15% do AF em suas formulações, foi testada com sucesso em voluntários que trataram o rosto, as mãos e a região do pescoço em V, apresentando excelentes resultados no alívio de manchas solares e de acne, bem como textura de pele mais lisa.

A invenção CN103637924 focou no efeito sinérgico do ginsenosídeo Rb1 e AF como os principais ativos de uma formulação usada em uma máscara facial, em uma proporção de peso de 18:15 (p / p) (SUZHOU, 2014). Finalmente, a patente BR102015003242-0 A2 mostrou o efeito clareador de uma composição para tratar o melasma que combinava pelo menos outros dois antioxidantes além do AF e não apresentava efeitos colaterais graves como os tratamentos tradicionais (BARBOSA et. al., 2016). O Índice de Área e Severidade do Melasma (MASI) avaliado em 11 voluntários mostrou uma melhora média no aspecto da pele de 25,3% após 28 dias de tratamento.

2.1.4.6 Melhoria das características do AF

Por fim, um campo adicional que envolve o AF é o desenvolvimento de novas tecnologias e métodos para melhorar sua interação e estabilidade em formulações destinadas a aplicações mais amplas. Com isso em mente, a invenção CN101485447 explorou a inclusão do AF nas ciclodextrinas, criando uma formulação que pode ser aplicada não só na indústria farmacêutica e cosmética, mas também na veterinária e alimentícia (JING et. al., 2016). Da mesma forma, a patente BR 102016022392-0 propôs um sistema multicomponente, preparado pela complexação da biomolécula com CD e polímeros hidrofílicos, que proporciona um efeito sinérgico capaz de aumentar sua solubilidade, estabilidade e atividade antioxidante quando comparado ao AF sozinho (LIMA et.al., 2018).

A tabela 2 reporta as principais patentes sobre formulações do AF.

Tabela 2. Principais patentes sobre formulações do AF e atividade investigada

Patente	Título das patentes	Atividade	Testes realizados e citados nas patentes	Ano	País
US20140107046	Formulações cosméticas contendo pelo menos um flavonoide com AF	Antioxidante	ORAC (Oxygen radical absorption capacity assay)	2014	USA
KR20180073305	Composição cosmética para prevenir o envelhecimento da pele pelo aquecimento	Antioxidante e antienvelhecimento	Atividade antioxidante (IC50), Produção de matriz metaloproteinase-1 (MMP-1) e matriz metaloproteinase-3 (MMP-3), para uso de FA no tratamento térmico	2018	Coreia
KR20110101727	Composição para melhorar rugas na pele	Antienvelhecimento	Efeito inibidor da atividade de colagem, confirmação da síntese de colágeno promovendo efeito, aumento da expressão HAS2 no fibroblasto do camundongo NIH3T3, confirmação da melhora das rugas da pele através do teste do painel.	2011	Coreia
KR20110068258	Composição para tratamento anti-inflamatório	Anti-inflamatório	Produção de prostaglandina 2, inibição da fosfodiesterase 2 na cultura celular	2011	Coreia
FR2907338	Composição para prevenir e/ou tratar as sobrecargas adiposas e/ou celulite, por administração sistêmica e/ou local	Lipolítica	Determinação enzimática de glicerol na cultura celular, competição com insulina para seus receptores em uma cultura de queratinócitos e adipócitos	2008	França
CN105581919	Complexo AF e fosfolipídios para preparar cosméticos clareando a pele	Clareamento	Teste de inibição de tirosinase <i>in vitro</i> , teste de inibição da melanina celular	2016	China

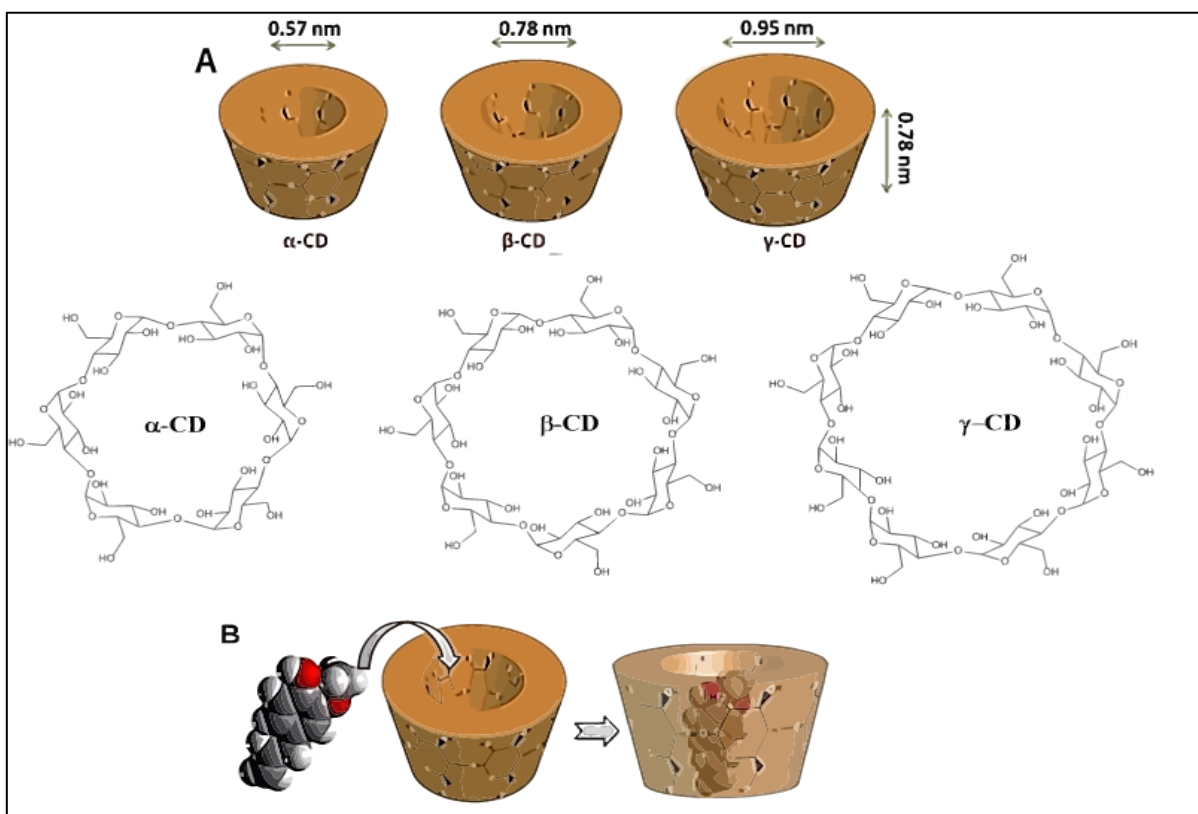
US2013345307	Sistemas e métodos para rejuvenescimento da pele	Antienvhecimento e clareamento	Aplicação nas áreas presenciais, de mão e decote dos voluntários, a avaliação foi feita observando sua experiência, com uma formulação e também analisada pelos inventores.	2013	EUA
CN103637924	Máscara facial clareando a pele	Clareamento	Apenas a fórmula e o efeito sinérgico foram mencionados com foco na composição do produto.	2014	China
BR10201500324	Composição cosmética para tratar melasma	Clareamento	Determinação do Índice de Área e Gravidade de Melasma em voluntários	2016	Brasil

2.2 CICLODEXTRINAS

2.2.1 Aspectos Gerais

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos formados por seis (α -ciclodextrinas), sete (β -ciclodextrinas) ou oito (γ -ciclodextrinas) unidades de glicose unidas por ligações α - (1,4), assumindo a forma de um cilindro oco aberto em ambas as extremidades. A cavidade interna apresenta caráter hidrofóbico capaz de acomodar uma diversidade de moléculas lipofílicas, enquanto a superfície externa possui caráter hidrofílico devido aos grupos hidroxilas livres, permitindo assim a dissolução em meio aquoso de compostos de baixa solubilidade (DEL VALLE, 2004; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). A figura 5 esquematiza a estrutura química das CDs.

Figura 5. (A) Representação esquemática α -, β - e γ -CD (ciclodextrina); (B) Representação da inclusão de uma molécula hospede na ciclodextrinas.



(Fonte: CARNEIRO et al., 2019)

Estes compostos apresentam-se fisicamente como um pó branco cristalino, higroscópico e homogêneo. Naturalmente são obtidos pela enzima glucanotransferase (CGTase), produzida

por algumas bactérias como *Bacillus macerans*, *Bacillus alcalifilico* e *Klebsiella pneumoniae* que realizam a metabolização do amido, por meio da hidrólise das ligações glicosídicas, formando a estrutura cíclica das CDs (SZEJTLI, 2002; RAJPUT; PATEL; TRIVEDI, 2016). A tabela 3 apresenta as características físico-químicas das CDs de ocorrência natural.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas das CDs

Propriedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidade de glicose	6	7	8
Massa molar (g.mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa a 25°C (%m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3

Fonte: adaptado de DELL VALLE, 2004.

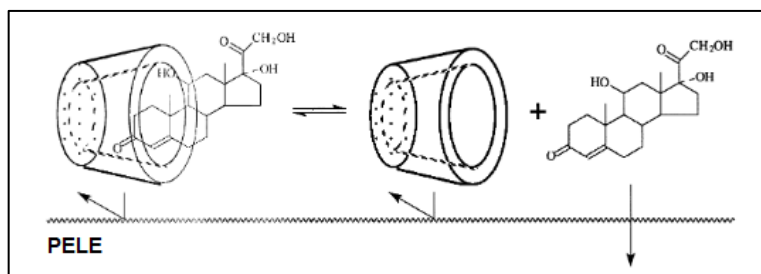
Além das CDs naturais existem as CDs quimicamente modificadas, que possuem grupos específicos ligados a uma de suas hidroxilas (C6 ou C3) com elevada capacidade de reconhecimento molecular, com destaque para a hidroxil-propil-CD (HP-CD), a sulfó-butil-éter-CD (SB-CD) e a metil-CD randomizada (RM-CD), ampliando assim suas possibilidades de aplicação (SZENTE; SZEJTLI, 1999; DAVIS; BREWSTER, 2004; CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; SAOKHAM; LOFTSSON, 2017).

As CDs se tornaram o principal domínio de utilização em diferentes áreas, principalmente para a indústria farmacêutica, pela capacidade de: Aumentar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade aquosa de moléculas hidrófobas; Mascaram sabores e odores desagradáveis; Aumentar a estabilidade físico-química das drogas e melhorar a vida útil das drogas; Modificar o local de entrega de medicamentos e/ou o perfil de distribuição; Transformar compostos líquidos em formas cristalinas sólidas ou amorfas; Diminuir a irritação gástrica ou ocular; Prevenir interações fármaco-fármaco ou fármaco-excipientes; Reduzir a volatilidade de alguns princípios ativos (DAVIS; BREWSTER, 2004; DEL VALLE, 2004; VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; MARQUES, 2010; CONCEICAO et al., 2017; CONCEIÇÃO et al., 2018).

Embora as CDs sejam ou não parcialmente digestíveis pelas enzimas do trato gastrointestinal humano (GI) e fermentadas pela microflora intestinal, produzem citotoxicidade insignificante (principalmente β -CD) em alimentos (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2009; ALONSO; FONTECHA; CUESTA, 2016) . Mesmo sendo consideradas substâncias geralmente reconhecidas como seguras, a segurança da CD e a toxicidade geralmente dependem da via de administração e do tipo utilizada. Quando administrado por via oral, as CDs são absorvidas de forma insignificante do trato gastrointestinal, sendo, portanto, praticamente atóxicas devido à sua natureza volumosa e hidrófila. No entanto, doses mais elevadas de CDs podem ser prejudiciais e produzir danos renais irreversíveis ou disfunção (LUKE, TOMASZEWSKI, DAMLE, 2006; STELLA; HE, 2008). Além disso, CDs como HP- β -CD e SBE- β -CD são consideradas seguras para administração parenteral (MICHAELIS et al., 2001; QUAGLIA et al., 2009; GIDWANI; VYAS, 2015). Portanto, as CDs são bem toleradas e atóxicas se utilizados em faixas de concentração segura já bem descritas na literatura (CARNEIRO et al., 2019).

Com relação a liberação transdérmica, atribui-se que permeiam as membranas biológicas com considerável dificuldade, devido a massa molar elevada e a natureza hidrofílica das CDs. Diante disto, a absorção cutânea na forma intacta da molécula é extremamente limitada, portanto é considerada como de baixa toxicidade por esta via, onde a fração livre do fármaco que está em equilíbrio com o complexo é que está disponível para a absorção percutânea (LOFTSSON; IRIE; UEKAMA, 1997; MASSON, 2001; MORAIS; VEIGA, 2002; CAL; CENTKOWSKA, 2008) Ainda segundo Loftsson; Olafsson, 1998 a pele sendo relativamente lipofílica tem baixa afinidade pelas moléculas de CDs hidrofílicas. Por esta razão ela permanece na fase hidrofílica da membrana, ou seja, no veículo aquoso (creme óleo/água ou hidrogel). Assim, apenas a fração livre do fármaco vai sendo absorvida, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6. Permeação da molécula de hidrocortisona através da pele a partir de uma CDs. (Adaptado de Loftsson; Olafsson, 1998).



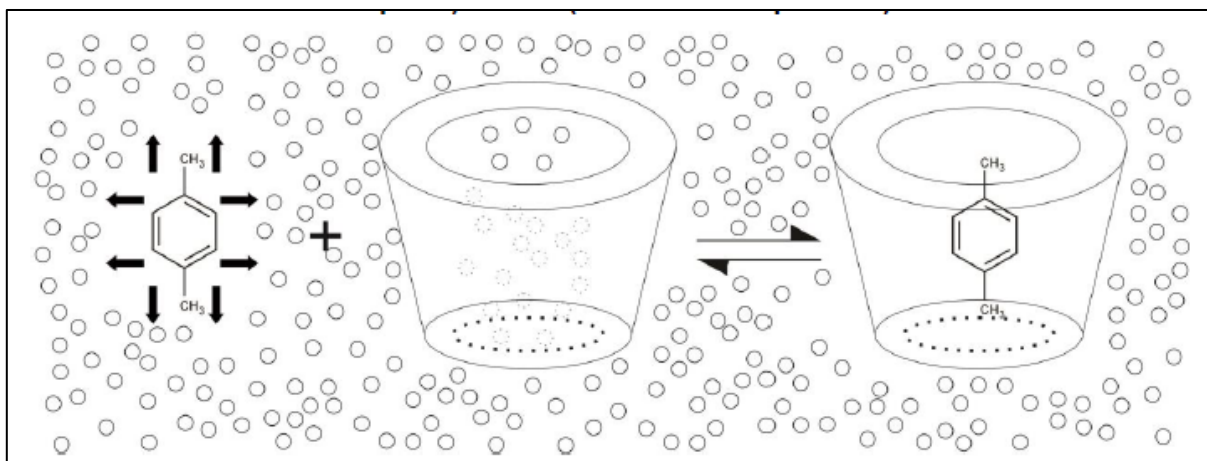
Alguns complexos de inclusão contendo AF já foram abordados pela literatura. Os sistemas relatados incluem α -, β - e γ -ciclodextrinas e dentre as modificadas apenas a HP- β -CD, na tentativa de conferir maior estabilidade a molécula, bem como aumentar sua solubilidade em meio aquoso e aumento da entropia (ANSELMINI et al., 2006, 2008; WANG, et al., 2011; GONZÁLEZ-MONDRAGÓN et al., 2016)

2.2.2 Complexo de inclusão entre fármacos e CDs

O termo complexo de inclusão define-se como uma associação de duas ou mais moléculas, onde uma das moléculas (hospedeira), inclui total ou parcialmente uma molécula hospede com ausência de ligações covalentes (VIEIRA et al., 2015).

A principal força motriz que favorece a encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água, por moléculas hóspedes adequadas (Figura 7). Segundo a teoria do efeito solvofóbico, considerando um soluto pouco solúvel em água, existe uma alta tensão interfacial entre suas moléculas e a água, esta tensão é diminuída à medida que o soluto se insere no interior da cavidade da CD. Assim, a formação do complexo é impulsionada devido à diminuição da área de contato entre o soluto e o solvente que não possuem afinidade (CONNORS; MULSKI; PAULSON, 1992). Um processo termodinamicamente viável por favorecer a alteração da entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, contribuindo para aumento da estabilidade do complexo formado (GUEDES et al., 2008; LYRA et al., 2010).

Figura 7. Representação esquemática da formação de complexos de inclusão em meio aquoso



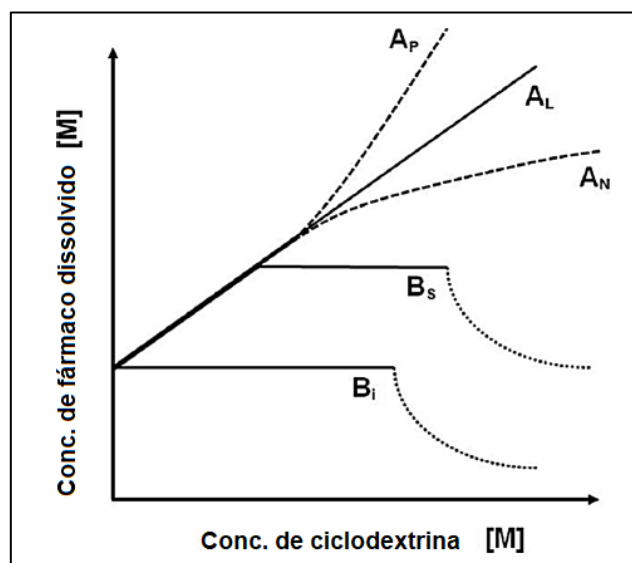
Fonte: PINHEIRO, 2017

As principais forças que levam a complexação e estabilização dos complexos de inclusão são forças fracas, tais como interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (GÓRNAS et al., 2009; SAJEESH et al., 2010). As interações podem ser formadas e quebradas de forma dinâmica e em solução aquosa esses complexos podem ser rapidamente dissociados. As taxas de formação e dissociação dos complexos são muito próximas, apresentando meia vida de apenas alguns milésimos de segundo, isto indica que estão continuamente sendo formados e dissociados (GUEDES et al., 2008)

Para avaliar os complexos entre fármacos e CDs, foi desenvolvida por Higuchi e Connors uma metodologia bastante aceita e bem caracterizada na literatura, sendo utilizada até os dias atuais e revisada por importantes grupos de pesquisa em CDs ao redor do mundo (CHALLA et al., 2005; BREWSTER; LOFTSSON, 2007; KURKOV; LOFTSSON, 2013). Propõem a construção de um diagrama de solubilidade de fases, obtido através dos resultados de solubilidade da molécula hóspede em soluções com concentrações crescentes de CDs. Esta técnica considera a formação do complexo entre fármaco e CD como uma reação reversível em equilíbrio, que possui uma constante de formação e dissociação.

A representação gráfica da solubilidade do soluto em função da concentração de CD fornece dados para calcular a constante de estabilidade do complexo entre o fármaco e a CDs, bem como a estequiometria de associação entre eles. Esta representação gráfica pode gerar diversos perfis, que podem ser observado na Figura 8.

Figura 8. Diagrama de solubilidade de fases.



Fonte: JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018

Os diagramas de solubilidade com perfil tipo A, indica que a CD está aumentando a solubilidade do fármaco e podem ser classificados como: AL (linear) significa que o aumento da solubilidade é linear em função da concentração de CD, assumindo-se uma estequiometria 1:1; AP (positivo) representa um desvio positivo na linearidade do diagrama e indica ordens superiores a 1 na formação dos complexos com relação à CDs; AN (negativo) indica que o aumento na concentração de CDs modificou alguma propriedade no sistema, diminuindo a razão de aumento da solubilidade do fármaco, este comportamento pode ocorrer devido alterações de agente solubilizante ou agregação dos complexos formados (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Os diagramas com perfil do tipo B indicam que a CD consegue aumentar a solubilidade do fármaco até uma determinada concentração e logo em seguida ocorre uma precipitação e podem ser classificados em: BS (solúvel) ocorre quando o complexo possui solubilidade limitada, onde inicialmente há um aumento da concentração da molécula hóspede e ao atingir o limite de solubilidade ocorre a precipitação e diminuição da concentração de fármaco no meio; BI (insolúvel) caracteriza-se quando o complexo é insolúvel e há um equilíbrio inicial, mas após determinada concentração ocorre a precipitação do complexo (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006; BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A partir dos diagramas de solubilidade, quando apresenta a conformação do tipo AL, a afinidade de ligação entre fármaco e CDs pode ser quantitativamente observado através da constante de estabilidade (K_c):

$$K_c = \frac{\text{inclinação}}{S_0 (1 - \text{inclinação})} \quad (1)$$

Onde S_0 corresponde a solubilidade intrínseca da molécula hospedeira.

Valores baixos de K_c indicam a formação de complexos lábeis, prevalecendo fármaco não complexado. Já valores mais elevados indicam que há predominância de complexação. (GREBOGI et al., 2012). A tabela 4 descreve os valores de K_c e a força de ligação correspondente.

Tabela 4. Valores de K_c e a força de ligação correspondente entre a molécula hospede e a CD

Valor de K_c (M^{-1})	Força da ligação
<500	Muito fraca
500-1000	Fraca
1000-5000	Moderada
5000-20000	Forte
>20000	Muito forte

Fonte: (CARRIER; MILLER; AHMED, 2007; TAKAHASHI, 2009)

Para a grande maioria dos substratos, as técnicas de complexação utilizadas são procedimentos simples e a escolha do método experimental, depende fundamentalmente das características do substrato que se está trabalhando e, se é preparado em escala laboratorial ou industrial. Na bibliografia são descritos diversos métodos de preparação dos complexos de inclusão, destacando-se co-precipitação, mistura física, suspensão, malaxagem, liofilização, fluido supercrítico, rotaevaporação, spray dryer (BARBOSA et al., 2014).

2.2.3 Complexos multicomponentes

Em algumas situações a eficiência de complexação entre a molécula hóspede e a CDs é baixa, inviabilizando os processos, exigindo quantidades inviáveis de complexos para uso nas formas farmacêuticas sólidas ou líquidas. Gerando assim entraves no que concerne os processos tecnológicos (volume da preparação) e financeiro (custo da preparação), já que a CD é uma matéria-prima de custo relativamente alto (SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

Diante deste contexto, a tecnologia farmacêutica investiu em estratégias para o incremento do efeito solubilizante das CDs. Através do ajuste do pH do meio, uma vez que os complexos são mais estáveis quando obtidos com fármacos não ionizados ou a formação de complexos multicomponentes (LIU et al., 1992).

Complexos multicomponentes são complexos entre fármacos e CDs adicionados de um ou mais componentes para potencializar os efeitos terapêuticos, seja com um sinergismo na solubilidade ou com a potencialização da absorção e biodisponibilidade por mecanismos diversos, além de requerer também menores quantidades de CD numa formulação (SZENTE; SZEJTLI, 1999).

Geralmente, realiza-se a adição de um polímero e/ou tensoativo, mas diversos são os compostos que podem ser utilizados desde aminoácido, co-solventes, metais, íons orgânicos ou até mesmo outros fármacos (DE MELO et al., 2013; KURKOV; LOFTSSON, 2013; ALOISIO; DE OLIVEIRA; LONGHI, 2016).

A obtenção de multicomponentes com polímeros ganhou maior aceitação devido ao custo relativamente baixo desta matéria-prima (LAHIANI-SKIBA et al., 2006). Com relação aos polímeros, o incremento na eficiência de complexação das CDs pode ser aumentada por adição ao meio complexante de uma reduzida quantidade, resultando na formação de um complexo multicomponente fármaco-CD-polímero, também designado por co-complexo. Este complexo, em geral, apresenta um notável aumento de solubilidade comparativamente ao correspondente complexo binário (LOFTSSON, et al., 1994).

Os requisitos mais importantes na escolha de polímeros para formar complexos de inclusão com drogas e CDs são a solubilidade em água e ausência de atividade biológica. O polímeros mais usados para este propósito podem ser classificado como natural, semissintético e sintético (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006), como detalhado na tabela 5.

Tabela 5. Polímeros comumente utilizados para obtenção de sistemas multicomponentes com CDs.

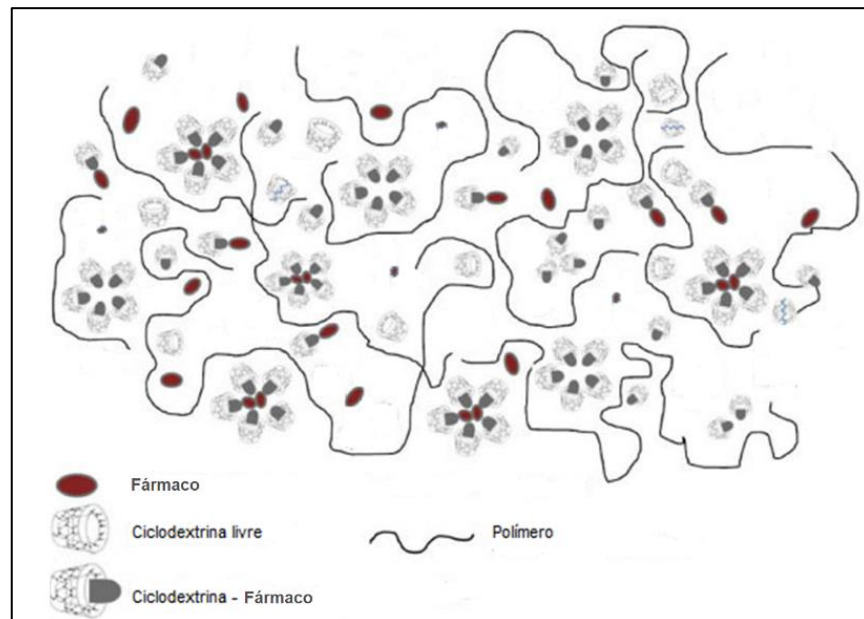
Classificação dos polímeros	Polímero
Natural	Pectina
	Mucina
	Ágar
	Ácido algínico
	Carregenina
	Caseína
	Schizophyllan
Semissintético	Gelatina
	Metil celulose (MC)
	Hidroxietilcelulose (HEC)
	Hidroxipropilcelulose (HPMC)
	Hidroxietilmetilcelulose (HEMC)
Sintético	Carboximetilcelulose (CMC)
	Povidona (PVP)
	Polietilenoglicol (PEG)
	Copovidona
	Polivinil álcool (PVA)

Fonte: (MIRANDA et al., 2011)

Não há nenhum intervalo pré-estabelecido de polímero ideal e concentração para a obtenção de complexos multicomponentes. No entanto, é sabido que, em concentrações elevadas, a viscosidade aumenta, prejudicando a complexação (RIBEIRO et al., 2003). O mecanismo pelo qual a eficiência de complexação das CDs é aumentada na presença dos polímeros não está totalmente esclarecido. Já a formação dos complexos está relacionado com o mecanismo dos polímeros nas soluções aquosas de tensoativos (LOFTSSON, 1995; GREBOGI, 2009). Em solução aquosa, os polímeros diminuem a mobilidade das CDs e

augmentam a solubilidade dos complexos formados, além de alterarem a hidratação das moléculas de CDs, bem como sua estrutura tridimensional, atuando como co-complexante (Figura 9) (LOFTSSON, 1998).

Figura 9. Representação esquemática de um sistema multicomponente fármaco-CD-polímero.



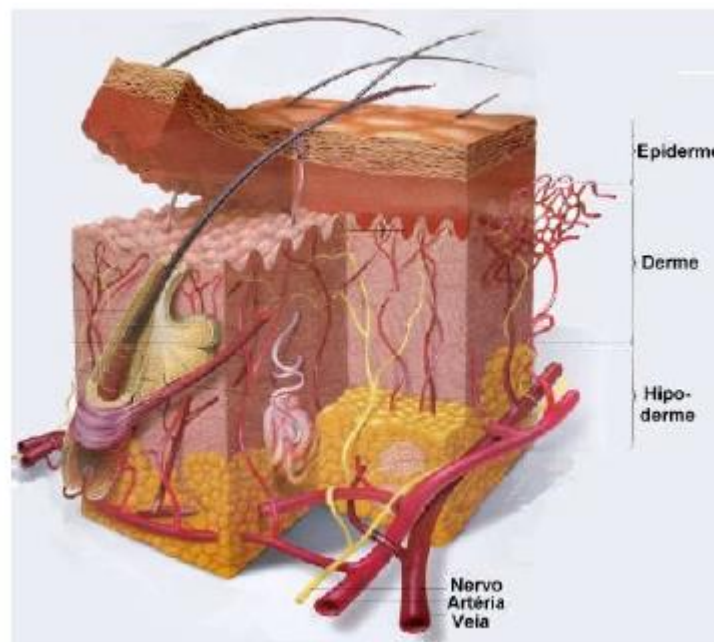
Adaptado de Souza; Freitas; Oliveira, 2016

Apesar dos estudos de solubilidade de fases permitirem uma avaliação do efeito das CDs sobre a solubilidade do fármaco, eles apenas dão uma indicação sobre a possível formação de complexos de inclusão, mas não fazem a distinção entre outras associações externas que podem ocorrer (SCHNEIDER et al., 2002; LOFTSSON; SAOKHAM; SÁ COUTO, 2003). As caracterizações realizadas para os complexos de inclusão no estado sólido se aplicam para caracterizar sistemas multicomponentes, no que se diz a respeito de fármaco-CD-polímero.

2.3 PELE E VIAS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A pele é o maior órgão do corpo humano, podendo apresentar uma área total de até 25.000 cm² em um adulto jovem de estatura mediana. Possui várias funções, dentre elas limitar a passagem de produtos químicos, estabilizar a temperatura e mediar as sensações de calor, frio, toque e dor. Sendo um órgão em contato direto com os elementos externos, constitui-se como uma via potencial de aplicação de fármacos pelo seu fácil acesso e grande superfície de contato. Ela é dividida em três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 10) (HARRIS, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; EVANS, 2013).

Figura 10. Representação das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: BEMVINDO, 2006

A hipoderme é a camada mais profunda, composta por tecido adiposo onde estão presentes vasos sanguíneos e nervo que atingem a derme, essa camada é responsável pelo isolamento térmico, proteção mecânica, deslizamento da pele, armazenamento de substância energética. (BARRY, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme consiste num tecido resistente e elástico, sendo a camada intermediária que sustenta e nutre a epiderme. Constituída por fibras de colágeno e elastina, abriga as estruturas

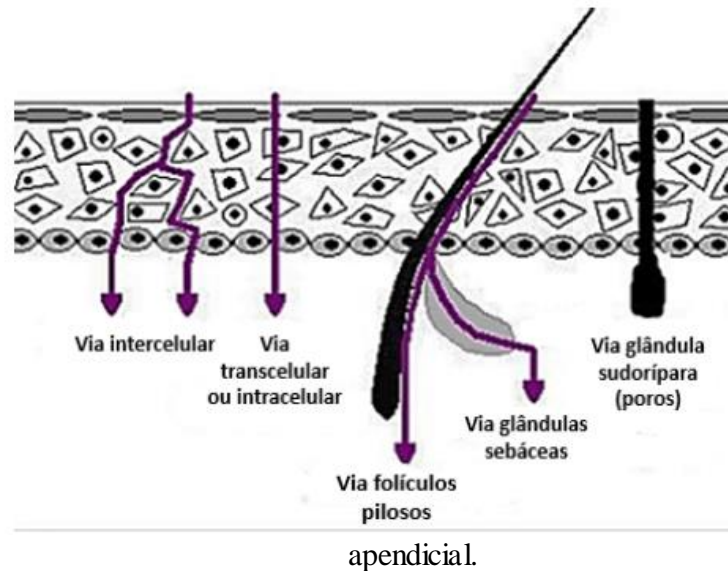
vasculares e nervosas (responsáveis por transmitir sensações de pressão e tato), glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos (RIBEIRO, 2010; RIVITT, 2014).

A epiderme é a camada mais externa da pele e é constituída por diferentes subcamadas denominadas estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato basal está situado na porção mais interna da epiderme e é composto por células-tronco e dão origem aos queratinócitos e melanócitos. Como a atividade germinativa é muito alta, nela ocorre a migração celular das subcamadas mais internas para as mais superficiais, este processo denomina-se queratinização. A medida em que essas células se movimentam para as demais camadas da epiderme elas sofrem diversos processo de diferenciação e queratinização, ao chegarem no estrato córneo se apresentam anucleadas, achatadas, desidratadas e queratinizadas e assim são chamadas de corneócitos (HARRIS, 2009; ALEXANDER et al., 2012).

Os corneócitos constituem o estrato córneo da epiderme, designadas como células ricas em queratina que estabelecem ligações entre si por meio de estruturas conhecidas como desmossomas, todo esse sistema está envolto por uma matriz lipídica intercelular constituída por ceramidas, ácidos graxos e colesterol. Além disso, os corneócitos também são revestidos por uma fina camada formada a partir de substâncias secretadas pelas glândulas sebáceas, juntamente com o suor, bactérias e células mortas da pele. Todos estes elementos conferem rigidez à superfície da pele e que seja uma barreira eficiente que dificulta a perda de água do organismo, bem como a permeabilidade de microorganismos e substância químicas, incluindo fármacos e cosméticos (ELIAS, 2007; LIN, et al., 2011).

Apesar da limitação imposta, a permeação de fármacos através da pele íntegra pode acontecer através do estrato córneo e dos apêndices cutâneos, assim são descritas três vias diferentes: a via apendicular, a via intercelular e a via transcelular (Figura 11). O estrato córneo, funciona como um fator limitante da penetração do fármaco até as camadas mais internas que constituem a pele, em contraposição a derme que não possui função significativa de barreira para elementos externos (AULTON, 2005; MATHUR; SATRAWALA; RAJPUT, 2010).

Figura 11. Vias de permeação de fármacos pela pele: via transcelular, via intercelular e via



Fonte: PINHEIRO, 2017.

A via apendicular, inclui a passagem de substâncias através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Entretanto, estes apêndices contribuem com apenas 0,1% do total da superfície da pele humana e sua contribuição é considerada muito pequena para alguns autores (AKHTAR, 2014). Na via transcelular o fármaco passa através dos corneócitos e da matriz celular, já na via intercelular ele se difunde entre os corneócitos pela matriz lipídica que os circundam (HAIGH et al., 1992; GRATIERI et al., 2008).

A difusão de substâncias através do estrato córneo pode ser explicada através de três etapas: (I) O fármaco é liberado de dentro do veículo para a superfície do estrato córneo; (II) Orientada pelo coeficiente de partição ocorre a passagem do fármaco para o interior do estrato córneo; (III) O fármaco difunde-se através da barreira (STORPIRTIS, 2009).

2.4. FORMULAÇÕES DE APLICAÇÃO TÓPICA

Produtos farmacêuticos destinados à aplicação tópica na pele podem ser subdivididos de acordo com sua função, em duas categorias. A primeira categoria inclui formulações que sejam preferível que o ativo fique presente somente na superfície da pele ou penetre entre as camadas da pele, esta categoria compreende as formulações dermatológicas. A segunda

categoria compreende os sistemas transdérmicos, que são formulações desenvolvidas para absorção dos fármacos pela circulação sanguínea. Apesar de possuírem características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (JHAWAT et al., 2013; ALVES, 2018)

As formulações dermatológicas incluem produtos comumente relacionados com formulações semissólidas, como pomadas, cremes, loções e géis tratando-se de condições que seja preferível que o fármaco vença a barreira do estrato córneo e atinja as camadas mais profundas, sem que haja absorção sistêmica fármaco (ANSEL, 2007; JHAWAT, 2013; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2017).

A concentração de fármaco nas camadas da pele dependerá da eficiência dos processos de liberação da formulação semissólida que o contém, este processo depende do veículo utilizado e do modo de preparo da formulação . A determinação da quantidade de fármaco que chega ao local de ação é uma medida importante capaz de prever a eficácia do produto (ALBERTI et al., 2001; PRISTA et al., 2003; GRATIERI et al., 2008; FREITAS et al., 2015).

2.5. PROMOTORES DE PERMEACÃO

Há várias estratégias para promoção da permeação dos fármacos e incremento na velocidade, destacando-se o uso de promotores físicos ou químicos para o aumento desta difusão. Assim, a definição de um promotor é a de um composto químico ou efeito físico que tem como finalidade reduzir reversivelmente a resistência do estrato córneo sem danos as células viáveis.

Segundo Barry, 1993 e Aulton 2005, as características ideais de um promotor de permeação: farmacologicamente inerte, sem nenhum receptor no organismo; baixa toxicidade, não provocar irritações e não alergênico; ação rápida, com efeito adequado; após ser removido, o estrato córneo deve recuperar imediatamente e totalmente sua integridade; não causar perda de substâncias endógenas, através da pele; favorecer a solubilidade do fármaco; ser compatível com o fármaco e adjuvantes da formulação; possuir boa espalhabilidade e sensação sobre a pele, além de, se possível, ser inodoro, insípido, incolor; economicamente viável.

Os promotores físicos favorecem a penetração de compostos no estrato córneo por alterar temporariamente e reversivelmente essa barreira. Podem ser citadas como técnicas físicas a iontoforese, a sonoforese, a eletroporação, microagulhamento e a magnetização.

Dentre os promotores químicos destacam-se os solventes comuns, como a água, álcoois, dimetil sulfóxido, propilenoglicol, azona e seus derivados, os tensoativos (aniônicos, catiônicos e não iônicos), ácidos graxos, terpenos e seus derivados, alquil sulfóxidos, ésteres de açúcares, uréia e outros (CHORILLI et al., 2007).

Uma das ações mais importante dos promotores na barreira do estrato córneo é a ruptura da estrutura da bicamada lipídica e o aumento da fluidificação desta região, permitindo maior mobilidade do fármaco. No entanto, alguns promotores também interagem com as proteínas intracelulares. Eles podem solvatar as células córneas, quebrar ligações aquosas, expandir as estruturas e competir com os fármacos pelos sítios de ligação com o hidrogênio. Observações empíricas mostram que a ação de alguns promotores pode ser exacerbada se formulados conjuntamente com co-solventes, como por exemplo o propilenoglicol, que parece agir solvatando as proteínas intracelulares. A terceira característica é que quando uma quantidade suficiente de solvente entra no estrato córneo pode ocorrer alteração do comportamento de partição do fármaco ou de um promotor lipídico co-administrado (GOODMAN; BARRY, 1989; LOPES et al., 2008)

2.5.1. Uso de CDs como promotores de permeação

As ações de solubilização, estabilização e proteção de CDs para as substâncias ativas os tornam úteis para diversas aplicações. Estão onipresentes em uma variedade de produtos, incluindo alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (BUSCHMANN; SCHOLLMEYER, 2002; PEREIRA; BRAGA, 2018).

A presença de CDs permite otimizar a entrega de drogas destinadas tanto ao uso local quanto sistêmico. Elas podem alterar a função da barreira da pele, interagindo com os lipídios ou mesmo com os componentes lipídicos da membrana celular, como fosfolipídios ou colesterol. Isso altera as propriedades do estrato córneo e leva ao aumento da permeação do medicamento. As CDs podem diminuir a irritação dérmica causada pelo fármaco, uma vez que na sua presença, apenas uma parte do fármaco se encontra livre, devido ao equilíbrio existente entre este. Alguns autores defendem que as CDs interagem com o estrato córneo (fosfolipídios, colesterol e proteínas) e, conseqüentemente, alteram a sua função barreira, podendo causar irritação cutânea, principalmente quando usadas em altas concentrações (BRAGA; PAIS, 2018; MORAIS; VEIGA, 2002) .

Nos anos 90, a pesquisa cresceu de forma constante e mais dos efeitos dos CDs pele ficou conhecida. CDs naturais e modificadas demonstraram melhorar a permeabilidade transdérmica de vários fármacos (DE MIRANDA et al., 2011).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos derivados de CD continuam a crescer, o que permite expandir ainda mais sua gama de atividades. Já em 2016 uma nova molécula, β -CD octenil succínico, demonstrou boas propriedades de tensão superficial e manteve as emulsões de teste estáveis durante um período de observação de 30 meses, abrindo assim a porta para os CDs agirem como agentes emulsionantes. As CDs são conhecidas por acelerarem e desacelerarem vários tipos de reações tais como hidrólise, oxidação, fotólise, desidratação e isomerização, dependendo das características dos complexos de inclusão que se formam nas soluções aquosas e tampões (MORAIS; VEIGA, 2002).

Assim, as CDs e seus derivados hidrofílicos aumentam a solubilidade e estabilidade de fármacos em preparações dérmicas tais como soluções aquosas e emulsões. Além disso, as CDs e especialmente os seus derivados hidrofóbicos, podem modificar a permeabilidade dos fármacos através da pele, a bioconversão de fármacos nos tecidos alvo e a irritação tópica causada por alguns fármacos (BRAGA; PAIS, 2018; MORAIS; VEIGA, 2002)

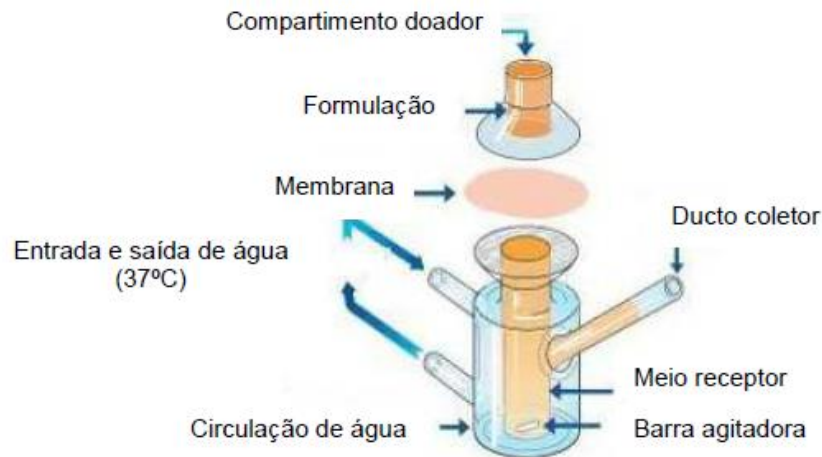
2.6. ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O teste de liberação *in vitro* de substâncias é uma ferramenta necessária desde o desenvolvimento até o controle de qualidade do produto acabado. Este estudo é conduzido através da passagem de fármacos por membranas, sendo possível o controle das condições experimentais com maior precisão, quando comparado a ensaios *in vivo* que possuem amostragem mais complexa e condições difíceis de controlar (BAERT et al., 2010; POLININI et al., 2014).

O comportamento de liberação do fármaco das formulações para fins de uso tópico, podem ser avaliadas *in vitro* empregando-se um sistema bicompartimental com difusão vertical. Método considerado simples e reprodutível, sendo possível controlar as condições experimentais. Um sistema bastante conhecido e difundido denomina-se célula de difusão do tipo Franz (Figura 12) possui dois compartimentos (doador e receptor) separados por uma membrana que pode ser do tipo sintética ou natural. O compartimento doador contém o fármaco/formulação e o compartimento receptor contém uma solução que favorece a difusão do ativo do compartimento doador para o receptor. A passagem da substância de um

compartimento para outro é avaliada em tempos pré-definidos, quantificando-se as alíquotas retiradas do meio receptor (SILVA et al., 2010; MELO, 2012).

Figura 12. Representação esquemática da célula de Franz.



Fonte: MELO, 2012

O meio receptor deve ser definido de acordo com a solubilidade da substância teste, de forma a manter a condição *sink* do sistema, ou seja, o meio receptor deve possuir alta capacidade de dissolver e carrear o fármaco e não deve exceder 10% da concentração de saturação para o fármaco no final do teste. Soluções salinas de pH 7,4 são usualmente escolhidas para compostos hidrossolúveis enquanto soluções contendo solvente orgânico, como etanol ou polietilenoglicol, podem ser utilizadas para estudos com substâncias lipofílicas. (ENGELHARDT, 2015; ALVES, 2018).

A temperatura do fluido receptor deve ser rigidamente controlada, para produtos destinados a aplicação na superfície da pele, $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ é adequado; para produtos destinados à aplicação retal ou vaginal, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ é mais apropriado. A taxa de agitação deve ser constante em todas as células, o valor comumente utilizado é de 600 rpm, embora outras velocidades possam ser utilizadas (KLEIN; HECKART; THAKKER, 2018).

As peles humanas são os modelos mais apropriados para estudos desta natureza, pois apresentam a barreira do estrato córneo. Pode ser proveniente de cadáveres ou cirurgias plásticas, entretanto, a pouca disponibilidade deste tipo de material, a necessidade de

submissão ao Comitê de Ética, os custos envolvidos para armazenamento e alta variabilidade entre as amostras tornam seu uso limitado (BARBERO; FRASCH, 2009).

Como alternativa, pesquisadores costumam utilizar pele de animais (rato, suíno, cobra, camundongo) e membranas sintéticas. Existe uma variedade de membranas sintéticas disponíveis no mercado. Apesar de mais simples e porosas, tem sido utilizadas para estudos de difusão e liberação tópica há muito tempo (MONTENEGRO et al.,2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de novos sistemas multicomponentes com ciclodextrinas e polímeros hidrofílicos utilizando ácido ferúlico e obtenção de um modelo de membrana que seja semelhante a composição lipídica da pele humana para ensaios de liberação *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar membrana para verificar a liberação *in vitro* do ácido ferúlico a partir de formulações semissólidas, através de células de difusão de Franz.
- Realizar avaliação das interações entre o ácido ferúlico; ciclodextrinas e polímeros hidrofílicos e selecionar os melhores adjuvantes para compor os sistemas multicomponentes;
- Desenvolver e caracterizar sistemas multicomponentes ácido ferúlico: ciclodextrina: polímeros hidrofílicos utilizando diferentes métodos de obtenção;
- Avaliar a estabilidade físico-química e o potencial antioxidante *in vitro* dos sistemas multicomponentes com ácido ferúlico;
- Obter um novo insumo inovador com aumento da solubilidade, estabilidade físico-química e potencialização do ácido ferúlico, com depósito de patente e registro da marca Cicloferulic[®].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Para otimização da membrana sintética foram utilizadas membranas filtrantes de acetato de celulose com tamanho dos poros de 0,1 μm , 75% porosidade e espessura de 150 μm (modelo VCWP04700, Millipore[®], Darmstadt, Alemanha). Colesterol 99% de pureza (Sigma[®], St. Louis, MO, EUA), lipoid E80[®] (Lipoid[®], Ludwigshafen, Alemanha), 1-octanol 99 % pureza (Synth[®], São Paulo, SP, Brasil).

As formulações avaliadas eram compostas por ácido ferúlico (AF) (Henrifarma[®], São Paulo, SP, Brasil); Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer (Lubrizol[®], Cleveland, OH, EUA); Disodium EDTA (DEG[®], São Paulo, SP, Brasil); Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7 (Focus Química[®], São Paulo, SP, Brasil); Methylparaben (Mapric[®], São Paulo, SP, Brasil); Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben (Mapric[®], São Paulo, SP, Brazil); Propylene glycol (Synth[®]); Ethoxydiglycol (Viafarma[®], São Paulo, SP, Brasil) e água destilada. Todas as matérias-primas foram citadas segundo a INCI (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos).

Na etapa de seleção das CDs e polímeros que fariam parte da composição dos sistemas multicomponentes foram empregadas β -ciclodextrina (β -CD), Metil- β -ciclodextrina (M- β -CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) adquiridas da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil). Os polímeros polietilenoglicol 6000 (PEG), polivinilpirrolidona K-30 (PVP), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) provenientes da Biotec[®], Polivinil caprolactam-acetato de polivinilo-polietilenoglicol (Soluplus[®], SOL), Copolímero de vinilpirrolidona-acetato de vinilo (Kollidon[®] VA64, KOL) adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil).

Para realização dos ensaios antioxidantes utilizou-se ácido ascórbico, ferrozina, nitroblue tetrazolium (NBT), riboflavina, violeta de pirocatecol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, SP, Brasil). Ácido gálico, peróxido de hidrogênio, sulfato de ferro heptahidratado, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido sulfúrico, dimetilsulfóxido (DMSO) adquiridos da CAQ Casa da Química Indústria e Comércio (Diadema, SP, Brasil). Metionina proveniente da Synth[®] (Diadema, SP, Brasil). Ácido etilenoaminoacético (EDTA) proveniente da VETEC[®] (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Salicilato de sódio adquirido da FLUKA[®] (Steinheim, Alemanha). Cloreto de ferro e reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Merk[®] (Darmstadt, Alemanha); Sulfato de cobre,

molibdato de amônia foi adquirido da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Todos os experimentos, quando necessário, foram realizados com água deionizada (<1,3 μ S) obtida por osmose reversa, e os reagentes de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e caracterização da membrana sintética e otimizada

4.2.1.1 Preparação de solução lipídica

A solução lipídica foi composta por 2,10% de colesterol, 1,70% Lipoid E80 e 96,2% 1-octanol, de acordo com o estudo experimental de Corti et al., 2006 a homogeneização, a solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar e refrigerada a 4 ± 2 °C.

4.2.1.2 Obtenção da membrana otimizada por impregnação

As membranas de acetato de celulose foram cortadas manualmente com diâmetro de 1 cm. As membranas foram lavadas antes do uso para remoção de qualquer sujeira que pudesse interferir na execução dos experimentos e até mesmo na impregnação. A lavagem foi realizada por meio da imersão das membranas em tampão fosfato (PBS), pH 7,4, por 60 minutos, logo em seguida a solução foi descartada, e um novo ciclo de lavagem de 60 minutos foi realizado. Finalmente, as membranas foram removidas da solução, e o excesso de PBS foi removido com papel absorvente. Em seguida, as membranas foram submersas diretamente na solução lipídica por 2 horas (60 minutos para cada lado das membranas), removidas da solução e colocadas para secar em papel absorvente por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) e armazenadas em tubos Falcon sob refrigeração a 4 ± 2 °C. A impregnação foi inicialmente verificada observando-se a mudança de aparência da membrana de opaca para translúcida (CORTI et al., 2006).

4.2.1.3 Métodos de caracterização

4.2.1.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas calorimétricas das amostras foram obtidas em um calorímetro, modelo DSC-50 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). As amostras (2,0 mg) foram colocadas em um cadinho de alumínio hermeticamente fechado sob atmosfera de nitrogênio e submetidas a fluxo de gás de 100 mL.min⁻¹, sob taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 a 350 °C. A análise das curvas foi realizada utilizando-se o software *TA analyses* (TA Instruments, New Castle, DE, USA) (SILVA JÚNIOR et al., 2019). Foram realizadas análises térmicas na solução lipídica e seus constituintes, membrana sintética e membrana otimizada. Além disso, a membrana otimizada foi testada 24 horas e 15 dias após a impregnação para verificar sua estabilidade

4.2.1.3.2 Microscopia da Força Atômica (MFA)

Para microscopia da Força Atômica, foi utilizado um microscópio SPM-9700 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). Foram realizadas análises em membrana sintética e otimizada (contato intermitente), com área de varredura de 1, 2, 5 e 10 μm e velocidade de varredura de 1 Hz.

4.2.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram submetidas à metalização com ouro, montadas em alumínio usando fita dupla face e posteriormente analisadas com um microscópio eletrônico de alta resolução SEM-FEG (Zeiss[®], Oberkochen, Alemanha). Imagens eletrônicas secundárias foram adquiridas com uma tensão de aceleração entre 5 e 10 kV. Imagens de elétrons de retrodifusão foram realizadas com uma tensão de aceleração de 15 kV (FERREIRA et al., 2018).

4.2.2 Preparação das formulações semissólidas

Foram preparadas formulações semissólidas para veiculação do AF e posterior avaliação da sua liberação em membrana otimizada. A composição das formulações gel e

creme-gel estão listadas na tabela 6. Os componentes foram determinados com base no estudo de compatibilidade entre o AF e os excipientes utilizados em formulações semissólidas realizadas por Bezerra et al., 2017.

Tabela 6. Composição (% p/p) das formulações semissólidas.

Componentes	Concentração (%p/p)	
	Gel	Gel – crème
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,7	-
Polyacrylamide (and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7;	-	3,5
Methylparaben	0,1	-
Dissodium EDTA	0,1	0,1
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	-	0,5
Propylene Glycol	3,0	3,0
Ferulic acid	0,5	0,5
Ethoxydiglycol	0,5	0,5
Distilled water	94,5	91,9

A formulação gel-creme foi obtida pelo método de emulsificação a frio, na qual uma solução com conservante e a quantidade total de água da formulação foram vertidas sobre os outros componentes sob agitação mecânica (IKA RW 20 digital) à 600 rpm durante 30 minutos. A formulação gel foi obtida através da solubilização dos componentes hidrofílicos na quantidade total de água da respectiva formulação com agitação da fase aquosa em uma chapa aquecedora até 70 °C. Após atingir essa temperatura, houve a pulverização e dispersão do polímero gelificante, e em seguida a formulação foi submetida a agitação mecânica por 30 minutos à 300 rpm no banho-maria com circulação (modelo SOLAB SL-155). O AF 0,5% (p/p) foi incorporado às formulações. As mesmas foram deixadas em repouso por 24 horas antes de serem direcionadas para testes subsequentes. Foram manipulados três lotes de cada formulação para em seguida serem submetidas a testes de estabilidade preliminar e acelerada

para verificar parâmetros como características organolépticas, pH, viscosidade, atividade antioxidante e assim definir ou não o prosseguimento das mesmas para ensaios de liberação *in vitro*.

4.2.3 Ensaio de estabilidade preliminar

Amostras das formulações semissólidas foram acondicionadas em potes hermeticamente fechados com *head space* para possíveis trocas gasosas (ANVISA, 2004). As formulações foram analisadas 24 horas após sua manipulação (t_0), sendo inicialmente submetidas à centrifugação (ExcelsaTM II Centrifuge, mod. 206 BL, Brasil) a 3.000 rpm durante 30 minutos. As amostras que apresentassem qualquer sinal de instabilidade seriam excluídas dos testes posteriores de estabilidade por necessidade de reformulação (ANVISA, 2004).

Em seguida, as amostras foram submetidas ao estresse térmico em estufa (Odontobrás ECB 1.1 digital, Brasil) a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Em paralelo, foram submetidas a 6 ciclos alternados de 24 horas de resfriamento em refrigerador (Consul, mod. CRB36ABBNA, Brasil) a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 24 h de aquecimento em estufa (Odontobrás ECB 1.1 digital, Brasil) a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ANVISA, 2004; FERRARI, 1998). Posteriormente, foram avaliadas quanto as características macroscópicas (cor, odor e aparência do produto), pH, viscosidade e atividade antioxidante.

4.2.3.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

O valor de pH foi determinado pelo método potenciométrico inserindo o eletrodo (Hanna Instruments, mod. HI 21) diretamente nas amostras diluídas com água destilada na proporção de 1:10 (p/p), em triplicata (FERRARI, 1998; PIANOVSKI et al., 2008).

4.2.3.2 Análise da viscosidade

A viscosidade mínima aparente foi determinada em reômetro (Brookfield-modelo RV-III, EUA) tipo cone e placa, operando o Software Rheocalc versão V3.01. Todas as análises foram realizadas utilizando-se 0,3 g de cada amostra utilizando o *spindle* CP 52 à temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Para o gel a análise foi conduzida sob velocidade

de rotação de 1-10 rpm, já para o gel creme procedeu-se de 25-50 rpm. As leituras foram realizadas em triplicata para cada lote.

4.2.3.3 Atividade antioxidante das formulações

A atividade antioxidante foi determinada pelo método espectrofotométrico por redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), adaptado de Dutra; Leite; Barbosa, 2008. As formulações contendo AF 0,5% (p/p) foram diluídas em solução de propilenoglicol e água 1:1 (v/v) em concentrações de 10 a 250 µg/mL. As formulações sem AF (veículo) foram diluídas nas mesmas concentrações. Para este ensaio, adicionou-se uma alíquota (1,0 mL) de cada diluição em 3,0 mL de solução etanólica de DPPH• (60 µM). As soluções reagiram durante 15 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis (SP-1105, SPECTRUM) a 517 nm. O controle foi preparado com 3,0 mL de solução etanólica de DPPH• e 1,0 mL de amostra sem AF (veículo). Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como percentual de redução de DPPH• (% de redução) calculado de acordo com a equação abaixo, onde A_0 e A são os valores de absorbância do controle e da amostra, respectivamente:

$$\% \text{ redução} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

4.2.4 Ensaio de estabilidade acelerada

Após a realização do estudo de estabilidade preliminar, procedeu-se com os testes correspondentes à estabilidade acelerada. As amostras foram acondicionadas em estufa a $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (Odontobrás ECB 1.1 digital, Brasil), refrigerador a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (Consul, mod. CRB36ABBNA, Brasil) e em temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 90 dias (ANVISA, 2004; FERRARI, 1998). Nos períodos de tempo 30 (t_{30}), 60 (t_{60}) e 90 (t_{90}) dias avaliaram-se as características macroscópicas, pH, viscosidade e atividade antioxidante conforme descrito nas seções 4.2.3.1, 4.2.3.2 e 4.2.3.3, respectivamente.

4.2.5 Avaliação do AF por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência (CLUEDAD)

Foi realizada a avaliação do teor do AF em cada condição de temperatura que as amostras foram submetidas ao final do teste de estabilidade acelerada (t_{90}). O método cromatográfico desenvolvido e validado por Ferreira, 2018 foi executado em cromatógrafo Shimadzu[®] equipado com duas bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20-AHT, forno para coluna CTO-20A, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com software LC Solution[®], utilizando-se coluna cromatográfica Zorbax eclipse plus[®] C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 μ m). A fase móvel utilizada constituía-se de uma mistura de acetonitrila PA (ACN): água acidificada com ácido acético a 2% (12:88 v/v), no modo isocrático. As análises foram realizadas em temperatura do forno a 30 °C, com fluxo da fase móvel a 0,25 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 1 μ L. Foram preparadas soluções de trabalho para o padrão do AF, amostras das formulações e vanilina, esta última foi preparada com o intuito de identificar possíveis produtos de degradação. Todas as soluções supracitadas foram preparadas em água deionizada e ACN (50:50 v/v) a 100 μ g/mL em triplicata e filtradas em filtro de membrana de 0,45 μ m (Millipore[®]).

4.2.6 Estudo de liberação *in vitro*

O teste de liberação foi realizado em células de difusão de Franz, com área de difusão de 1,77 cm² e capacidade de 12 mL do compartimento receptor. As células de Franz foram preparadas inserindo a membrana entre os compartimentos doador e receptor. Em seguida, foram adicionados 0,3 g da formulação com 0,5% (p/p) do AF no compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com 12 mL de solução de PBS + 2,5% de Tween 80 pH 7,4. O fluido receptor foi mantido a 32 \pm 1 ° C sob agitação constante a 300 rpm. Alíquotas de 1ml foram removidas em intervalos de tempo 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas. Após a retirada de cada amostra, a mesma quantidade foi repostada no compartimento receptor para manter a condição *sink*. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em valores médios \pm desvio padrão (DP) para a membrana sintética e a membrana otimizada. A quantidade do AF no meio coletado foi determinada por CLUE, conforme descrito na seção 4.2.5.

A quantidade cumulativa do AF por superfície ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foi calculada e plotada em função do tempo. O percentual de fármaco liberado foi calculado pela equação 3 (POPA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2016):

$$\% \text{ Liberação do fármaco} = \frac{Rt}{L} \times 100 \quad (3)$$

onde RT é a quantidade cumulativa do AF liberado no tempo t e L a quantidade inicial do AF na formulação.

4.2.6.1 Modelos cinéticos de liberação

Para avaliar o modelo cinético de liberação mais adequado, os dados foram analisados em modelos de ordem zero ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo), primeira ordem ($\log \mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo) e Higuchi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus raiz quadrada do tempo). O modelo cinético mais adequado foi selecionado com base no valor de R^2 mais próximo do valor de 1 obtido por regressão linear.

A partir do modelo cinético selecionado, o fluxo do AF através das membranas (J) foi calculado por regressão linear e correspondeu à inclinação na porção linear dos pontos experimentais onde o equilíbrio de difusão já seria alcançado, obtendo-se assim o fluxo no estado estacionário (PREMARATHNE; KARUNARATNE; PERERA, 2016). O *lag time* corresponde ao intercepto obtido quando a linha do estado estacionário é estendida ao eixo do tempo, sendo definido como o tempo necessário substância atingir o equilíbrio e atravessar a membrana (CAVALCANTI et al., 2016).

O coeficiente de permeabilidade (P) foi calculado dividindo-se o fluxo (J) pela quantidade inicial do fármaco no veículo de acordo com a Equação 4 (DI CAGNO; BIBI; BAUER-BRANDL, 2015):

$$P = \frac{J}{C_0} \quad (4)$$

Onde P é o coeficiente de permeabilidade, J é o fluxo em estado estacionário e C_0 é a concentração inicial do ativo na formulação.

4.2.7 Obtenção dos sistemas multicomponentes com AF

Para a seleção adequada dos candidatos (CDs e polímeros) para compor os sistemas multicomponentes com o AF procedeu-se conforme a etapas que serão descritas a seguir.

4.2.7.1 Misturas binárias

As misturas do AF com diferentes CDs (β -CD, M- β -CD e HP- β -CD) foram obtidas em razão molar (1:1), enquanto as misturas do AF com os polímeros (PEG 6000, PVP K30, HPMC, Soluplus[®], Kollidon[®]) foram obtidas por relação peso:peso (1:1). Cada componente foi pulverizado separadamente e, posteriormente, a mistura de pós foi obtida utilizando gral e pistilo até que uma mistura homogênea fosse obtida.

4.2.7.2 Análise térmica

As curvas DSC foram obtidas em um modelo de calorímetro Shimadzu[®] DSC-50. A realização da análise foi procedida de acordo com o descrito na seção 4.2.1.3.1

As curvas termogravimétricas (TG) dos componentes isolados e misturas binárias foram obtidas em um modelo de termobalança Shimadzu[®] DTG-60H. Foi pesado aproximadamente 5,0 mg das amostras em um cadinho de alumina, sob atmosfera de nitrogênio, fluxo de gás de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento a 10 °C.min⁻¹ e temperatura final de 900 °C. As curvas obtidas foram analisadas no software *TA analyses* (TA Instruments, New Castle, DE, USA) (SILVA JÚNIOR et al., 2019).

4.2.7.3 Difração de raios-X (DR-X)

As caracterizações do perfil cristalino dos componentes isolados e misturas físicas foram obtidos utilizando-se difratômetro Bruker D2 Phaser (Bruker, Billerica, MA, EUA), equipado com um detector Lynxeye e operando com filtro de níquel em tubo de cobre e radiação CuK α 1 ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), a velocidade de 0,02°, com medição na faixa angular de 3 a 70° e tensão de 30 kV e intensidade de corrente de 10 mA (MOREIRA et al., 2018; FERREIRA, et al., 2018).

4.2.7.4 Espectroscopia infravermelha transformada de Fourier (FTIR)

Os componentes isolados e as misturas binárias foram submetidos à espectrofotometria infravermelha empregando um espectrômetro modelo IR Prestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com um acessório de *Attenuated Total Reflectance* (ATR). As amostras foram analisadas na região de 700 a 4000 cm^{-1} com 20 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Os espectros foram analisados por meio de um algoritmo *ad hoc* que correlaciona o espectro teórico das amostras e o espectro experimental com base na correlação de Pearson (LIMA et al., 2015). De maneira que, os espectros são normalizados e comparados primeiro como um todo e, em seguida, cada parte do espectro. Os valores das correlações para cada seção são atribuídos a um vetor com o mesmo comprimento de onda da região que está sendo comparada. Esta abordagem pressupõe que uma mistura simples é uma sobreposição dos espectros obtidos para as substâncias puras. Quando o espectro teórico e o espectro experimental divergem, é possível dizer que os átomos das moléculas estão diferentemente dispostos dentro da mistura (SILVA, et al., 2016).

Diante disto, valores de correlação entre 0,80 e 1,00 indicam simples mistura de sólidos. Correlações entre 0,5 e 0,80, indicam possíveis interações. Valores abaixo de 0,50 indicam baixa semelhança entre espectros, demonstrando algum tipo de interação química.

4.2.7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises foram realizadas conforme descrito na seção 4.2.1.3.3 utilizando como amostras os componentes isolados e as misturas binárias

4.2.7.6 Determinação da energia de interação

Este teste foi realizado para avaliação da energia de interação entre o AF e as CDs candidatas a participar da composição do sistema multicomponente, de forma a prever e auxiliar na escolha da CD para continuidade dos ensaios. Assim, os modelos moleculares foram construídos com o ligante frente a três diferentes CDs (β -CD, M- β -CD e HP- β -CD). Sendo propostas duas diferentes entradas para o ligante: a primeira pela face mais estreita da CD e a outra pela face mais larga, usando o software UCSF-Chimera (DE ALMEIDA et al., 2020; PETERSEN et al., 2004). As topologias necessárias para a realização da dinâmica

molecular do ligante e das CDs foram obtidas no *Automated Topology Builder* (ATB; versão 2.2) e Repositório (MALDE et al., 2011).

A dinâmica molecular foi realizada em pH 7,4 com solvente TIP3P no *software* GROMACS após minimização de energia dos complexos de inclusão. Os sistemas foram mantidos sob pressão constante e temperatura de 300 K (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995). Durante as simulações considerou-se o campo de força GROMOS 53A6 (OOSTENBRINK et al., 2004). As médias de energia foram obtidas para um trecho de 50 ns de simulação. Também foram realizadas simulações semelhantes do AF na ausência da CD, a fim de avaliar suas interações com o solvente. Os valores das interações hidrofóbicas de Lennard-Jones e eletrostáticas de Coulomb foram utilizadas como parâmetros para a predição de energia livre do sistema de acordo com a metodologia da Energia de Interação Linear (LIE) (GUTIÉRREZ-DE-TERÁN; AQVIST, 2012).

4.2.7.7 Diagrama de solubilidade com CD

O estudo de solubilidade de fases foi realizado de acordo com Higuchi e Connors (1965), utilizando a CD selecionada pelo modelo molecular descrito na seção 4.2.7.6. Pesou-se quantidades do AF em excesso (aproximadamente 15 mg) em frascos hermeticamente fechados (n=3) contendo 10 mL de solução aquosa com concentrações crescentes de CD: 1 mM – 5 mM. Paralelamente foram preparadas amostras do fármaco apenas em água.

As amostras foram agitadas em banho-maria termostático protegido da luz por 72 horas, à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Após alcançado o equilíbrio, as soluções foram filtradas e quantificadas por CLUE-DAD de acordo com a metodologia descrita na seção 4.2.5. O perfil do diagrama possibilitou avaliar a estequiometria dos complexos obtidos e o tipo de complexo (A ou B). Em seguida, a constante de complexação (K_c) do complexo entre AF e a CD foi calculada utilizando a Equação 1 descrita na seção 2.2.2.

4.2.7.8 Solubilidade do AF frente aos polímeros

Este ensaio foi conduzido com intuito de fornecer subsídios para uma escolha efetiva do melhor polímero para compor o sistema multicomponente junto ao AF e a CD seguindo metodologia descrita por Alves et al., 2014. Em frascos hermeticamente fechados foram adicionados excesso do AF em 20 mL de solução aquosa contendo os polímeros PVP K30, PEG 6000, Kollidon[®], Soluplus[®] e HPMC em concentrações crescentes (0,1%, 0,2%, 0,4%,

0,6%, 0,8% e 1,0%). Exceto para o HPMC que devido à solubilidade dificulta o preparo das soluções, neste caso, as concentrações testadas foram 0,1%, 0,2% e 0,4%. Paralelamente foram preparadas amostras do fármaco apenas em água. Esse estudo foi realizado em triplicata, onde as amostras foram agitadas e protegidas da luz por 72 horas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). As soluções foram filtradas e quantificadas por CLUE-DAD de acordo com a metodologia descrita na seção 4.2.5. Foram selecionados para ensaios subsequentes os polímeros que proporcionaram aumento significativo de solubilidade ao AF.

4.2.7.9 Efeito dos polímeros, em concentrações fixas da CD

O efeito do polímero na solubilidade do AF, na presença da CD, foi investigado variando-se as concentrações de polímero (0 a 1,0%) em soluções aquosas contendo concentrações fixas de CD (5 mM). O ensaio foi realizado em triplicata, onde as amostras foram agitadas e protegidas da luz por 72 horas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (LOFTSSON, et al., 1994; VIEIRA et al., 2015). Após este período as amostras foram filtradas e quantificadas por CLUE-DAD de acordo com a metodologia descrita na seção 4.2.5. Através dos resultados deste experimento, foi possível definir o melhor percentual de polímero frente à presença da CD para uso no complexo multicomponente.

4.2.7.10 Obtenção dos complexos multicomponentes

4.2.7.10.1 Método por malaxagem

O AF, CDs e polímeros selecionados nos ensaios anteriores foram pesados separadamente. O AF e a CD foram pesados em razão molar na proporção de 1:1, com posterior acréscimo do polímero (p/p), definido no experimento descrito no item 4.2.7.9, e homogeneizados com gral e pistilo, em seguida, foi adicionado à mistura de pós uma solução de etanol: água (50:50 v/v) até a formação de uma massa úmida, comparando-se ao aspecto de uma pasta. Esta preparação foi levada para a estufa por aproximadamente 24 h a $50 \pm 2^\circ\text{C}$. As amostras resultantes foram armazenadas em dessecador e mantidas ao abrigo da luz (FERREIRA et al., 2018).

4.2.7.10.2 Método por rotaevaporação

O AF, CDs e polímeros selecionados nos ensaios anteriores foram pesados separadamente. O AF e a CD foram pesados em razão molar na proporção de 1:1, com posterior acréscimo do polímero (p/p), definido no experimento descrito no item 4.2.7.9, e homogêneos com gral e pistilo. Em seguida, a mistura de pós foi dissolvida em 100 mL da solução etanol: água (50:50 v/v) seguindo para evaporação a vácuo a 45°C ±1°C usando rotaevaporador a 150 rpm até secagem completa. As amostras resultantes foram armazenadas em dessecador e mantidas ao abrigo da luz (FERREIRA et al., 2018).

4.2.7.10.3 Rendimento e análise quantitativa dos complexos multicomponentes

O rendimento dos complexos multicomponentes obtidos foi calculado por meio da razão entre a massa final após a preparação e a massa inicial do AF mais os componentes. O rendimento foi calculado de acordo com a equação 5:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa final (complexo)}}{\text{Massa inicial (AF+componentes)}} \times 100 \quad (5)$$

O teor do AF nos sistemas multicomponentes foi definido em triplicata pesando-se 5 mg do sistema multicomponente e logo em seguida dissolvendo-se a amostra em água deionizada e ACN (50:50 v/v) a 100 µg/mL, mediante sonicação durante 10 min. A partir disto, a solução foi diluída para 10 µg/mL e alíquotas de 1 mL foram conduzidas para análise em CLUE-DAD conforme descrito na seção 4.2.5. Calculou-se o teor do AF de acordo com a equação 6:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (6)$$

4.2.8 Caracterização físico-química dos complexos multicomponentes

A caracterização físico-química incluiu análises térmicas utilizando analisador térmico simultâneo STA 449F3 (Netzsch® GmbH & Co, Alemanha), onde aproximadamente 5,0 mg de cada amostra foi colocada em um cadinho de alumina sob atmosfera de nitrogênio e submetidas a fluxo de gás de 10 mL.min⁻¹, sob taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 25 a 900°C. A análise das curvas foi realizada utilizando-se o *software* Origin versão 8.0.

As análises de DR-X e FTIR foram procedidas de acordo com o descrito nas seções 4.2.7.3 e 4.2.7.4, respectivamente.

4.2.9 Avaliação da estabilidade oxidativa dos complexos de inclusão

De acordo com estudos realizados por Ferreira, 2018 e Nadal et al., 2015 foi constatada a instabilidade do AF frente a condições oxidativas. Diante disto, procedeu-se a avaliação da estabilidade dos complexos multicomponentes em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% nas mesmas condições testadas pelos referidos autores. Assim, foram preparadas soluções de trabalho com água deionizada (AF, CD, polímeros e complexos multicomponentes) a 100 $\mu\text{g/mL}$ em balões de 25 mL, diluindo-as posteriormente para 7 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O_2 a 3%. As amostras foram mantidas frente às condição oxidativa, ao abrigo da luz e temperatura ambiente (25°C), durante 24 h e em tempos pré-definidos foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-1800 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão) na faixa espectral de 200 a 400 nm.

4.2.10 Atividade antioxidante *in vitro*

AF, CD, polímeros e complexos multicomponentes foram diluídos em DMSO (P.A.). Preparou-se uma solução mãe com concentração de 1mg/mL para todas as amostras, a partir disto foram preparadas as diluições necessárias para os ensaios subsequentes.

4.2.10.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Nesse ensaio verifica-se a capacidade da amostra em doar elétrons para o molibdato (VI), formando o molibdato (V). Este, dar origem a um complexo denominado de fosfomolibdato, que por sua vez, quando em pH ácido, adquire uma coloração esverdeada. (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Portanto, quanto maior a capacidade doadora de elétrons, maior quantidade de molibdato (V) para a reação e maior a intensidade da coloração resultante.

Para realização do ensaio, em tubos de 1,5 mL contendo as amostras foram adicionadas uma solução reagente (28 mM de fosfato de sódio, 0,6 M de ácido sulfúrico, 4 mM de molibdato de amônia). A solução resultante foi mantida em estufa á 100°C por 90

min para reagir. Em seguida a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro à 695 nm (BioTek Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Utilizou-se ácido ascórbico como padrão para a atividade antioxidante, nas mesmas concentrações das amostras teste, e os resultados foram expressos como equivalente de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/ g de amostra).

4.2.10.2 Avaliação do poder redutor

Nesse teste verifica-se a capacidade da amostra em doar elétrons (em um ambiente relativamente neutro) para o ferrocianeto de potássio (Fe^{+3}), formando o ferrocianeto de potássio reduzido (Fe^{+2}). Na presença do cloreto de ferro, esta reação emite uma coloração azul de prússia (ATHUKORALA et al., 2006). Portanto, quanto maior a capacidade doadora de elétrons da amostra, maior será a quantidade de ferrocianeto de potássio (Fe^{+3}) a reagir com cloreto de ferro e assim, maior intensidade da coloração.

Para avaliar o poder redutor, 4 mL da solução contendo as amostras em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,25 e 1,0 mg/mL) foram adicionados ao tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e ferrocianeto de potássio (1%) e mantidos por 20 minutos a 50 °C. A esta reação foi adicionada ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Por fim, adicionou-se água destilada e cloreto de ferro III (0,1%). As absorvâncias das amostras foram mensuradas em espectrofotômetro à 700 nm (BioTek® Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA).

4.2.10.3 Capacidade quelante de ferro (Fe^{2+})

Neste teste o Fe^{2+} livre forma um complexo com a ferrozina, emitindo uma coloração rosa, a intensidade desta coloração é determinada por espectrofotômetro em 562 nm (BORG, 1993; WANG, et al., 2008). Então, quanto maior a capacidade quelante de Fe^{2+} , menos ele ficará disponível para reação de complexação, conseqüentemente menor intensidade da coloração.

Para avaliar a capacidade quelante de ferro, as amostras foram preparadas em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,25 e 1,0 mg/mL) e adicionadas a uma mistura constituída de cloreto de ferro II (0,05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 mL, 5 mM). Após agitação por alguns segundos, a mistura foi mantida a temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos para ocorrência das reações e posteriormente a absorvância das soluções foram medidas a 562

nm em espectrofotômetro (BioTek® Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Utilizou-se EDTA como padrão, nas mesmas concentrações das amostras teste, os resultados foram calculados de acordo com a equação 7.

$$\text{Quelação de Ferro (\%)} = \left[1 - \left(\frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs branco}} \right) \right] \times 100 \quad (7)$$

4.2.10.4 Capacidade quelante de cobre (Cu^{2+})

Nesse teste, o Cu^{2+} livre associa-se ao reagente violeta de pirocatecol, produzindo uma coloração violeta. Assim, quanto maior a capacidade da amostra em quelar íons Cu^{2+} , menor a quantidade de cobre livre para a reação com violeta de pirocatecol, menor intensidade da coloração (MEGÍAS et al., 2009).

Para avaliar a capacidade quelante de cobre, foram adicionadas amostras em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,25 e 1,0 mg/mL) ao violeta de pirocatecol (4 mM) e sulfato de cobre II pentahidratado (50 $\mu\text{g/mL}$), sendo a mistura homogeneizada após a adição de cada solução. A absorvância foi medida a 632 nm em espectrofotômetro (BioTek® Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Utilizou-se EDTA como padrão, nas mesmas concentrações das amostras teste e os resultados foram calculados de acordo com a equação 8.

$$\text{Quelação de Cobre (\%)} = \left[1 - \left(\frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs branco}} \right) \right] \times 100 \quad (8)$$

4.2.10.5 Capacidade de sequestro do radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$)

O potencial de sequestro do radical hidroxila pode ser simulado pelo método Cloreto Férrico/Peróxido de Diidrogênio ($\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$). O princípio do método é baseado na reação dos ($\text{OH}\bullet$) que reagem com o salicilato de sódio e EDTA, formando o intermediário ácidodiidroxibenzoico (DHBA), sendo capaz de emitir coloração rosada (SMIRNOFF; STEWART, 1985). Diante disto, quanto maior a capacidade das amostras teste em sequestro de $\text{OH}\bullet$, menos hidroxila disponível para reação, conseqüentemente menor intensidade da coloração.

Para a realização desse teste, o radical hidroxila foi gerado utilizando-se 3 mL de tampão de fosfato de sódio (150 mM, pH 7,4), que continha 10 mM de sulfato ferroso, 10 mM de EDTA, 2 mM de salicilato de sódio, 30% de H_2O_2 e diferentes concentrações das

amostras (0,05, 0,1, 0,25 e 1,0 mg/mL). O radical foi gerado devido à reação de Fenton (Fe^{2+} EDTA + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ EDTA + OH^- + $\text{OH}\cdot$). Para o controle foi utilizado tampão fosfato em substituição ao peróxido de hidrogênio. Após incubação a 37 °C, por 1 hora, as amostras foram mensuradas a 510 nm em espectrofotômetro (BioTek® Epoch microplate spectrophotometer, Winooski, EUA). Utilizou-se ácido gálico como padrão, nas mesmas concentrações das amostras teste. Os resultados foram calculados como percentual de inibição conforme descrito na equação 9.

$$\text{Seq. Rad. Hidroxila (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle} - \text{Abs branco})} \times 100 \quad (9)$$

4.2.11 Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Complementarmente, quando necessário utilizou-se teste de Tukey (RIBEIRO et al., 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização da membrana sintética otimizada

As membranas para estudo de liberação *in vitro* em células de Franz são geralmente sintéticas ou feitas de pele natural (humana ou animal). No entanto, as de origens naturais são difíceis de obter e envolvem alta variabilidade dos resultados entre as amostras mesmo dentro da mesma espécie, o que complica o desenho experimental, reduz a significância estatística e aumenta o número de repetições necessárias (BARBERO; FRASCH, 2009; CORTI et al., 2005; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; HAQ et al., 2018; QVIST et al., 2000; SIMON et al., 2016a). Para evitar o uso de membranas biológicas em estudos piloto, muitas vezes são utilizadas membranas sintéticas, entre as quais as compostas de acetato de celulose se destacam por serem simples, porosas e adequadas para avaliar o desempenho das formulações tópicas (SHIOW-FERN et al., 2010). Por outro lado, sua maior limitação está no

fato de serem incapazes de mimetizar as propriedades de barreira da pele humana (CHRISTENSEN et al., 2011; HAQ; et al., 2018; MONTENEGRO et al., 2006).

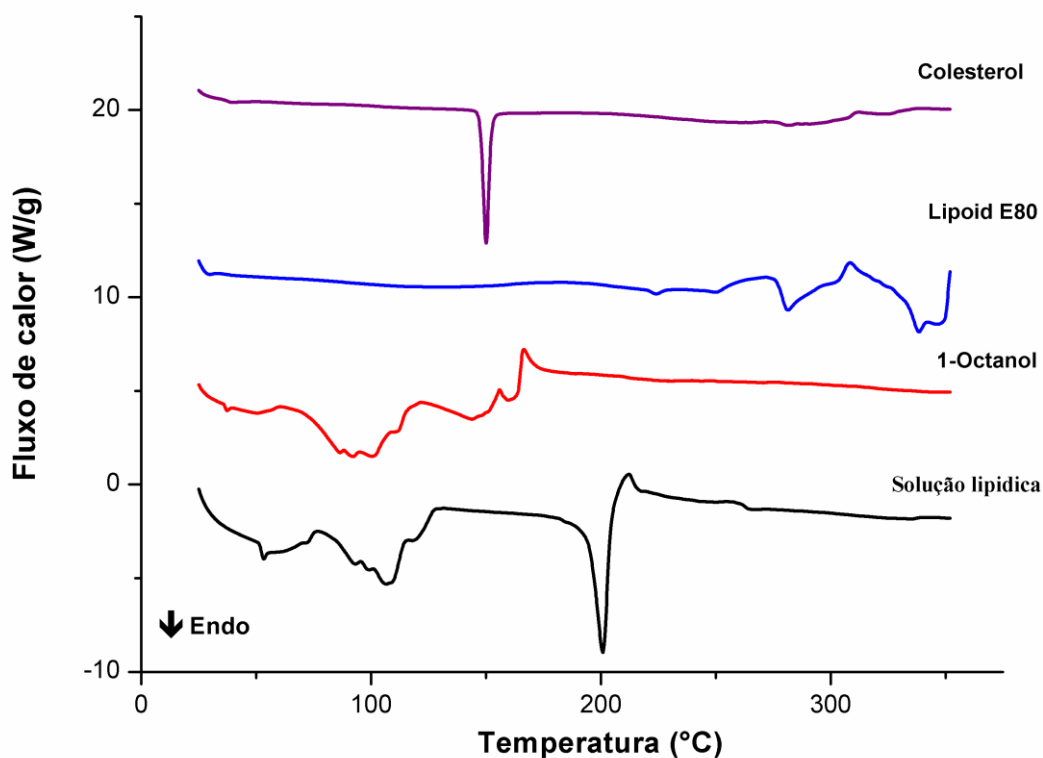
Apesar do poder preditivo das membranas teciduais, tem ocorrido um crescente interesse em sistemas alternativos que podem reduzir consideravelmente as etapas de preparação demoradas e dispendiosas (BERBEN et al., 2018). O uso de modelos biomiméticos é uma estratégia promissora que pode ser aplicada na avaliação de produtos farmacêuticos e cosméticos. Embora as drogas e cosméticos tenham perspectivas diferentes, a eficácia e a segurança de ambos dependem da taxa de liberação e da difusão do composto ativo na pele (ENGESLAND , 2013).

5.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

Inicialmente, foram realizadas análises calorimétricas na solução lipídica e seus constituintes para verificar o comportamento térmico da mistura (Figura 13). A curva DSC do colesterol demonstrou um pico endotérmico com *Tonset* de 148,93 °C ($\Delta H = 82,08 \text{ kJ.g}^{-1}$, *Tpeak* = 150,78 °C) atribuído ao seu evento de fusão, que corrobora com a faixa de temperatura descrita na literatura (147,5-150 °C) (JANGDE; SINGH, 2014; KARN et al., 2014; ZIDAN et al., 2010). A curva calorimétrica do Lipoid[®] E80, que consiste em 80% de fosfatidilcolina extraída do ovo, mostra uma série de picos endotérmicos a partir de 220,58 °C que podem estar relacionados à decomposição. De acordo com o estudo realizado por Cirri et al., 2009) a fosfatidilcolina exibe um evento endotérmico discreto a cerca de 85 °C, atribuível a fusão de sua porção cristalina. Entretanto, devido o Lipoid[®] E80 ser constituído por fosfatidilcolina em meio a vários outros constituintes (fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, traços de triglicerídeos, colesterol, gordura, vitaminas e água) não foi possível verificar esse evento (LI et al., 2014).

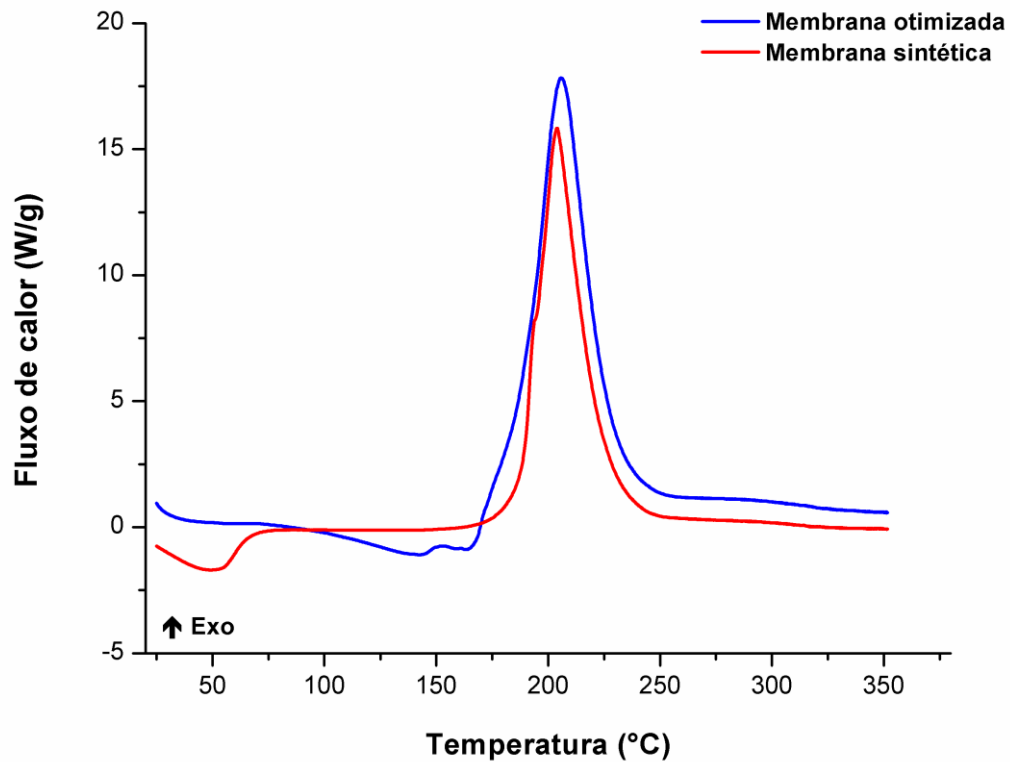
Na curva do 1-octanol foram observados eventos endotérmicos e exotérmicos entre a temperatura de 36,55 °C a 193,69 °C, e esses eventos podem estar relacionados à desidratação e ebulição da substância que ocorre em torno de 194 °C. Por fim, observa-se na curva DSC da solução lipídica a predominância inicial dos eventos característicos do 1-octanol, com retardamento dos eventos iniciais referidos ao componente isolado. Há também o surgimento de um evento endotérmico com *Tonset* de 195,22 °C ($\Delta H = 226,29 \text{ kJ.g}^{-1}$, *Tpeak* = 199,71 °C) devido à possível decomposição ou degradação dos compostos.

Figura 13. Curva DSC do colesterol, Lipoid® E80, 1-octanol e solução lipídica. Na razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.



A membrana utilizada no estudo era constituída por acetato de celulose (AC), um biopolímero de baixo custo produzido industrialmente pela acetilação da celulose, amplamente utilizada na produção de membranas sintéticas (CERQUEIRA; CARVALHO, 2010; MEIRELES et al., 2010). As curvas da membrana sintética e da membrana otimizada, com 24 horas após sua preparação, foram comparadas conforme demonstrado na Figura 14. Na membrana sintética, há perda inicialmente da água residual proveniente do processo de lavagem com tampão fosfato, caracterizando-se por um evento endotérmico com $T_{onset} = 31,08^{\circ}\text{C}$ e $T_{peak} = 49,19^{\circ}\text{C}$, seguido por um evento exotérmico com $T_{onset} = 188,80^{\circ}\text{C}$ e $T_{peak} = 203,99^{\circ}\text{C}$. Já na membrana otimizada houve o surgimento de dois eventos exotérmicos, o primeiro com $T_{onset} = 142,45^{\circ}\text{C}$ e $T_{peak} = 158,25^{\circ}\text{C}$, o segundo mais intenso apresentou-se com $T_{onset} = 182,62^{\circ}\text{C}$ e $T_{peak} = 203,08^{\circ}\text{C}$. Este evento exotérmico intenso observado para ambas as amostras é característico do acetato de celulose e atribuído à sua cristalização, que é notoriamente acompanhada pela liberação de calor latente. Resultados semelhantes foram descritos em estudos anteriores por Shaikh et al., 2009 e Cruz et al., 2011.

Figura 14. Curvas DSC da membrana sintética e otimizada na razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.



A Figura 15 reporta os perfis calorimétricos da membrana sintética e otimizadas 24 horas e 15 dias após sua obtenção. A membrana sintética apresentou entalpia inferior ($\Delta H = 61,66 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$) a otimizada ($\Delta H = 94,28 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$). Além disto, após 15 dias foi observado que a membrana otimizada apresentou redução considerável na entalpia para $1,24 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ (conforme detalhado na Tabela 7). Este fenômeno sugere que após 15 dias de impregnação, a interação da membrana sintética com os lipídios diminuiu ao longo do tempo. No entanto, os valores T_{peak} dos eventos característicos das membranas não apresentaram diferenças significativas entre elas ou em relação aos relatados na literatura. Esses resultados indicam uma diminuição da estabilidade da membrana otimizada ao longo do tempo, diante disto a mesma foi utilizada 24 horas após seu preparo nas análises subsequentes.

Figura 15. Curvas DSC da membrana sintética após 24 horas e da membrana otimizada após 24 horas e 15 dias. Razão de aquecimento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

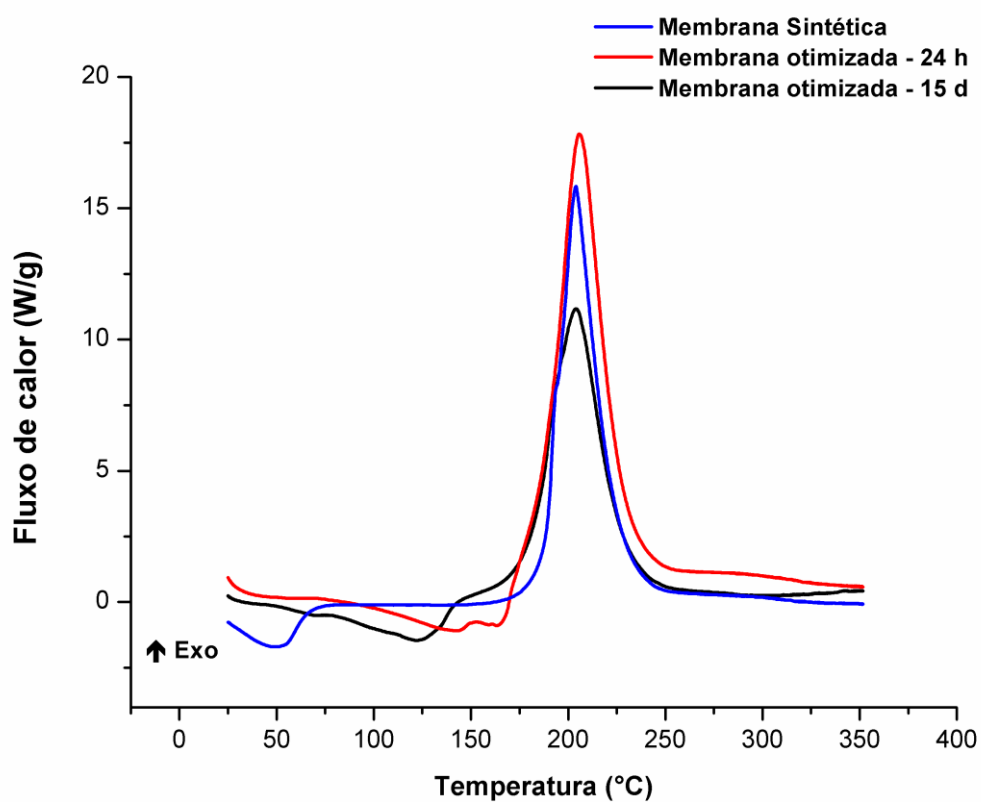


Tabela 7. Dados termoanalíticos da membrana sintética após 24h e da membrana otimizada após 24 horas e 15 dias.

	Membrana sintética	Membrana otimizada (24 h)	Membrana otimizada (15 d)
$T_{peak}/^{\circ}\text{C}$	203,99	203,08	203,71
$T_{onset}/^{\circ}\text{C}$	188,80	182,62	183,41
$T_{endset}/^{\circ}\text{C}$	222,96	222,93	225,96
$\Delta H/ \text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$	61,66	94,28	1,24

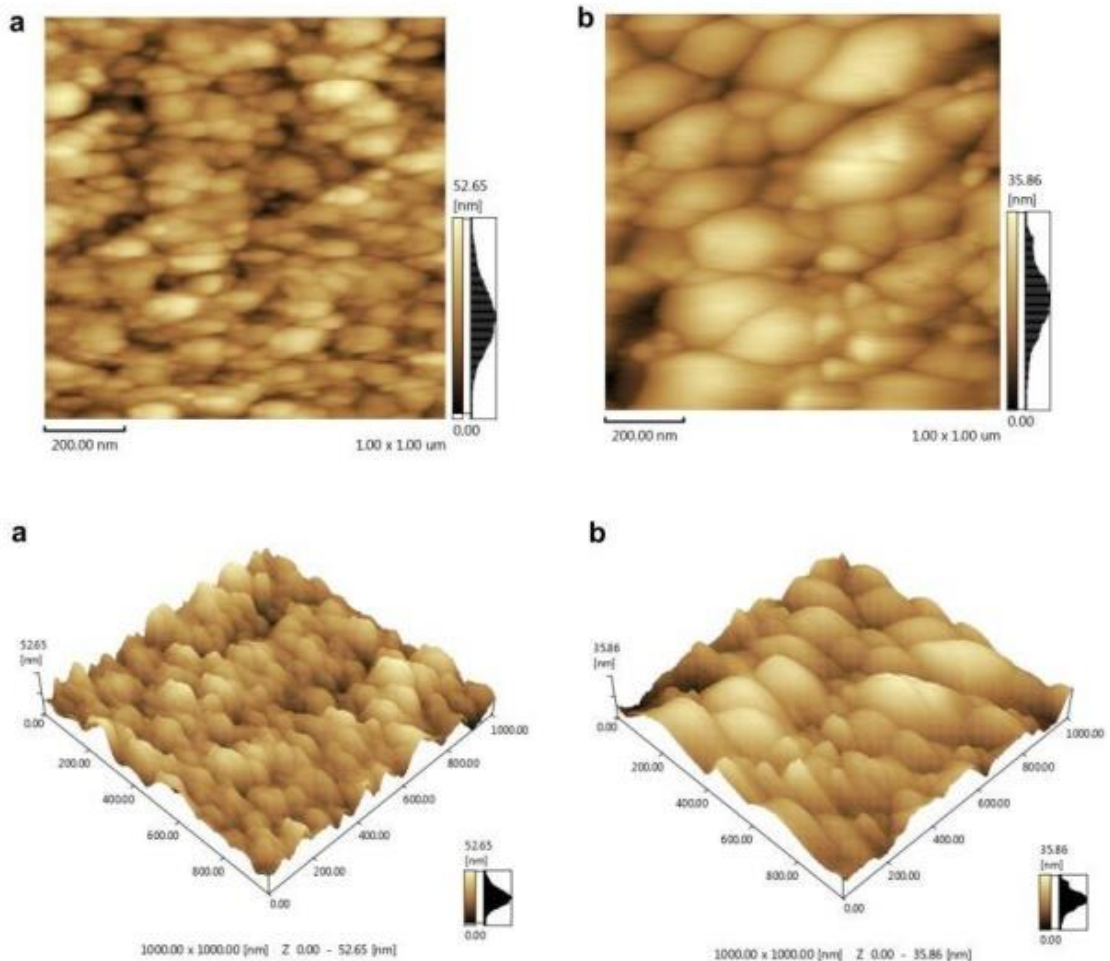
5.1.3 Microscopia de Força Atômica

Nas últimas décadas, a Microscopia da Força Atômica (MFA) tornou-se uma poderosa ferramenta para caracterizar a superfície das membranas poliméricas e para a obtenção de imagens 3D de alta resolução. Nas medições de MFA, a superfície das amostras analisadas é varrida por uma ponta piramidal fina para frente e para trás, seguindo linhas paralelas, permitindo assim medir uma interação local na região do campo próximo e registrar seu valor para cada posição amostral (REIS et al., 2013; SANTOS; CASTANHO, 2004).

Olejnik; Nowak, 2015 utilizaram a MFA para definir a estrutura e caracterizar diferentes membranas sintéticas utilizadas em testes de liberação, para entender seu comportamento, enquanto Johnson; Hilal, 2019 a usaram para avaliar a rugosidade das superfícies de várias membranas comerciais de filtração, a fim de verificar a impregnação de resíduos ao longo de seu uso. A rugosidade superficial é um fator primário para o comportamento da membrana, que pode ser definido pela distância entre picos e vales do objeto em estudo. Este parâmetro pode ser avaliado ao construirmos um mapa topográfico da superfície, onde é possível medir a rugosidade média (R_a) diretamente a partir do perfil de altura da superfície (JOHNSON; HILAL, 2016; WONG; KWON; CRIDDLE, 2009).

Comparando visualmente as imagens geradas para a membrana sintética e otimizada em duas e três dimensões (Figura 16), é possível observar uma diminuição na quantidade de relevos na topografia após a impregnação da membrana. Tal modificação estrutural pode ser atribuída à deposição dos componentes lipídicos que podem ter alterado o perfil topográfico da membrana otimizada. Como resultado, a membrana sintética apresentou um valor médio significativamente maior ($p < 0,05$) de R_a ($6,59 \pm 0,15$ nm) do que a membrana otimizada ($4,62 \pm 0,32$ nm). Indicando assim, que a impregnação ocorreu e que a mesma conferiu modificações relevantes na topografia da membrana.

Figura 16. Gráficos da Microscopia de Força Atômica em duas e três dimensões da (a) membrana sintética e (b) membrana otimizada.



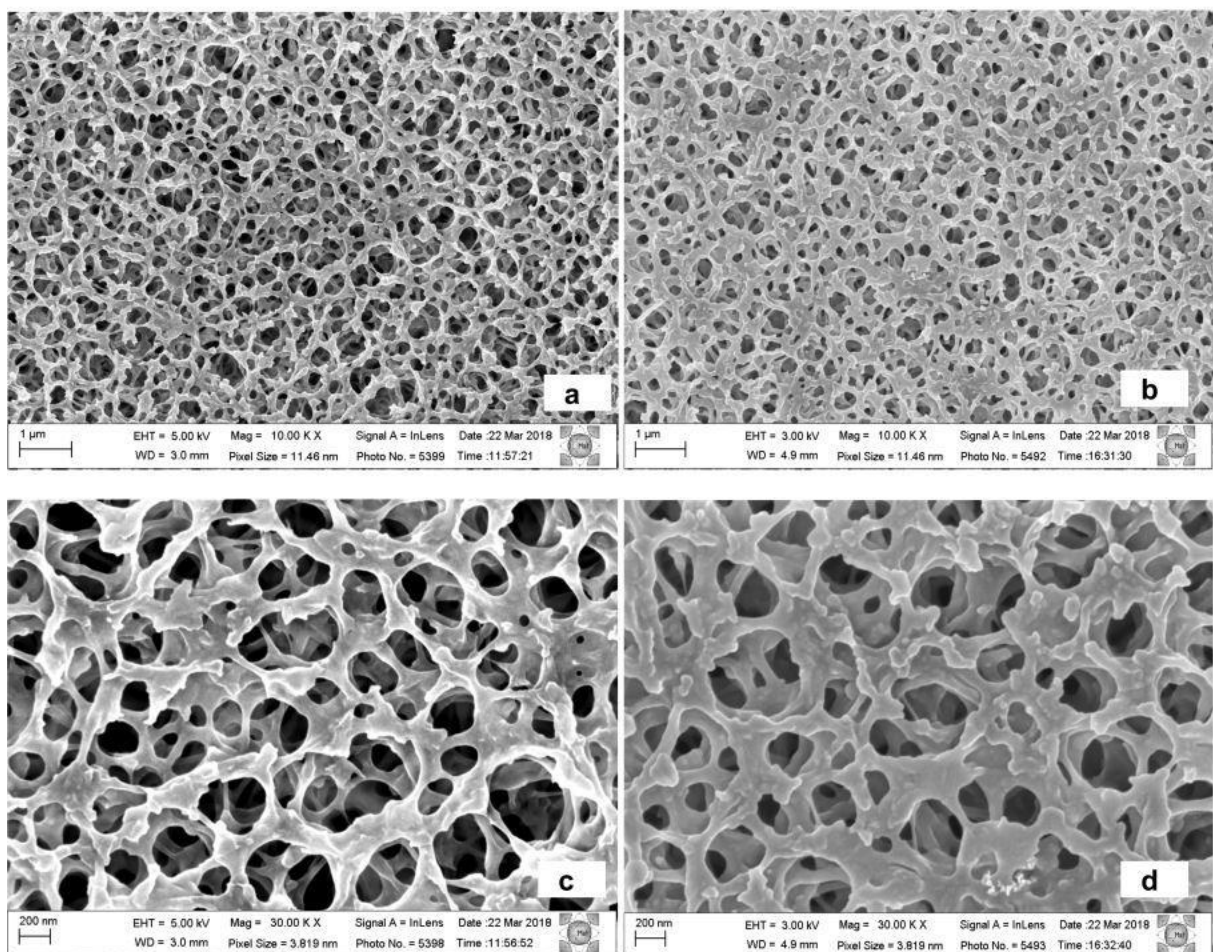
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Embora a MFA produza imagens de alta resolução, também utilizamos microscopia eletrônica de varredura (MEV) para obter uma visão ampla da membrana e do arranjo da malha polimérica, com o objetivo de corroborar as informações obtidas pela técnica anterior. O MEV é uma ferramenta comumente utilizada na caracterização morfológica das membranas, que, através da visualização profunda das camadas superiores e seções transversais, pode ajudar a confirmar a impregnação lipídica (KHULBE; MATSUURA; FENG, 2017). Uchida et al., 2015 fizeram uso dessa técnica para avaliar as características da

membrana Strat-MT™ (Merck Millipore, EUA) usada como membrana artificial semelhante à pele em estudos de permeação, comparando-a com pele humana e pele de rato sem pelos.

As fotomicrografias das seções transversais das membranas sintética e otimizada, na ampliação em 10.000 e 30.000 x (Figura 17) mostram que a membrana sintética possui uma malha polimérica significativamente mais fina do que a otimizada, confirmando assim a deposição da solução lipídica. Além da avaliação qualitativa, o tamanho dos poros foi medido em todo o quadrante antes e depois da impregnação. Como esperado, os poros da membrana sintética foram significativamente ($p < 0,05$) maiores ($0,15 \pm 0,018 \mu\text{m}$) do que os da membrana otimizada ($0,10 \pm 0,007 \mu\text{m}$). No entanto, apesar dessa diferença, ambas foram classificadas como membranas macroporosas, tendo poros maiores que 500 \AA (LIMA et al., 2016), o que significa que a impregnação não alterou a classificação da porosidade.

Figura 17. Fotomicrografias das seções transversais da (a) membrana sintética com ampliação de 10.000x (b) membrana otimizada com ampliação de 10.000x (c) membrana sintética com ampliação de 30.000x (d) Membrana otimizada com ampliação de 30.000x.



5.2 Estudos de estabilidade das formulações

5.2.1 Estabilidade preliminar das formulações

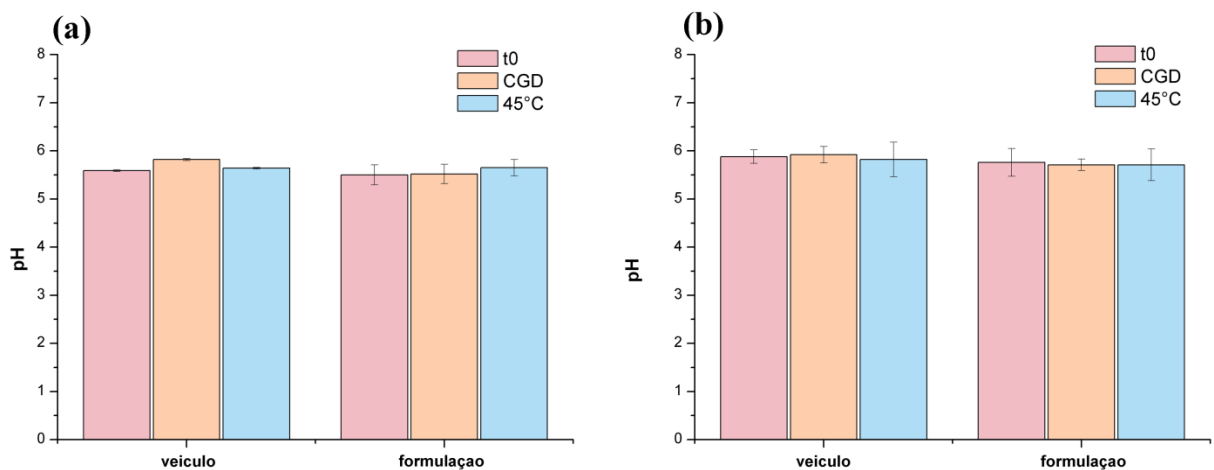
Após o ensaio de centrifugação, observou-se que tanto a formulação gel e gel creme se mantiveram estáveis quanto às características organolépticas, como coloração, odor e aspecto físico das formulações em estudo.

Quando submetidas ao estresse térmico (ET) e ciclo gela-degela (CGD), as formulações contendo o AF apresentaram sinais de degradação do ativo, sendo observadas variações de cor (amarelo a marrom) e odor (cravo/baunilha), quando comparadas com o tempo inicial (t_0) que apresentou coloração branca a levemente rosada e odor característico do veículo.

5.2.1.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

Nos estudos de estabilidade preliminar foi possível verificar que as duas formulações avaliadas nas condições de ET e CGD não tiveram nenhuma alteração significativa de pH ($p > 0,05$), que se manteve constante ao longo do ensaio como demonstrado na Tabela 8 e na Figuras 18. O mesmo comportamento do valor de pH foi observado nos veículos de cada formulação.

Figura 18. Valores de pH da formulação (a) gel e (b) gel-creme no estudo de estabilidade preliminar.



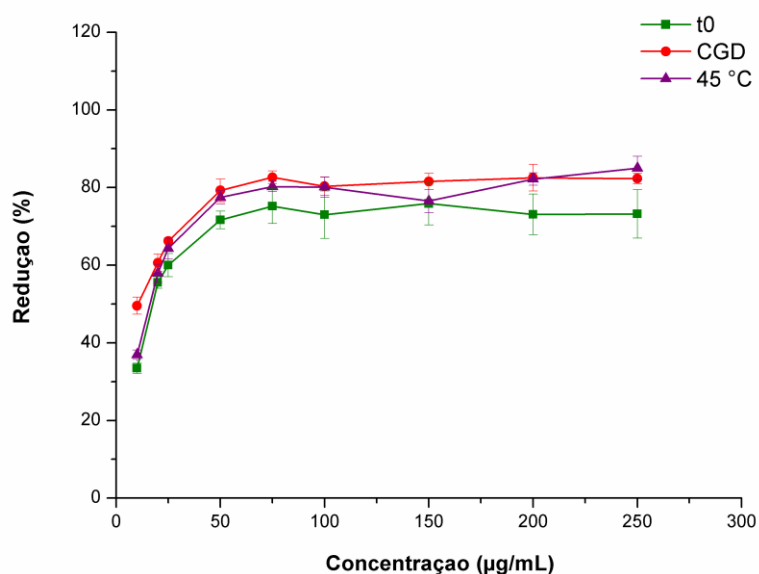
5.2.1.2 Análise da viscosidade

Para a formulação gel-creme observou-se que no t_0 a viscosidade aparente (cP) foi de $1057,69 \pm 43,49$, e após estresse térmico e ciclo gela-degela as viscosidades obtidas foram de $1077,53 \pm 25,89$ e $1043,51 \pm 21,07$, respectivamente, não havendo nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) nas duas condições testadas. Já na formulação gel, em t_0 , ET e CGD os valores da viscosidade aparente (cP) foram respectivamente $3362,34 \pm 37,46$, $3590,66 \pm 70,16$, $3482,59 \pm 175,46$, sendo observado um aumento significativo ($p < 0,05$) da viscosidade em ET e sem mudanças significativas ($p > 0,05$) após ciclo gela-degela.

5.2.1.3 Atividade antioxidante das formulações

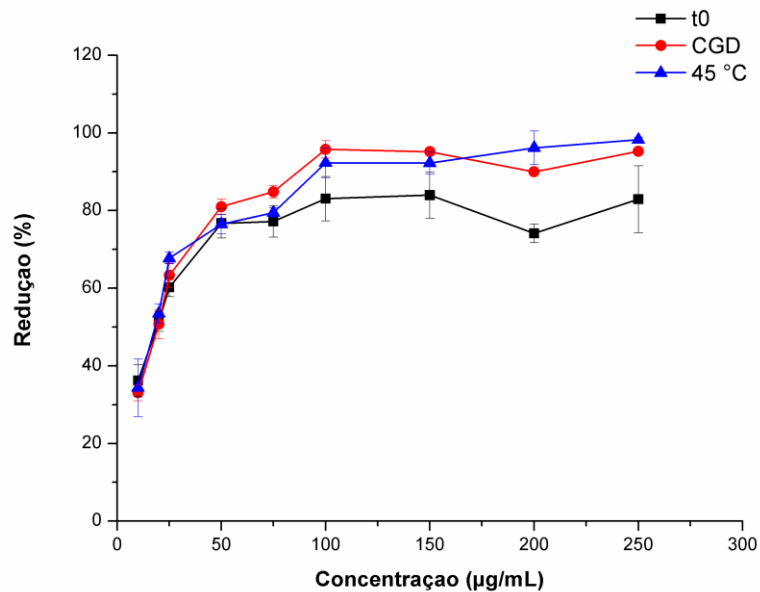
Na estabilidade preliminar observou-se que ambas formulações apresentaram potencial atividade antioxidante, por demonstrarem capacidade de redução do radical DPPH•, porém, constatou-se que após o ET e CGD a atividade antioxidante aumentou em relação ao t_0 . No t_0 a formulação gel-creme apresentou atividade de 73,24% na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Após o estresse térmico e ciclo gela-degela observou-se um percentual de redução de 84,97% e 82,32%, respectivamente, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19).

Figura 19. Atividade antioxidante da formulação gel-creme durante estudo de estabilidade preliminar.





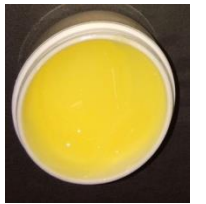






Na formulação gel (t_0) observou-se a redução de 82,94% na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Ao analisar as amostras submetidas ao ET e CGD, nesta mesma concentração, verificou-se redução do radical DPPH• de 98,27% e 95,26 %, respectivamente (Figura 20).

Figura 20. Atividade antioxidante da formulação gel durante estudo de estabilidade preliminar.



A Tabela 8 apresenta as características organolépticas, físicas e químicas das formulações submetidas ao estudo de estabilidade preliminar.

Tabela 8. Dados da estabilidade preliminar.

Formulação	Análises	Condição inicial (t ₀)	Estresse térmico (ET)	Ciclo gela-degela (CGD)
Gel-creme	Aspecto			
	Características organolépticas	Emulsão homogênea levemente rosa e odor da base	Emulsão homogênea de cor amarela e odor característico	Emulsão homogênea de cor amarela e odor característico
	pH	5,72 ± 0,29	5,57 ± 0,33	5,71 ± 0,12
	Viscosidade aparente (cP)	1057,69 ± 43,49	1077,53 ± 25,89	1043,51 ± 21,07
	Aspecto			
Gel	Características organolépticas	Gel homogêneo levemente rosa e odor da base	Gel homogêneo de cor amarela e odor característico	Gel homogêneo de cor amarela e odor característico
	pH	5,50 ± 0,21	5,65 ± 0,17	5,52 ± 0,20
	Viscosidade aparente (cP)	3362,34 ± 37,46	3590,66 ± 70,16	3482,59 ± 175,46
	Aspecto			

5.2.2 Estabilidade acelerada das formulações

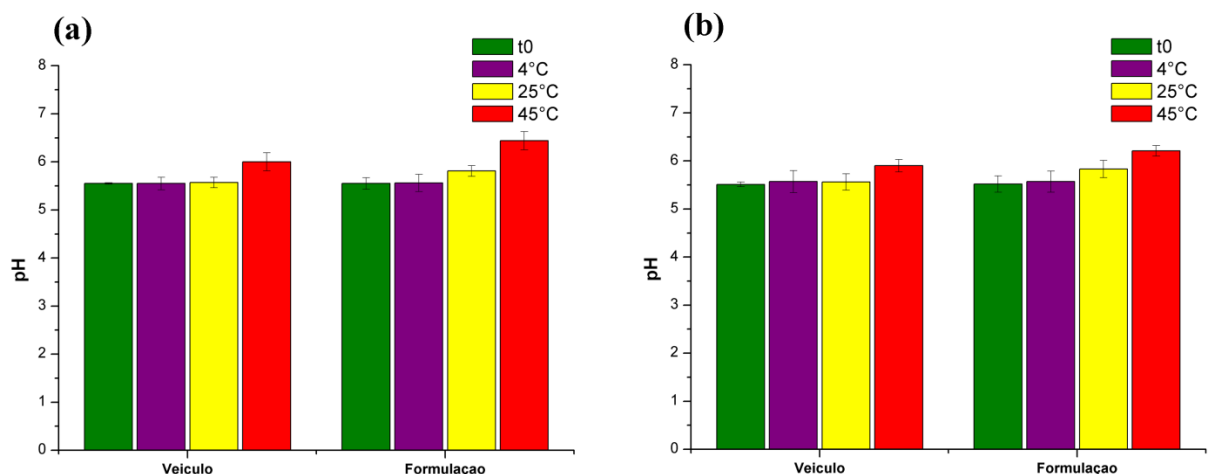
As formulações foram submetidas às condições de temperatura ambiente, refrigeração e estufa, durante o período de 90 dias. As formulações contendo o AF, ao final do teste, na condição de temperatura ambiente e estufa, apresentaram mudança de coloração variando-se do amarelo para tons de marrom e odor de cravo/baunilha quando comparado ao t₀ que apresentou cor levemente rosa e odor característico do veículo (Tabela 9). As formulações

contendo AF, em refrigerador, não sofreram alterações macroscópicas e organolépticas em relação ao tempo inicial (t_0).

5.2.2.1 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

Os valores de pH obtidos no início do teste de estabilidade acelerada (t_0) e ao final (t_{90}) podem ser observados na tabela 9. Em ambas as formulações foi possível observar que na condição de refrigeração não houve alteração significativa ($p > 0,05$) do valor de pH quando comparado ao t_0 , porém, em estufa e temperatura ambiente houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no valor de pH (Figura 21). Quando observado o comportamento dos veículos é possível constatar que houve alteração significativa somente na condição em estufa.

Figura 21. Valores de pH da formulação (a) gel e (b) gel-creme no estudo de estabilidade acelerada.



Uma vez que a pele apresenta pH entre 4,5 e 6,0, variando conforme as áreas do corpo ou idade, as formulações foram manipuladas na faixa de pH entre 5,5 e 6,0 para garantir compatibilidade, boa aplicabilidade na pele, atividade antioxidante e estabilidade do AF (ERDEMGIL et al., 2007; MONTI et al., 2011). Assim, a avaliação deste parâmetro nas formulações é de extrema importância, pois uma vez que alterações de pH ocorram, pode indicar instabilidade da formulação (CORRÊA et al., 2005; ISAAC et al., 2008). Segundo Gil, 2010 cada ativo, de acordo com suas propriedades físico-químicas, possui uma região de pH de máxima estabilidade na qual a velocidade de decomposição é mínima. Desta forma, é

importante que o pH mantenha-se na faixa do pH fisiológico e tenha o mínimo de variação em seu valor.

Pesquisas mostram que o AF é susceptível à degradação térmica e quando exposto à luz (GRAF, 1992; SCHOUBBEN et al., 2006; MONTI et al., 2011; XIE et al., 2015; SUN et al., 2018). Assim, pode-se sugerir que devido à degradação do AF nas condições de estufa e temperatura ambiente na estabilidade acelerada e, a formação de seus produtos, quando em conjunto levou a um aumento do valor de pH das formulações quando comparado com t_0 .

5.2.2.2 Análise da viscosidade

A formulação gel-creme não apresentou alteração ($p > 0,05$) da viscosidade em condições de temperatura ambiente, refrigerador e estufa (t_{90}) em relação ao t_0 , tanto para a formulação com AF quanto para o veículo. Na formulação gel (com AF e veículo) em refrigeração (t_{90}) não houve nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) na viscosidade das amostras testadas, mas nas condições em estufa e temperatura ambiente observou-se um aumento ($p < 0,05$) da viscosidade (t_{90}) em relação ao tempo inicial (t_0) (tabela 9).

A viscosidade pode ser definida como a capacidade de resistência que um produto oferece a deformação ou ao fluxo, sendo dependente das condições de temperatura e das características físico-químicas do mesmo (ANVISA, 2007; MANSO et al., 2015). A avaliação da viscosidade das formulações no estudo da estabilidade é útil, por monitorar indiretamente a degradação química e a estabilidade física do produto (MAISUTHISAKUL; HARNSILAWAT, 2011).

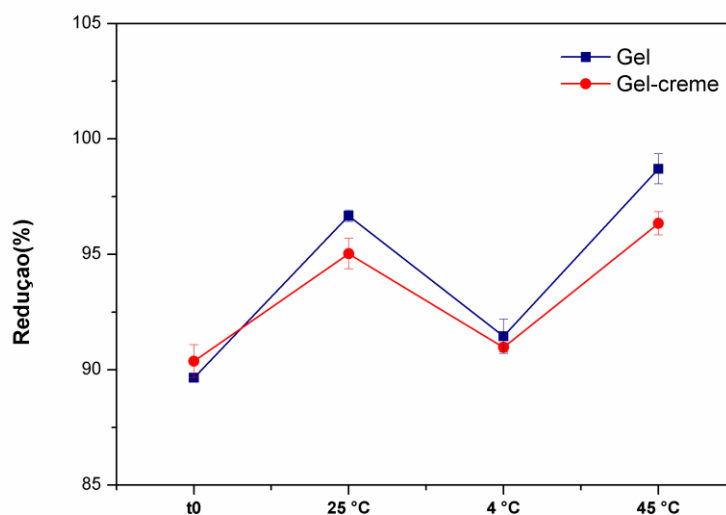
O estresse térmico pode alterar parâmetros como viscosidade, solubilidade, coalescência e hidratação de polímeros (LIPPACHER; MU, 2004). Na formulação gel observou-se um aumento da viscosidade aparente em temperaturas mais elevadas. Segundo Bonacucina; Martelli; Palmieri, 2004 a elasticidade do polímero pode diminuir à medida que a temperatura aumenta. Outro possível fator seria devido à perda de água em 45°C onde ocorre um enrijecimento das cadeias poliméricas contribuindo para que a formulação se torne mais viscosa (CORRÊA et al., 2005). O aumento da viscosidade também pode estar associado a neutralização, podendo ocorrer uma ionização dos grupos ácidos, reduzindo a ligação H^+ e provocando um aumento da repulsão eletrostática entre as cargas do polímero e as moléculas, que se tornam estendidas e rígidas e, assim, possivelmente aumentando a viscosidade do meio (BARRY; MEYER, 1979).

Emulsões do tipo O/A ou A/O são amplamente adotadas na indústria, na produção de cremes cosméticos e farmacêuticos (GABRIELE et al., 2009; LEAL-CALDERON; THIVILLIERS; SCHMITT, 2007; LUPI et al., 2011), podendo ser incorporados ativos hidrossolúveis e/ou lipossolúveis dependendo de suas características e dos efeitos desejados (ALLEN JUNIOR, 2004). Estudos de estabilidade com determinações dos parâmetros reológicos desses sistemas são indicados para caracterizar formulações em um curto período de tempo (MAMBRO; BORIN; FONSECA, 2003; TADROS et al., 2004). A formulação gel-creme não mostrou mudanças significativas ($p > 0,05$) na viscosidade nas condições avaliadas. Este resultado promissor atende às expectativas dos fabricantes de emulsões, que normalmente não devem sofrer mudanças na viscosidade e estabilidade.

5.2.2.3 Atividade antioxidante das formulações

A formulação gel-creme em 250 $\mu\text{g/mL}$ (t_0) apresentou redução de 90,37%. Nas condições em temperatura ambiente, refrigerador e estufa, observou-se um percentual de redução do radical DPPH• de 95,03%, 90,96% e 96,34%, respectivamente (Figura 22). Para formulação gel a atividade antioxidante inicial (t_0) foi de 89,65%, ao término do estudo de estabilidade (t_{90}), as amostras em 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução de 97,89%, 91,45% e 98,71% em temperatura ambiente, refrigerador e estufa, respectivamente (Figura 22). É importante ressaltar que sob refrigeração não houve alteração significativa ($p > 0,05$) da atividade antioxidante para ambas formulações.

Figura 22. Atividade antioxidante a 250 µg/mL das formulações gel e gel-creme no estudo de estabilidade acelerada após 90 dias.



A atividade antioxidante do AF foi determinada pelo percentual de redução do DPPH•, considerando os parâmetros da metodologia empregada (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SHARMA; BHAT, 2009). A escolha do método teve como base o fato do radical DPPH•, caracterizar-se como um radical orgânico livre e estável na ausência da luz, ser um método simples, rápido e de baixo custo (SCHERER; GODOY, 2009; DENG; CHENG; YANG, 2011). Muitos autores relataram o emprego dessa metodologia para determinação da atividade antioxidante de formulações cosméticas (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009; GASPARRINI et al., 2017; GONTIJO et al., 2018; MILANI et al., 2018; ZI et al., 2018).

Ambas as formulações, tanto nos ensaios de estabilidade preliminar como na estabilidade acelerada, demonstraram atividade antioxidante satisfatória, comportamento já esperado devido o AF ser um potente antioxidante isolado (SAIJA et al., 2000).









O AF possui uma instabilidade molecular e pode sofrer oxidação quando exposto a luz e oxigênio (MONTI et al., 2011). Assim, quando submetido às condições de temperatura ocorreu a degradação do AF e possivelmente a formação de dois compostos, o guaiacol e a vanilina (GRAF, 1992; BORTOLOMEAZZI et al., 2007; HO et al., 2009; TAI et al., 2011). Estas substâncias também apresentam atividade antioxidante, desta forma, podem atuar

sinergicamente e potencializar a atividade antioxidante total do AF, justificando o aumento da atividade das formulações após submetidas as condições de temperatura ambiente e estufa nos testes de estabilidade.

Outra influência na atividade antioxidante do AF é o pH do meio em que ele se encontra, onde a ionização do grupamento hidroxila (principal região de atividade antioxidante do AF) pode levar a perda de sítios de ataque para os EROs (MONTI et al., 2011). Logo, pH's levemente ácidos, na faixa de 5,0 a 6,5 é o mais satisfatório para as formulações contendo AF, pois o grupamento hidroxila encontra-se na forma não ionizada e, dessa forma, disponível para a neutralização das EROs (ERDEMGIL et al., 2007; MONTI et al., 2011). Portanto, mesmo com um aumento do pH não ocorreu diminuição da atividade antioxidante nas amostras, pois estas ainda continuaram dentro faixa de atividade do AF.

A Tabela 9 apresenta as características organolépticas, físicas e químicas das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 9. Dados da estabilidade acelerada.

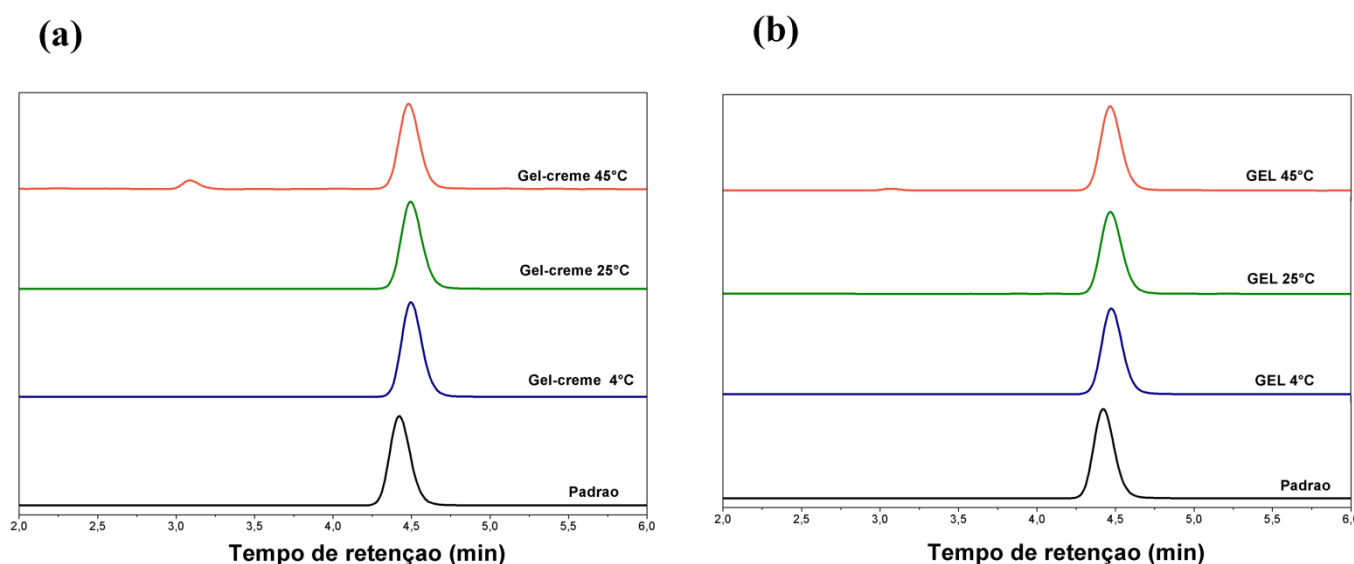
Formulações	Análises	Condição inicial (t ₀)	Ambiente (t ₉₀)	Refrigerador (t ₉₀)	Estufa (t ₉₀)
Cream-gel	Aspecto				
	Características Organolépticas	Emulsão homogênea com cor ligeiramente rosa e odor da base	Emulsão homogênea amarela com odor de cravo/baunilha	Emulsão homogênea com cor ligeiramente rosa e odor da base	Emulsão homogênea com cor marrom e odor de cravo/baunilha
	pH	5,56 ± 0,01	5,81 ± 0,05	5,56 ± 0,01	6,05 ± 0,06
	Viscosidade aparente (cP)	1370,72 ± 25,83	1328,79 ± 20,62	1385,77 ± 60,80	1415,32 ± 171,66
Gel	Aspecto				
	Características Organolépticas	Gel homogêneo com cor ligeiramente rosa e odor da base	Gel homogêneo amarelo com odor de cravo/baunilha	Gel homogêneo com cor ligeiramente rosa e odor da base	Gel homogêneo com cor amarela escura e odor forte de cravo/baunilha
	pH	5,51 ± 0,04	5,84 ± 0,04	5,57 ± 0,01	6,22 ± 0,11
	Viscosidade aparente (cP)	4033,84 ± 81,85	4626,91 ± 70,26	4494,76 ± 70,06	6662,52 ± 112,10

5.2.2.4 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE-DAD)

Os cromatogramas foram obtidos a partir do padrão (AF isolado) e as formulações foram submetidas às diferentes condições de temperatura durante 90 dias de estudo de estabilidade acelerada, utilizando os parâmetros cromatográficos descritos na seção 4.2.5. Uma vez que não houve alterações significativas nas características físico-químicas das formulações armazenadas sob refrigeração e utilizando-se a área de pico que caracteriza o AF como parâmetro inicial de estabilidade em relação a presença do ativo, tem-se que no gel-creme em temperatura ambiente, ocorreu uma redução de 13,20% do pico que caracteriza o AF (TR= 4,56 min). Já em estufa a 45°C houve uma redução do pico cromatográfico do AF (TR = 4,59 min) em 84,35% com o surgimento de um novo pico cromatográfico a 3,06 min (Figura 23).

Para o gel em temperatura ambiente ocorreu uma redução do pico que caracteriza o AF (TR = 4,59 min.) em 0,96%, já em estufa a redução do pico cromatográfico do AF (TR= 4,60) foi 35,82% com o surgimento de um discreto pico cromatográfico a 3,03 min (Figura 23).

Figura 23. Cromatogramas obtidos pelo CLUE-DAD para a formulação gel-creme (a) e gel (b) em diferentes condições de temperatura após 90 dias.



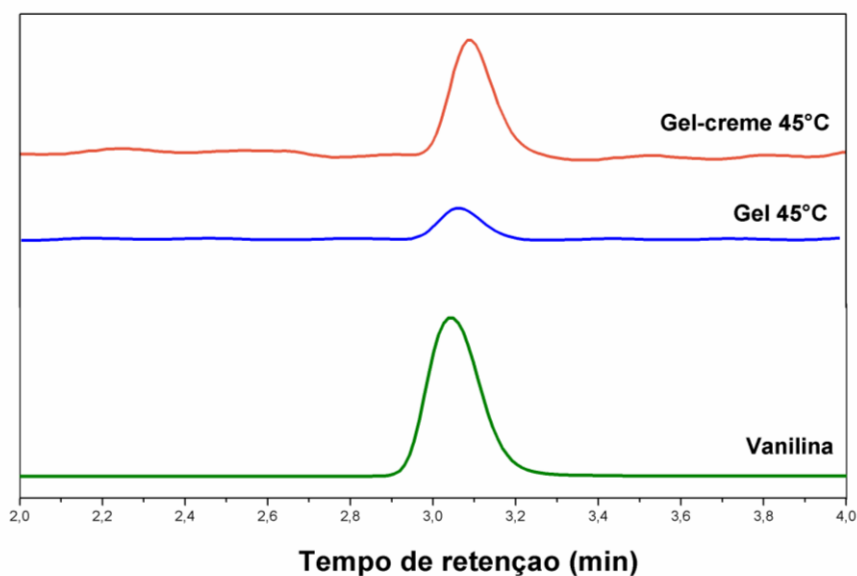
Estes picos cromatográficos que surgiram nos cromatogramas das formulações quando submetidas à estufa (t_{90}) podem ser indicativos de produtos de degradação já relatados

pela literatura, como derivados da vanilina ou guaiacol. Com o intuito de identificar estes derivados, a Figura 24 apresenta o pico cromatográfico do padrão de vanilina, convergindo com as características dos picos resultantes da degradação do AF encontrados nas amostras gel creme (TR = 3,06 min) e gel (TR= 3,03 min.), sendo indicativo, portanto da presença de vanilina nas formulações após 90 dias em estufa.

Estudos demonstram que o AF é susceptível a degradação térmica, a fotodegradação bem como fotoisomerização, formando seu derivado *cis*, representado por um óleo de forte coloração amarelada (GRAF, 1992; SCHOUBBEN et al., 2006; XIE; DAI, 2015; SUN et al., 2018). Quando em meio aquoso e temperaturas mais elevadas, pode sofrer o fenômeno de descarboxilação térmica, formando derivados do guaiacol e vanilina responsáveis pelo odor característico, possivelmente de cravo e baunilha, respectivamente (FIDDLER et al., 1967; HUA et al., 2007).

Técnicas analíticas combinadas, incluindo a metodologia CLUE-DAD, são usadas para obter dados de estabilidade química em formulações ao longo do tempo (SEMENZATO; BETTERO, 1997; RODE; STEINHART, 2002; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006) O método cromatográfico em CLUE-DAD auxiliou na identificação direta dos elementos presentes na amostra, sendo possível verificar que na formulação gel-creme houve uma presença mais acentuada de produtos de degradação do AF. A leitura do padrão de vanilina nas mesmas condições das amostras foi possível, uma vez que esta substância apresenta comprimento de onda próximo ao utilizado no método cromatográfico, entre 280 e 310 nm e também possui maior polaridade que o AF, com tendência a eluir primeiro no cromatograma nas condições cromatográficas utilizadas (GALANO; LEÓN-CARMONA; ALVAREZ-IDABOY, 2012). Estudos realizados relatam que a capacidade antioxidante da vanilina é muito baixa quando comparada a outros compostos fenólicos e demonstraram que a mesma possui pouca ou nenhuma atividade antioxidante em ensaio de varredura do radical DPPH• e, desta maneira, tendo baixa especificidade para o teste (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002; SHYAMALA et al., 2007; TAI et al., 2011). Sugere-se que a atividade antioxidante do gel-creme, foi menor quando comparado ao gel, devido a esta formulação possivelmente apresentar maior degradação do AF em vanilina.

Figura 24. Cromatogramas obtidos pelo CLUE-DAD para a elucidação do pico de degradação nas formulações de estufa após 90 dias.



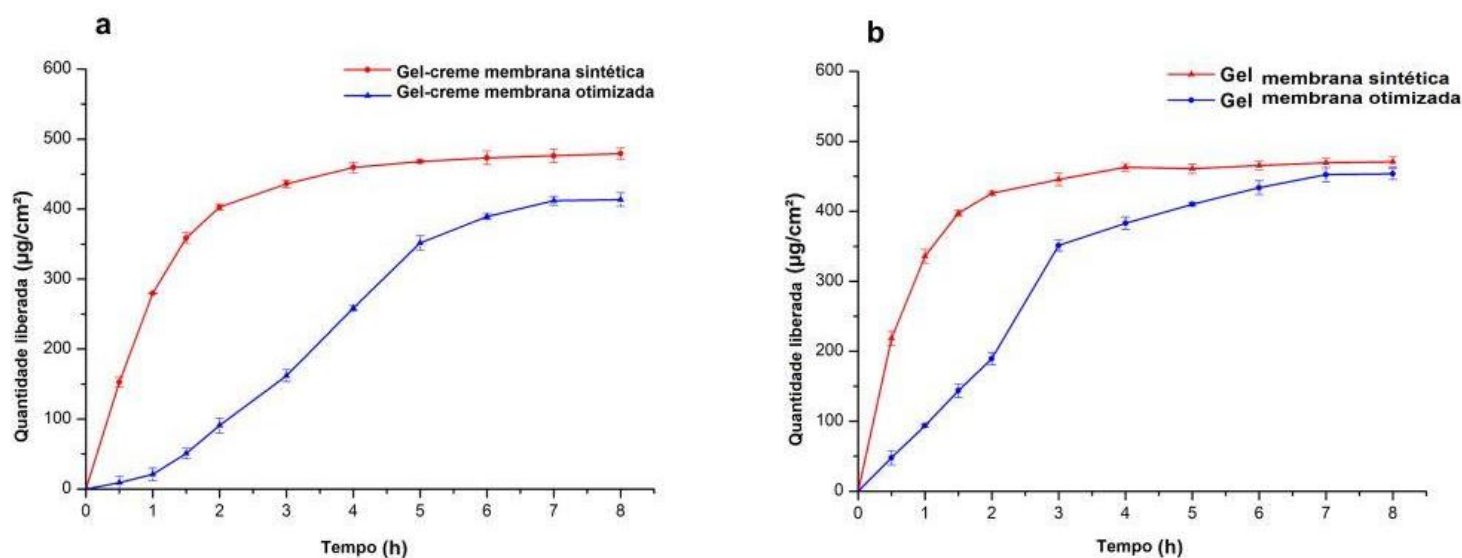
Nas condições experimentais avaliadas, verificou-se a capacidade antioxidante das formulações em estudo. Por outro lado, as mesmas apresentaram susceptibilidade à instabilidade frente à temperatura ambiente e estufa as quais foram submetidas nos ensaios de estabilidade preliminar e aceleradas, observando características não desejáveis a um produto, como alteração de cor e odor. Assim, é importante buscar alternativas para minimizar essas alterações inerentes ao AF, a fim de desenvolver produtos antioxidantes eficazes e seguros.

5.3 Testes de liberação *in vitro* e cinética de liberação do AF

Sabe-se que as propriedades físico-químicas do veículo em que um composto ativo é incorporado, bem como as do próprio composto tem influência direta no perfil de liberação das formulações tópicas. Portanto, foram realizados testes de liberação *in vitro* em células de difusão de Franz para determinar os parâmetros cinéticos da liberação do AF e verificar a possível interferência dos veículos e influência da membrana otimizada sobre ele.

Como esperado, a liberação do AF em ambas as formulações aumentou ao longo do tempo atingindo o equilíbrio após cerca de 6-8 horas, de acordo com a membrana. Em particular, na membrana sintética as formulações gel-creme e gel alcançaram quantidades máximas do AF liberadas de $479,28 \pm 37,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $470,74 \pm 23,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente, enquanto na membrana otimizada seus respectivos valores foram $413,59 \pm 32,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $453,54 \pm 33,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 25).

Figura 25. Perfis de liberação *in vitro* do AF a partir das formulações (a) gel-creme e (b) gel, em membrana sintética e membrana otimizada.



Os percentuais máximos do AF liberado das formulações gel-creme e gel ao final do experimento foram de $52,40 \pm 0,20\%$ e $52,36 \pm 0,15\%$, respectivamente, utilizando a membrana sintética, e de $46,04 \pm 0,34\%$ e $49,55 \pm 0,30\%$ utilizando a otimizada. Os testes realizados com a membrana sintética mostraram perfis quase coincidentes e, estatisticamente, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os percentuais finais de liberação das duas formulações. Por outro lado, utilizando a membrana otimizada, o percentual de liberação do AF da formulação gel foi estatisticamente maior quando comparada ao gel-creme ($p < 0,05$), além disto a liberação do AF quando veiculado em gel foi mais rápida.

A análise de regressão linear foi então realizada para selecionar o modelo cinético que melhor se enquadrasse no perfil de liberação do AF nos veículos utilizados. Para isso, foram testados três modelos cinéticos: os modelos de ordem zero ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo), Higuchi ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus raiz quadrada do tempo) e os modelos de primeira ordem ($\log \mu\text{g}/\text{cm}^2$ versus tempo). A Tabela 10 lista os coeficientes de correlação de regressões lineares obtidos utilizando o modelo mais adequado para cada condição.

Tabela 10. Coeficientes de determinação (R^2) de modelos cinéticos usados para se adequar ao perfil de liberação do AF

Membrana sintética			Membrana otimizada	
Formulação	R^2	Modelo	R^2	Modelo
Gel-creme	0,7698	Higuchi	0,9612	Zero ordem
Gel	0,8529	Higuchi	0,9390	Higuchi

O perfil cinético da liberação do AF para ambas as formulações testadas com a membrana sintética correlacionou-se idealmente ao modelo cinético de Higuchi. Por outro lado, usando a membrana otimizada, o gel-creme demonstrou cinética de ordem zero, enquanto o gel para Higuchi. Destaca-se que o modelo cinético Higuchi, que relaciona concentração à raiz quadrada do tempo, baseia-se no pressuposto de que a liberação de um composto ativo é controlada por difusão e, em seguida, depende de sua concentração disponível, ou seja, quanto maior a concentração, maior a quantidade de composto liberado. Além disso, implica que a concentração ativa na formulação é maior do que sua solubilidade na matriz (HIGUCHI, 1962; MILLUCCI et al., 2012; PREMARATHNE; KARUNARATNE; PERERA, 2016). Por outro lado, a cinética de ordem zero observada para a formulação gel-creme usando a membrana otimizada indica que o ativo foi liberado lentamente, independentemente de sua concentração (DJEKIC et al., 2012).

O fluxo no estado estacionário do AF entre as membranas (J), *lag time* (T_L) e o coeficiente de permeabilidade (P) foram determinados com base no modelo cinético definido para cada condição experimental conforme reportado na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos testes *in vitro* de liberação do AF

Parâmetros	Gel-creme		Gel	
	Membrana sintética	Membrana otimizada	Membrana sintética	Membrana otimizada
J ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	219,2	78,2*	357,9	224,4
T_L (min)	18,2	47,8	3,8	20,0
P ($\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)	0,14	0,05*	0,22	0,14

J = Flux of FA across the membranes at steady state; T_L = lag time; P = permeability coefficient. (*) Esta amostra apresentou cinética de ordem zero.

Formulações com características hidrofílicas intensificam a liberação de compostos fenólicos, devido à baixa afinidade da substância ativa para o veículo (CASAGRANDE et al., 2007; KITAGAWA et al., 2011; ZILLICH et al., 2013). Portanto, devido ao caráter hidrofóbico do AF ($\log P = 1,67$), a formulação predominantemente hidrofílica (gel) permitiu maior liberação e fluxo do ativo em menor tempo (ROLEIRA et al., 2010). O oposto ocorreu com a formulação gel-creme, que, devido à sua lipofílicidade e maior afinidade com o ativo, pode retê-lo, resultando em menos liberação e fluxo (SAIJA et al., 2000).

No estudo de liberação do AF utilizando a membrana otimizada em gel-creme, observou-se um aumento significativo no tempo necessário para alcançar o equilíbrio (T_L), bem como uma redução tanto no J quanto no P ($p < 0,05$). Esses resultados corroboram com a cinética de ordem zero definida para esta formulação na membrana otimizada, na qual houve uma liberação lenta possivelmente devido à afinidade do ingrediente ativo com os componentes lipofílicos da formulação. O AF foi liberado de forma mais eficaz a partir da formulação gel em comparação ao gel-creme devido à difusão mais rápida para o meio receptor, como demonstrado pelos parâmetros cinéticos. De forma que, a membrana otimizada causou maior resistência à difusão da AF, levando a diferentes perfis de liberação entre as duas formulações, ao contrário do observado no teste realizado com a membrana sintética.

Embora os sistemas de permeação sem células tenham sido inicialmente destinados a prever a permeação de medicamentos intestinais, sua utilidade na administração de drogas transdérmicas também foi demonstrada nos últimos anos (BERBEN et al., 2018). Há relatos de estudos semelhantes na literatura que propõem opções de membrana mais viáveis no que diz respeito a questões éticas e econômicas. Por exemplo, Haq et al., 2018 testaram em células de difusão de Franz a membrana Strat-M[®], com uma composição lipídica semelhante à

encontrada no estrato córneo humano e pele de cadáver humano. Testes com formulações contendo nicotina e intensificador de penetração química demonstraram o potencial desta membrana para ser usada como ferramenta de triagem para formulações tópicas ou transdérmicas. Neste estudo, o comportamento de liberação na membrana artificial Strat-M[®] mostrou uma correlação relativamente alta com a pele do cadáver humano ($0,90 \leq R^2 \leq 0,99$). Zhang et al., 2017, compararam pele de orelha de porco, pele de rato e Strat-M[®] com uma membrana de pele artificial à base de lipossomos (LASM) composta por camadas de lipossomos imobilizados em um filtro, concluíram que o LASM pode ser uma alternativa valiosa a pele de orelha de porco, mostrando uma alta correlação no teste com células de difusão de Franz. A fim de encontrar um sistema de distribuição transdérmico eficaz para a droga rivastigmina, Simon et al., 2016 realizaram um estudo de correlação *in vitro-in vivo* (IVIVC) para selecionar o melhor modelo de membrana usando várias membranas artificiais, incluindo Strat-M[®] e a pele da orelha de porco. A membrana Strat-M[®] mostrou um perfil de permeação semelhante ao da pele da orelha de porco ($R^2 = 0,92$), garantindo uma correlação linear melhor ($R^2 = 0,99$) do que as outras membranas sintéticas ($R^2 < 0,90$) no IVIVC, e foi a única membrana artificial que simulou adequadamente o desempenho da barreira cutânea.

Nos estudos supracitados, as membranas artificiais otimizadas mostraram alta correlação com membranas da pele animal e humana em estudos *in vitro* de liberação cutânea com a permeação da pele *in vivo*. Com base nesses resultados descritos na literatura sugere-se que a membrana utilizada no presente estudo pode ter um desempenho semelhante em estudos de correlação que serão desenvolvidos futuramente.

Os resultados deste trabalho apontam para o potencial da membrana otimizada em relação às características de difusão, o que a torna muito promissora em estudos preliminares de liberação *in vitro* utilizando células de difusão de Franz para formulações tópicas. O uso de membranas artificiais em métodos *in vitro* com potencial para imitar a pele e prever o desempenho do produto é um passo fundamental no desenvolvimento e triagem de novas formulações, que podem potencialmente reduzir custos, tempo e número de testes que requerem amostras humanas ou animais.

5.4 Obtenções dos sistemas multicomponentes com AF

Devido a sua instabilidade o AF, pode se decompor em produtos inativos induzidos pela luz e/ou oxidação e sua baixa solubilidade aquosa limitam seu uso em potencial (MONTI et al., 2011; MANCUSO; SANTANGELO, 2014). Esses problemas podem ser resolvidos empregando-se técnicas de complexação do AF com CDs, dispersão em polímeros hidrofílicos ou inclusão em CDs seguido da associação de um polímero formando um sistema multicomponente aumentando a estabilidade dos compostos sensíveis à luz, temperatura e oxidação. Na indústria farmacêutica, a formação desses complexos de inclusão proporciona melhor solubilidade aquosa, estabilidade química e absorção das substâncias (SETHIA, S.; SQUILLANTE, 2003; ANSEMI et al., 2006; JANSSENS et al., 2008; LI et al., 2011; LIMA et al., 2008; KURKOV; LOFTSSON, 2013).

Para avaliação das interações entre o AF, CDs e polímeros a nível físico-químico, utilizam-se algumas técnicas térmicas e não térmicas, conforme relatado na literatura. Pinheiro et al., 2017 avaliaram a interação entre óleo de copaíba e CDs, Da Silva Júnior et al., 2017 realizaram estudo com α , β -amirina e polímeros hidrofílicos, Quintans et al., 2017 e Moreira et al., 2018 caracterizaram complexos com CDs e dispersões sólidas com acetato de hecogenina. Esses autores utilizaram a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) para verificar o comportamento térmico e a estabilidade das amostras, difração de raios-X (DR-X) para determinar o perfil cristalográfico das amostras e suas alterações físicas, a espectrofotometria no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar as interações entre os componentes no nível químico, ajudando a confirmar a inserção das moléculas ativas à CD ou a dispersão destes na rede de polímeros, e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) que foi empregada para visualizar a forma das partículas.

Inicialmente estes ensaios térmicos e não térmicos foram utilizados nas misturas binárias entre o AF: CDs e AF: polímeros, para avaliação das interações entre os componentes. Este estudo permitiu que dados robustos fossem gerados para seleção dos componentes dos sistemas multicomponentes e planejamento de novas obtenções futuramente.

5.4.1 Caracterização térmica das matérias-primas

Para avaliar o comportamento térmico das misturas físicas entre o AF com CDs e polímeros, foram realizadas análises de DSC e TG.

A curva DSC do AF apresentou dois eventos endotérmicos (Figura 26a). O primeiro é referente a fusão do AF, com *Tonset* de 171,6 °C ($\Delta H = 131,4 \text{ J.g}^{-1}$, *Tpeak* = 173,4 °C). Tal atribuição está de acordo com a Farmacopéia japonesa que relata a faixa de fusão desta substância entre 173 e 176 °C. O segundo evento endotérmico apresentou *Tonset* de 186,3 °C ($\Delta H = 221,0 \text{ J.g}^{-1}$, *Tpeak* = 224,8 °C) e é atribuído à decomposição do AF. A análise das curvas termogravimétricas e derivadas revelou que a degradação do AF ocorreu em temperaturas entre 172,6 – 278,5 °C ($\Delta m = 89,6\%$), dois outros eventos de perda de massa ocorreram entre 280,3 – 378,6 °C ($\Delta m = 6,4\%$) e 379,9 – 625,5 °C ($\Delta m = 2,44\%$). Resultados semelhantes foram obtidos por Bezerra et al., 2017.

A β -ciclodextrina apresentou um pico endotérmico com *Tonset* = 68,4 °C ($\Delta H = 305,2 \text{ J.g}^{-1}$ e *Tpeak* = 97,7 °C) em relação à sua desidratação (Fig. 26b). Observou-se, na curva TG, perda de massa inicial entre 36,8 – 106,4 °C ($\Delta m = 13,2\%$) causada pela desidratação da amostra. Uma perda de massa mais significativa ocorreu logo após a faixa de temperatura entre 268,8 – 364,24 °C ($\Delta m = 71,2\%$) relacionada à degradação β -CD. O último evento de perda de massa ocorreu entre 365,8 – 534,0 °C ($\Delta m = 13,1\%$) devido à carbonização amostral. Resultados semelhantes foram descritos por Quintans-Júnior et al., 2016.

A curva DSC da hidroxipropil- β -ciclodextrina (Fig. 26c) mostrou um evento endotérmico relacionado à evaporação de água residual com *Tonset* = 38,6 °C ($\Delta H = 123,6 \text{ J.g}^{-1}$ e *Tpeak* = 76,27 °C). Na curva TG, observou-se perda de massa em 27,5 – 112,8 °C ($\Delta m = 10,1\%$) referente à desidratação da ciclodextrina. A decomposição da amostra iniciou começou em aproximadamente 273 °C, o que é corroborado pelo relatório de Marreto et al., 2008, com dois eventos de perda em massa em 272,8 – 390,5 °C ($\Delta m = 76,4\%$) e 394,2 – 542,3 °C ($\Delta m = 13,6\%$).

A curva DSC da metil- β -ciclodextrina (Fig. 26d) apresentou evento endotérmico com *Tonset* = 36,6 °C ($\Delta H = 70,4 \text{ J.g}^{-1}$ e *Tpeak* = 52,4 °C) inerente a desidratação, que foi confirmada na curva TG por uma perda de massa na mesma faixa de temperatura 34,6 – 81,2 °C ($\Delta m = 5,0\%$). Também foram observados dois eventos consecutivos de perda em massa, o primeiro em 280,0 – 372,1 °C ($\Delta m = 81,0\%$) e o segundo em 372,1 – 519,2 °C ($\Delta m = 14,16\%$). Os resultados do comportamento térmico da M- β -CD foram semelhantes aos descritos Chadha et al., 2014.

A curva DSC do PVP K30 apresentou um evento endotérmico (Fig. 26e) com $T_{onset} = 45,10 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 283,5 \text{ J.g}^{-1}$; $T_{peak} = 82,9 \text{ }^\circ\text{C}$) que ocorre simultaneamente à perda de massa inicial. As curvas TG/DTG apresentaram dois estágios distintos de perda de massa, o primeiro ocorreu entre $33,1 - 86,3^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 7,4 \%$) correspondente à desidratação da amostra devido ao seu caráter higroscópico (SILVA, P. C. D. et al., 2016). A segunda etapa ocorreu com temperaturas entre $367,3 - 476,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 81,3\%$) e está relacionado à degradação da substância e à formação de resíduos carbonáceos (DE PAULA; MANO, 2012).

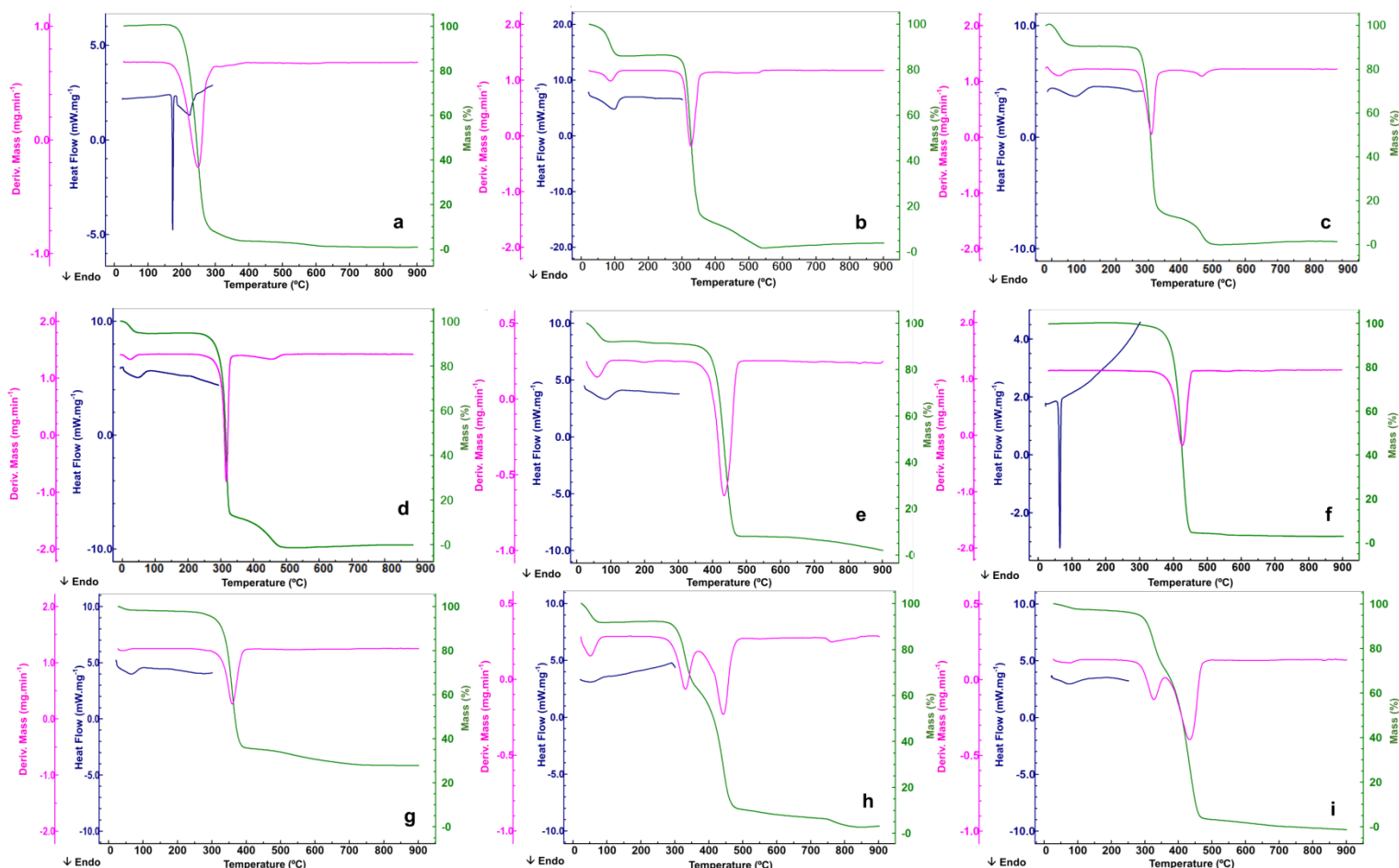
A curva DSC do PEG 6000 (Fig. 26f) apresentou um único evento endotérmico com $T_{onset} = 60,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 181,1 \text{ J.g}^{-1}$ e $T_{peak} = 64,2 \text{ }^\circ\text{C}$) comportamento semelhante ao descrito por Almeida; Cabral Marques, 2011. A curva TG apresentou um único evento de perda de massa ($\Delta m = 91,5 \%$), com ocorrência a temperaturas entre $366,2 - 453,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e está relacionada à degradação do polímero.

A curva DSC do HPMC (Fig. 26g) apresentou um evento endotérmico com $T_{onset} = 54,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 63,5 \text{ J.g}^{-1}$; $T_{peak} = 65,8 \text{ }^\circ\text{C}$). A curva TG/DTG apresentou perda de massa na faixa de temperatura de $32,4 - 66,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 1,5\%$) e foi atribuída à desidratação. Houve dois eventos de perda de massa relacionados à degradação da amostra nas temperaturas de $256,9 - 400,7$ ($\Delta m = 61,5\%$) e $405,8 - 723,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 7,4\%$). Resultados semelhantes foram obtidos por De Mendonça et al., 2014.

Com relação ao Kollidon[®] VA64 (Fig. 26h) em sua curva DSC observa-se um evento endotérmico $T_{onset} = 29,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 70,8 \text{ J.g}^{-1}$; $T_{peak} = 50,80 \text{ }^\circ\text{C}$) acompanhado de evento na curva TG em $27,6 - 78,43^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 7,9 \%$) caracterizando a desidratação polimérica descrita por Łaszcz et al., 2007, ainda na curva TG se visualizam mais três etapas de perda de massa com $\Delta m = 26,0 \%$, $53,7\%$ e $3,6\%$ entre $269,5 - 352,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $358,2 - 486,4 \text{ }^\circ\text{C}$ e $738,0 - 864,6 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. De forma que, a última perda de massa pode estar atrelada à degradação e volatilização dos resíduos carbonáceos.

Soluplus[®] curva DSC (Fig. 26i) mostrou um evento endotérmico com $T_{onset} = 81,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 133,8 \text{ J.g}^{-1}$; $T_{peak} = 73,5 \text{ }^\circ\text{C}$) quanto à desidratação deste copolímero, que é acompanhado por uma perda de massa nas curvas TG/DTG a temperaturas entre $32,0 - 99,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 2,3\%$). Além disso, na curva TG, há um segundo evento entre temperaturas de $264,6 - 348,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 22,4\%$), um terceiro evento é caracterizado por uma perda de massa mais acentuada em temperaturas entre $348,9 - 469,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 69,3\%$) e o quarto evento ocorreu na faixa de temperatura de $469,2 - 755,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 43 \%$) (ANWER et al., 2020).

Figura 26. Curvas DSC e TG/DTG (razão de aquecimento em $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (a). ácido ferúlico; (b) β -ciclodextrina; (c) hidroxipropil- β -ciclodextrina; (d) metil- β -ciclodextrina; (e) PVP K30; (f) PEG6000; (g) HPMC; (h) Kollidon[®]; (i) Soluplus[®].



5.4.2 Caracterização térmica das misturas binárias

A maioria das curvas DSC das misturas físicas binárias (Figura 27) apresentou supressão do evento endotérmico característico da fusão do AF. Apenas a mistura AF: β -CD apresentou o evento de fusão do AF, mas com menor intensidade e com $T_{onset} = 170,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 4,3\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$; $T_{peak} = 172,4\text{ }^{\circ}\text{C}$) como mostrado na Tabela 12. Esta supressão do evento de fusão torna possível inferir que houve uma diminuição da cristalinidade do AF nessas amostras, causada por alguma interação entre os componentes.

Para melhor avaliar os processos ocorridos nessas misturas físicas, foi utilizada a termogravimetria, e assim o comportamento das curvas foi verificado e as variações de massa nas misturas binárias são ilustradas na Figura 28 e descritas na Tabela 13. O AF apresentou

três estágios de decomposição na faixa de temperatura entre 171,6 e 624,5 °C, já as curvas TG das misturas binárias apresentaram de três a cinco eventos de decomposição. Em todas as misturas binárias, exceto AF:PEG6000, há um primeiro evento de perda de massa causado pela desidratação da amostra em temperaturas que variam de 28,1 a 100,4°C.

Todas as misturas binárias apresentaram efeito de soma das perdas de massa das substâncias isoladas, e ainda é possível visualizar nas curvas termogravimétricas o estágio principal de decomposição do AF. No entanto, no AF: β -CD, AF:PVP, AF:PEG, AF:HPMC e AF:SOL há o deslocamento da etapa correspondente à degradação do ativo para faixas de temperatura mais baixas (172,6 °C) que iniciam entre 153,4 e 158,6 °C. Nas misturas AF:HP- β -CD, AF:M- β -CD e AF:KOL houve o deslocamento do estágio principal de degradação do AF para faixas de temperatura mais elevadas que iniciaram entre 196,3 e 207,8 °C.

Embora a degradação do AF nas misturas binárias tenha ocorrido em várias faixas de temperatura, pode-se observar a diminuição significativa do percentual de degradação do ativo em todas as amostras descritas na Tabela 13. Uma vez que o AF isolado apresentou perda de massa de 89,6% no estágio principal da degradação, observou-se que a mistura AF: β -CD apresentou menor perda de massa para o AF ($\Delta m = 6,6\%$), assim como nas misturas AF:PVP e AF:SOL com degradação de 37,4%.

Figura 27. Curvas DSC das misturas físicas binárias (1:1) na razão de aquecimento 10 °C.min⁻¹.

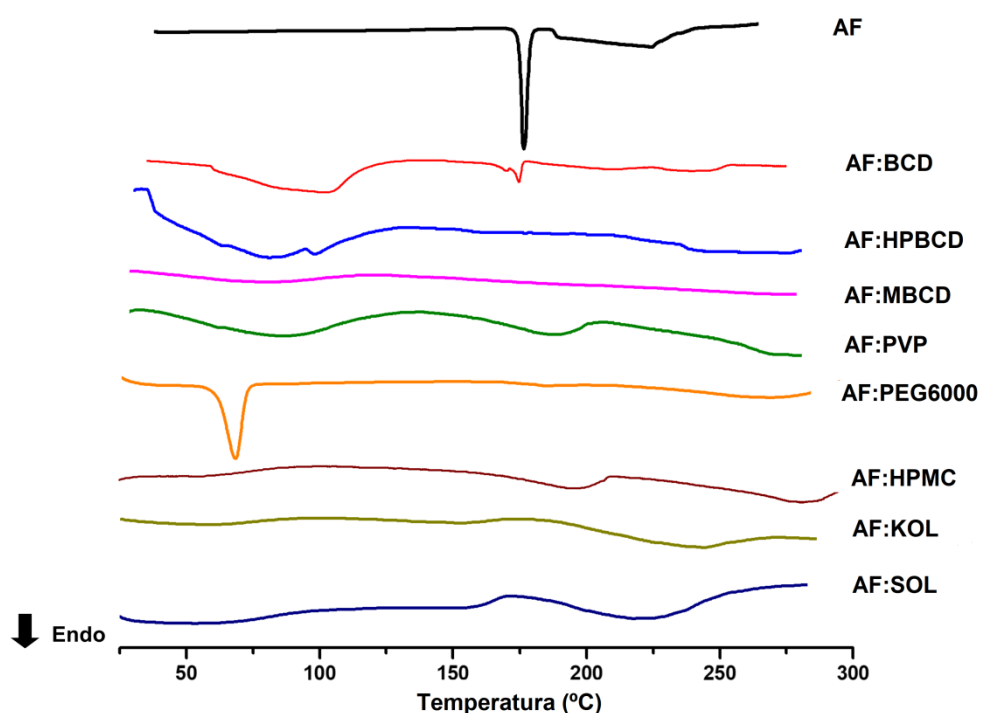


Tabela 12. Temperaturas e valores ΔH obtidos nas curvas DSC para o pico de fusão característico do AF nas amostras.

Misturas binárias (1:1)	DSC		
	T _{onset} /°C	T _{peak} /°C	ΔH /J.g ⁻¹
AF	171,6	173,4	131,4
AF: β -CD	170,5	172,4	4,3
AF: HP- β -CD	-	-	-
AF: M- β -CD	-	-	-
AF: PVPK30	-	-	-
AF:PEG6000	-	-	-
AF: HPMC	-	-	-
AF: KOLLIDON	-	-	-
AF: SOLUPLUS	-	-	-

*(-) O ponto de fusão do AF na mistura binária não foi visualizado.

Figura 28. Curvas TG das misturas físicas binárias (1:1) na razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

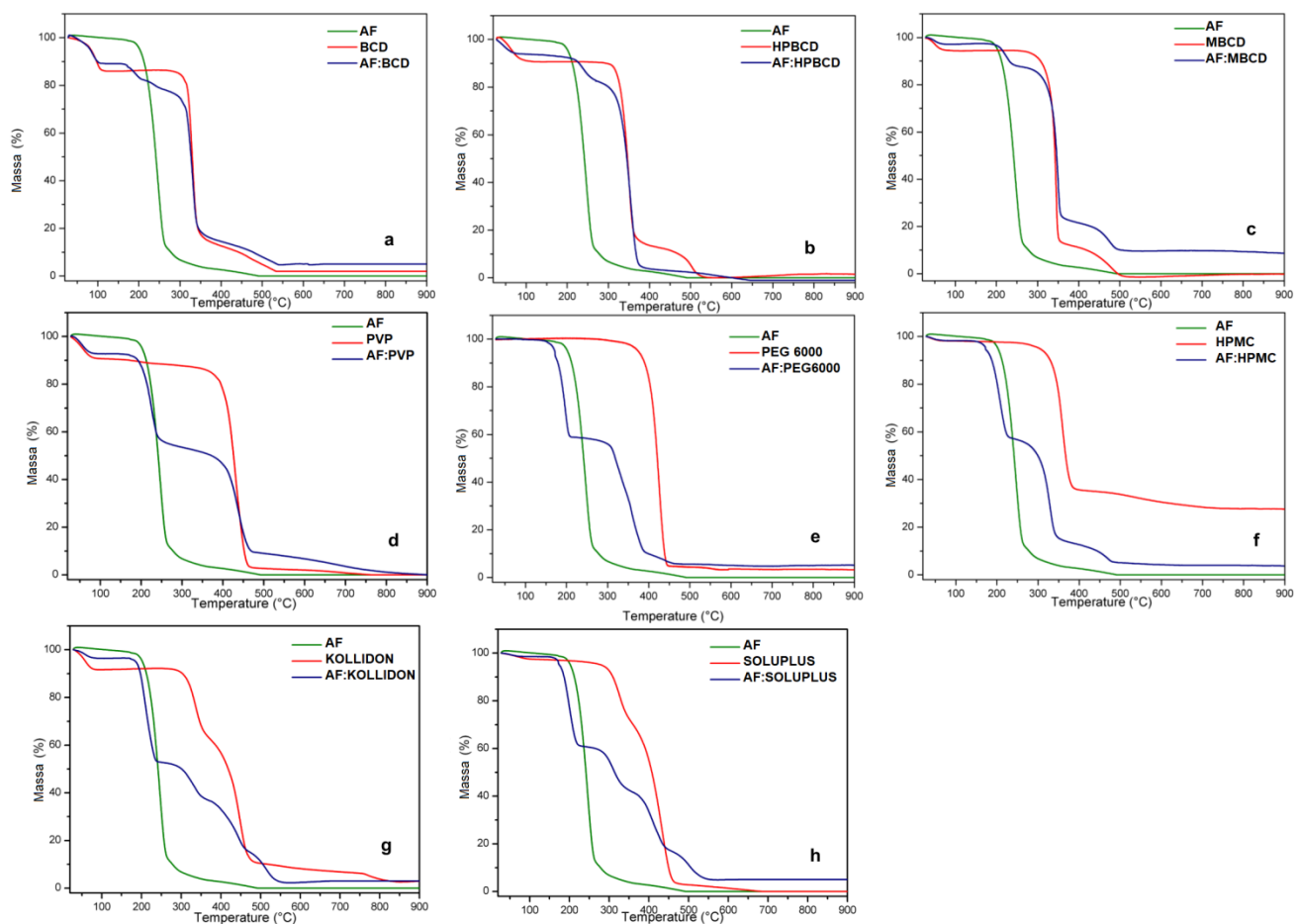


Tabela 13. Dados termogravimétricos das misturas binárias (1:1) na razão de aquecimento a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Misturas Binárias (1:1)	TG		
	Estágios de decomposição	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	$\Delta m/\%$
AF: β -CD	1	28,1 – 100,4	11,6
	2	156,3 - 205,5	6,6
	3	205,5 – 261,5	4,4
	4	261,5 – 373,0	62,1
	5	373,0 – 538,7	11,1
AF: HP- β -CD	1	33,6 - 82,6	5,2
	2	207,8 - 273,8	9,5
	3	273,8 - 390,4	78,3
	4	390,4 – 782,7	7,6
AF: M- β -CD	1	36,9 – 69,7	2,4
	2	196,3 – 257,9	9,2
	3	258,4 – 391,1	65,7
	4	391,1 – 505,7	12,0
AF: PVPK30	1	31,0 – 87,7	7,2
	2	153,4 – 262,7	37,4
	3	262,7 – 478,5	45,8
	4	478,1 – 816,3	8,6
AF:PEG6000	1	153,9 – 222,2	40,2
	2	287,8 – 405,7	47,2
	3	406,6 – 471,7	4,2
AF: HPMC	1	35,5 – 63,6	1,3
	2	158,6 – 245,7	40,6
	3	245,7 – 367,9	42,6
	4	367,9 – 499,1	9,4
AF: KOLLIDON	1	35,7 – 76,8	2,9
	2	173,3 – 241,0	42,9
	3	280,3 – 352,9	13,6
	4	352,9 – 462,6	22,1
	5	462,6 – 544,3	13,0
AF: SOLUPLUS	1	36,2 – 81,3	1,3
	2	155,8 – 236,2	37,4
	3	284,4 – 366,9	17,4
	4	366,9 – 456,3	24,0
	5	456,3 – 560,3	12,7

5.4.3 Difração de raios-X

DR-X é um método útil para a detecção de compostos em estados microcristalinos. Esta técnica foi aplicada para verificar as possíveis alterações na estrutura cristalina do AF nas misturas binárias, bem como para avaliar o grau de cristalinidade das amostras.

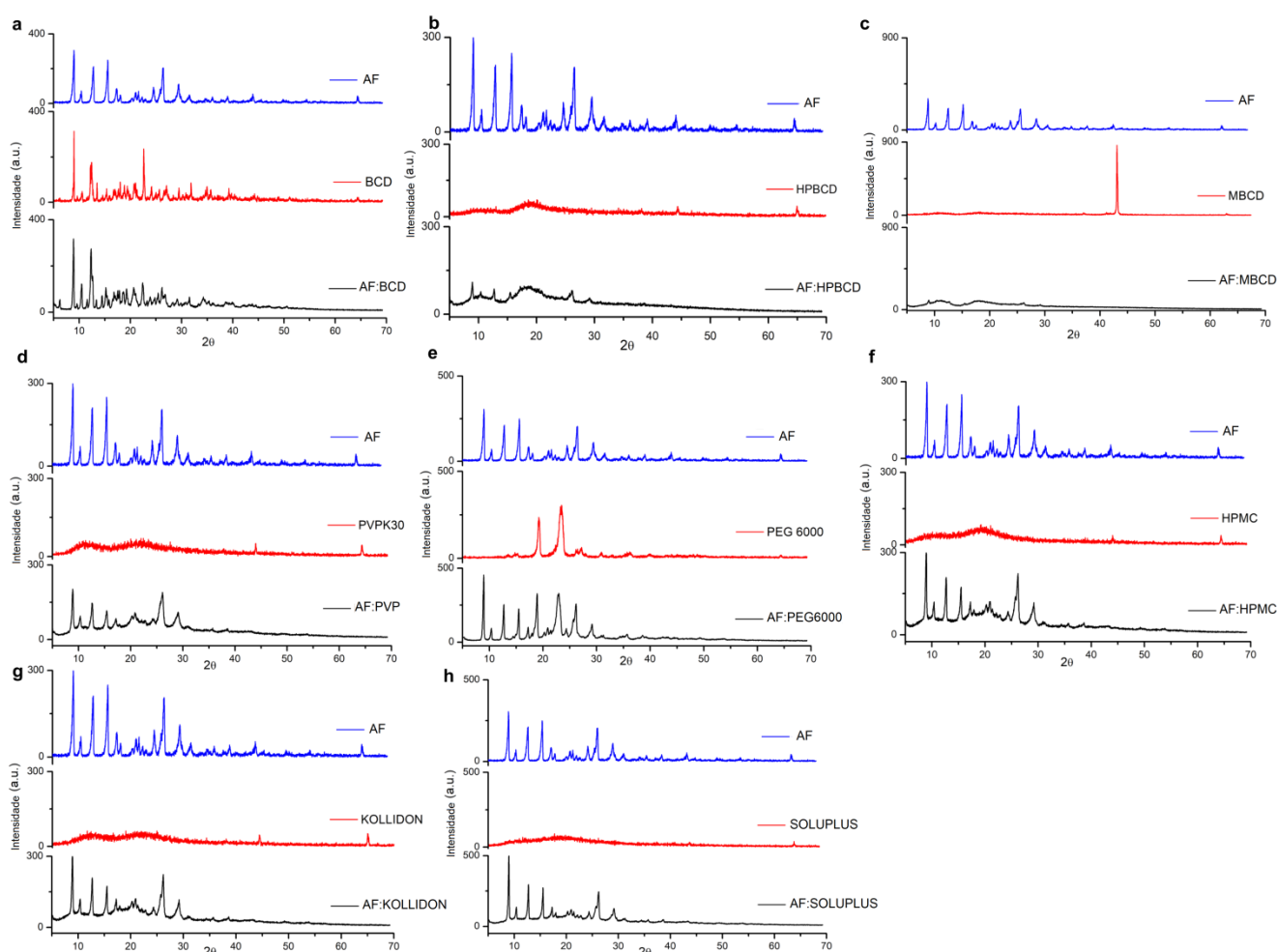
Os difratogramas do AF (Figura 29) mostraram reflexões cristalinas de alta intensidade que confirmam a natureza cristalina do composto. Apresentando um perfil cristalino característico com reflexos de alta intensidade em $9,1^\circ$, $12,8^\circ$, $15,7^\circ$, $17,3^\circ$, $26,4^\circ$, $29,3^\circ$ e algumas outras reflexões de menor intensidade. Este padrão corrobora com o perfil cristalino descrito por Wang et al., 2011. Além disso, os difratogramas têm o mesmo perfil relatado por Nethaji; Pattabhi; Desiraju, 1988, código de GASVOL do banco de dados CCDC, confirmando o grupo espacial P21/n para o composto.

Da mesma forma, o demais componentes propostos também foram avaliados por razões de comparação. Dentre os oito adjuvantes analisados a β -CD, M- β -CD e PEG 6000 apresentaram difratogramas típicos de materiais microcristalinos como observado na Figura 29.

Com relação às misturas binárias com CDs, observou-se um alto número de reflexões cristalinas resultantes da mistura AF : β -CD (Figura 29a). Sendo esta a mais cristalina entre as misturas com CDs avaliadas, o que corrobora com os dados obtidos pelo DSC, onde ainda é possível verificar um discreto evento de fusão referente ao AF. No entanto, as misturas binárias com HP- β -CD (Figura 29b) e com M- β -CD (Fig. 29c), mostraram um padrão predominantemente amorfo, provavelmente devido à entrada do AF na cavidade da CD (ZOPPI et al., 2011). Os dados obtidos no DSC corroboram com este comportamento, onde foi observada ausência do pico de fusão característicos do AF.

As misturas com polímeros comportaram-se como um resultado da combinação dos componentes analisados separadamente seguidos de uma diminuição na intensidade dos reflexos cristalinos do AF. Foi possível verificar na mistura AF:PEG6000 (Fig. 29e) a ocorrência de reflexões nos ângulos $18,9^\circ$ e 23° inerentes ao polímero isolado, assim sendo um indicativo da ocorrência de uma somatização das reflexões cristalinas dos componentes da mistura. Todas essas interações do AF que provocaram redução nas reflexões cristalinas ou até mesmo a formação de um padrão halo sugerem que a solubilidade do AF provavelmente será aumentada através de misturas binárias físicas simples, que serão de fundamental importância para o desenvolvimento de formas farmacêuticas e realização de estudos subsequentes.

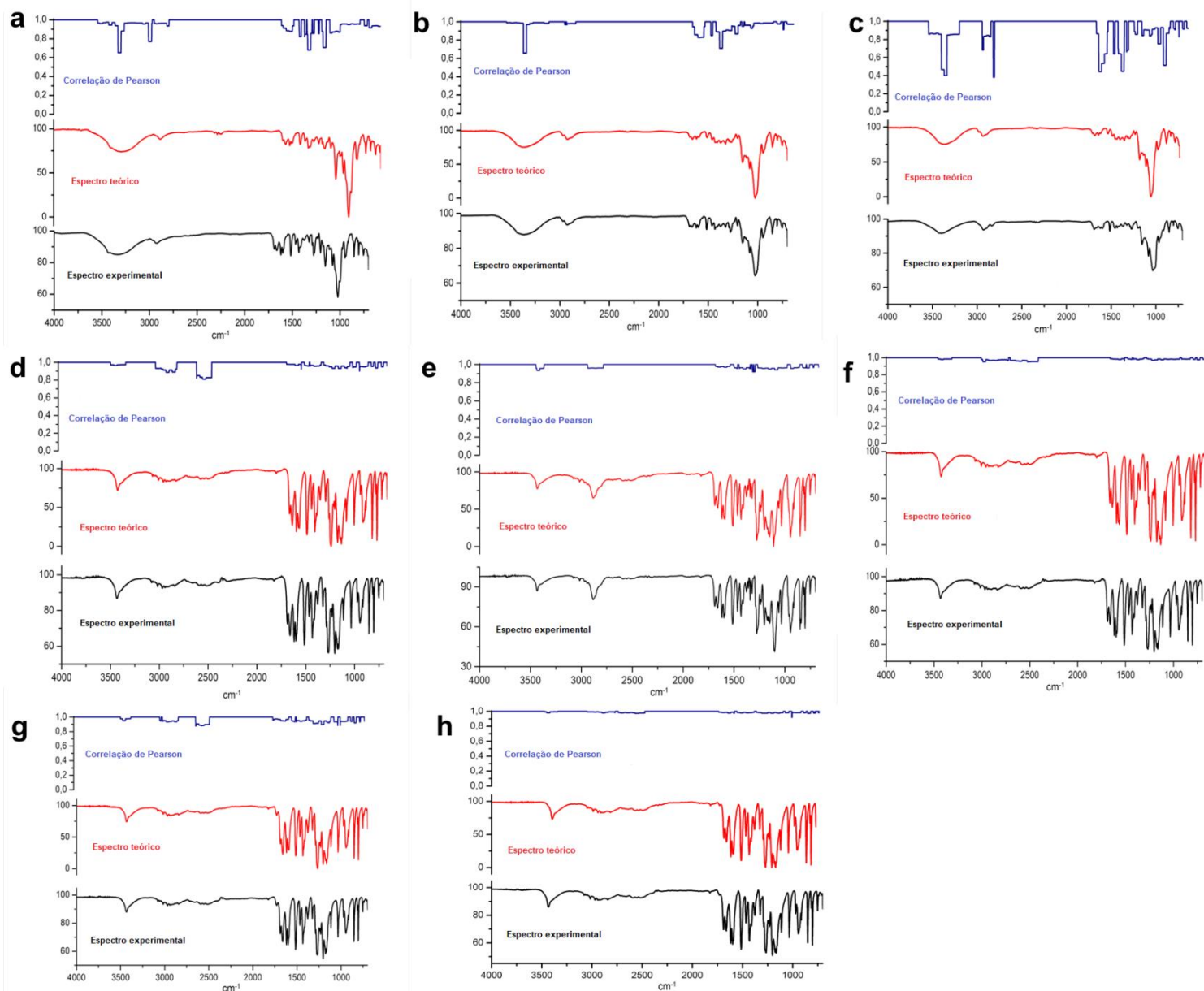
Figura 29. Difratomogramas das misturas físicas binárias (1:1).



5.4.4. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia infravermelha é umas das técnicas mais adequadas para avaliar as interações a nível molecular, detectando alterações em regiões que possam estar relacionadas ao processo de interação de duas ou mais substâncias. A Figura 30 reporta o espectro experimental e o espectro teórico resultante da contribuição de cada componente isolado, estabelecendo qual seria o espectro ideal para uma mistura sem interações químicas. Essa estratégia para avaliação de espectro é conhecida como correlação de Pearson (DA SILVA, et al., 2016).

Figura 30. Espectros no infravermelho e correlação de Pearson para as misturas físicas binárias (1:1). (a) AF: β -CD; (b) AF: HP- β -CD; (c) AF:M- β -CD; (d)AF:PVP; (e)AF:PEG6000; (f) AF:HPMC; (g) AF:Kollidon[®]; (h) AF:Soluplus[®].



Na maioria dos casos, a interação fármaco-ciclodextrina é muito intensa e, conseqüentemente, é possível afirmar que houve interação analisando a intensidade e o deslocamento das bandas no espectro. Algumas regiões características da molécula hospedeira, neste caso o AF, podem ser afetadas pela interação com CDs a nível molecular, sendo mascaradas pela sua alta absorção no infravermelho (GARCÍA-ZUBIRI et al., 2003).

No espectro teórico e experimental das misturas com as CDs, β -CD e HP- β -CD, nota-se que, em algumas bandas do espectro, há correlação com r entre 0,7 e 0,6 o que indica uma correlação moderada. Nessas regiões há bandas de absorção típicas das CDs, como as bandas entre 3400 e 3350 cm^{-1} (O-H) e a 3025 cm^{-1} devido ao alongamento O-H. Para essas duas misturas também houve uma menor correlação na região entre 1400 e 1450 cm^{-1} , que estão relacionadas a dobras C-H e vibrações do anel aromático do AF (MATHEW; ABRAHAM, 2007; WANG, et al., 2011; YUAN; LIU; LIU, 2015).

A mistura AF:M- β -CD apresentou correlações em sua maioria baixas ao longo dos espectros experimentais e teóricos, sendo os valores de correlação entre 0,5 e 0,4, indicando a ocorrência de interações químicas entre AF e M- β -CD. Nas regiões de menor correlação, a CD a 3400 cm^{-1} foi caracterizada como a vibração do alongamento O-H, entre 2970 cm^{-1} vibração do trecho C-H e 1030 cm^{-1} devido às vibrações de alongamento C-H e C-O (CHAO et al., 2014). Também ocorre nas regiões correspondentes ao AF em 2840 cm^{-1} atribuídas à vibração do alongamento do grupo C-H, em banda de 1690 cm^{-1} característica do carbonila conjugada ao aromático, em 1520 e 1430 cm^{-1} bandas relacionadas ao núcleo aromático da molécula (MATHEW; ABRAHAM, 2007; WANG, et al., 2011).

Diante destas considerações, observa-se que houve uma correlação moderada nos espectros das misturas binárias do AF com β -CD e HP- β -CD, o que indica uma interação física entre as substâncias. O espectro da mistura AF:M- β -CD mostrou principalmente baixa correlação entre o teórico e o experimental, indicando a ocorrência de interações mais intensas entre o AF e esta CD. Esses comportamentos podem ser justificados devido à inserção do AF na cavidade da CDs, alterando assim sua visualização na mistura.

Uma comparação de espectros teóricos e experimentais para misturas do AF com HPMC, PEG 6000 e Soluplus[®] mostrou uma correlação de Pearson em todo o espectro com $r > 0,9$ indicando uma alta correlação e também baixa possibilidade de interação química na mistura física. Isso sugere a ocorrência de interação física entre o AF e estes polímeros. Já para as misturas do AF com PVP K30 e Kollidon[®] revelaram um valor de correlação próximo a 0,8. As alterações mais relevantes ocorreram nas regiões de 2500 cm^{-1} , o que corresponde à forte ligação de hidrogênio representada por uma banda larga de baixa intensidade. PVP K30 e Kollidon[®] V64 são derivados do homopolímero 1-etenil-2-pirrolidona e apresentam a capacidade de formar ligações de hidrogênio com outras moléculas que contêm grupos de doadores de elétrons, como nitrogênio e oxigênio (VALERO; PÉREZ-REVUELTA; RODRÍGUEZ, 2003). No entanto, na maior parte dos espectros, a correlação foi próxima de

0,9 levando-nos a concluir que há uma alta correlação e, portanto, baixa interação química entre as misturas AF: PVPK30 e AF: KOL.

5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

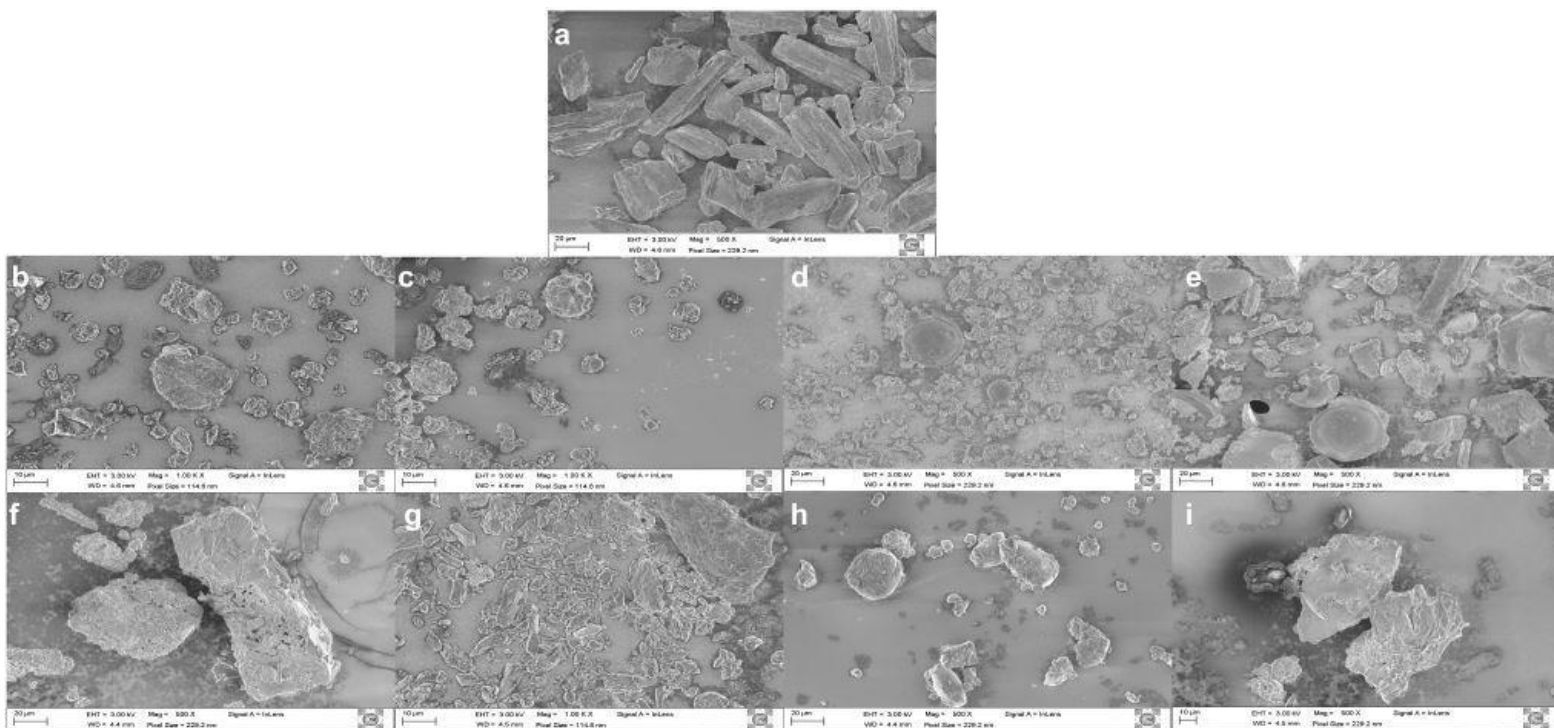
A morfologia do AF (Fig. 31a) revelou que a substância é apresentada como cristais do tipo agulha, corroborando com o descrito por Wang et al., 2011. Esta morfologia tipicamente cristalina é esperada a partir de protótipos ou drogas que apresentam baixa solubilidade aquosa, devido à estrutura organizada e simétrica das moléculas internas, que dificultam a penetração do solvente polar. Em misturas com β -CD, HP- β -CD e M- β -CD (Fig. 31b, 31c e 31d, respectivamente) a morfologia cristalina original do AF desapareceu, predominando partículas de formas amorfas e esféricas, sendo esta última característica das CDs, que são cicloamiloses. Esta característica das misturas confirma a redução e perda da cristalinidade do AF observada nas análises de DSC e DR-X (DOU et al., 2018; NEACŞU, 2018).

Com relação às misturas do AF com polímeros, foi possível observar uma heterogeneidade morfológica das misturas com PVP (Fig. 31e), PEG6000 (Fig. 31f) e HPMC (Fig. 31g) indicando que o AF está apenas disperso nesses polímeros. Com relação as amostras AF:KOLLIDON (Fig. 31h) e AF:SOLUPLUS (Fig. 31i) há predominância de partículas esféricas e amorfas, não sendo possível distinguir o AF e o polímero, uma vez que ambas substâncias são copolímeros e apresentam em sua constituição mais de um polímero.

A análise morfológica corroborou com os resultados obtidos na análise térmica e DR-X tanto para CDs quanto para polímeros, sugerindo que estes carreadores podem aumentar a solubilidade aquosa do AF, representando alternativas para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação.

As técnicas empregadas nos permitiram compreender as interações entre o AF, CDs e polímeros. Essas substâncias foram capazes de conferir alterações físico-químicas à molécula tornando-a mais estável em altas condições de temperatura e reduzindo sua cristalinidade. Estes resultados demonstram que essas CDs e polímeros têm potencial de serem empregados para aumentar a estabilidade do AF, em complexos de inclusão, dispersões sólidas ou sistemas multicomponentes para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com maior eficácia e atividade.

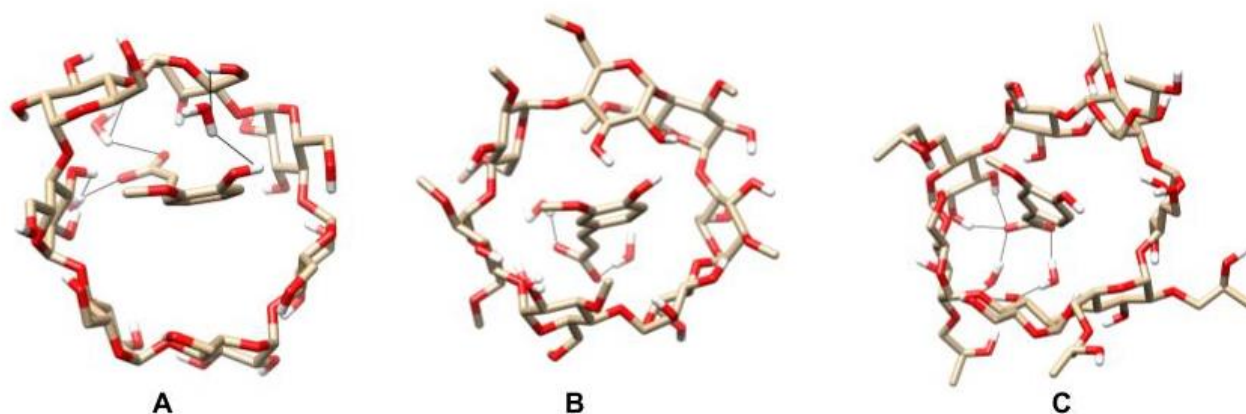
Figura 31. Fotomicrografias (a) AF; (b) AF: β -CD; (c)AF: HP- β -CD; (d) AF:M- β -CD; (e)AF:PVP; (f)AF:PEG6000; (g) AF:HPMC; (h) AF:Kollidon[®]; (i) AF:Soluplus[®].



5.4.6. Determinação da energia de interação

As energias de interação encontradas por meio da metodologia de LIE para AF: β -CD, AF:M- β -CD e AF:HP- β -CD foram - 20.54 kJ/mol, -5.50 kJ/mol e - 31.44 kJ/mol, respectivamente. As imagens foram obtidas com o software UCSF-Chimera e estão reportadas na Figura 32.

Figura 32. Representação esquemática da geometria otimizada dos complexos de inclusão entre o AF e as CDs. (A) AF: β -CD, (B) AF:M- β -CD e (C) AF:HP- β -CD.

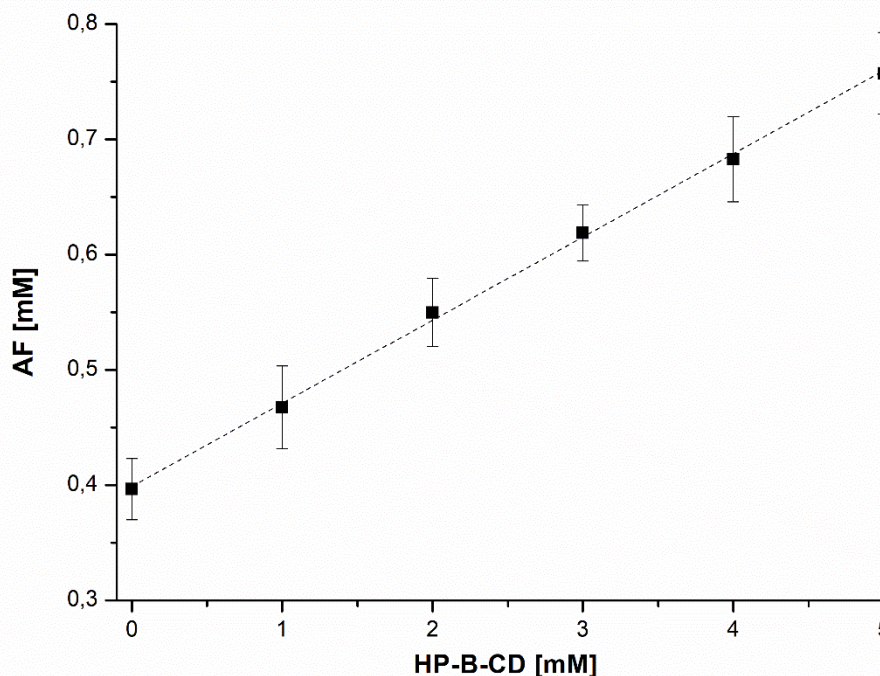


As interações termodinâmicas entre os vários componentes dos sistemas (hospedeiro, hóspede e solvente) são conhecidas como fatores críticos para determinar as propriedades dos complexos (DEL VALLE, 2004). Os estudos de dinâmica molecular dos complexos de inclusão entre o AF e três diferentes CDs nos permitiram avaliar a susceptibilidade na formação de cada um dos complexos e a melhor posição da interação dentro da cavidade. A formação de complexos de inclusão entre o AF e qualquer das CDs será preferencialmente na proporção de 1:1. De maneira que, os melhores resultados são relativos à interação da HP- β -CD ($\Delta G = - 31.44$ kJ/mol) com o AF, em comparação com a β -CD e a M- β -CD ($\Delta G = - 20.54$ kJ/mol e -5.50 kJ/mol, respectivamente). Os sistemas compostos por CDs e ligantes são formados pelo deslocamento das moléculas de água e a substituição delas por moléculas apolares (SUWANDECHA et al., 2017). É geralmente aceito que as forças motrizes para a formação de complexos são ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila do hospedeiro e do hóspede, interações de força de Van der Waals, interações hidrofóbicas e a liberação de moléculas de água de alta energia das cavidades do hospedeiro para o volume de água. A inclusão de soluto na cavidade de CD é geralmente associada a grandes valores negativos de entalpia e valores de entropia ligeiramente positivos (DEL VALLE, 2004; RHO et al., 2017). Assim, é compreensível que a formação do complexo de inclusão com a HP- β -CD seja a mais espontânea entre as demais, tendo em vista a maior quantidade de grupamentos hidróxi voltados para o exterior da cavidade. Uma vez que quanto maior o valor negativo de ΔG , indica que o processo de ligação destes complexos em solução aquosa é provavelmente espontâneo e termodinamicamente favorecido (RHO et al., 2017).

5.4.7 Diagrama de solubilidade com CD

A partir dos resultados obtidos no estudo de dinâmica molecular, a HP- β -CD foi selecionada para utilização nos complexos multicomponentes. Diante disto, o diagrama de solubilidade de fases estabelecido por Higuchi e Connors (1965) frequentemente utilizado para verificar a formação dos complexos de inclusão em solução foi empregado para esta CD. Para estimar não apenas o valor da constante de estabilidade, mas também fornecer informações sobre a estequiometria envolvida com os componentes em equilíbrio. A Figura 33 mostra o diagrama de solubilidade de fase do sistema AF:HP- β -CD. A solubilidade do AF foi testada diante da concentração crescente de CD de 0 a 5 mM.

Figura 33. Diagrama de solubilidade de fases do AF a 25°C na presença da HP-β-CD em triplicata



De acordo com Figura 33, a equação obtida foi $y = 0,072x + 0,0004$, com coeficiente de correlação ($r = 0,99$). A capacidade de melhora de solubilização do AF frente à presença da CD pode ser avaliada quantitativamente pelo aumento da solubilidade do fármaco na solução. O incremento na solubilidade do AF foi observado como uma função linear da concentração de CD, classificada como perfil do tipo AL (HIGUCHI; CONNORS, 1965). A relação linear sugere a formação de complexos de inclusão com estequiometria molar 1: 1 (HIGUCHI; CONNORS, 1965; SAOKHAM; LOFTSSON, 2017). Esse achado também é coerente com os estudos anteriores, nos quais o perfil de solubilidade do AF com a HP-β-CD foram obtidos para perfil típico de AL (MORI et al., 2019; WANG, J. et al., 2011).

A solubilidade do AF em soluções concentradas a 5 mM de HP-β-CD dissolveu uma quantidade cerca de 2 vezes maior do AF quando comparado com a solução sem a presença da CD. Resultados semelhantes foram descritos por Celebioglu e Uyar, 2020 que a 8 mM relataram uma otimização de 2,6 vezes na solubilidade do AF.

Por meio da inclinação da reta obtida do diagrama de solubilidade de fases foi possível obter a constante de estabilidade utilizando a equação 1, onde o valor K_c foi de $168,5 \text{ M}^{-1}$. Estudos semelhantes relataram diferentes valores de constantes de estabilidade entre o AF e

HP- β -CD: Wang et al., 2011 descreveram em $166,3 \text{ M}^{-1}$, Mori et al., 2019 observaram em $218,5 \text{ M}^{-1}$ e Celebioglu e Uyar, 2020 relataram em 468 M^{-1} .

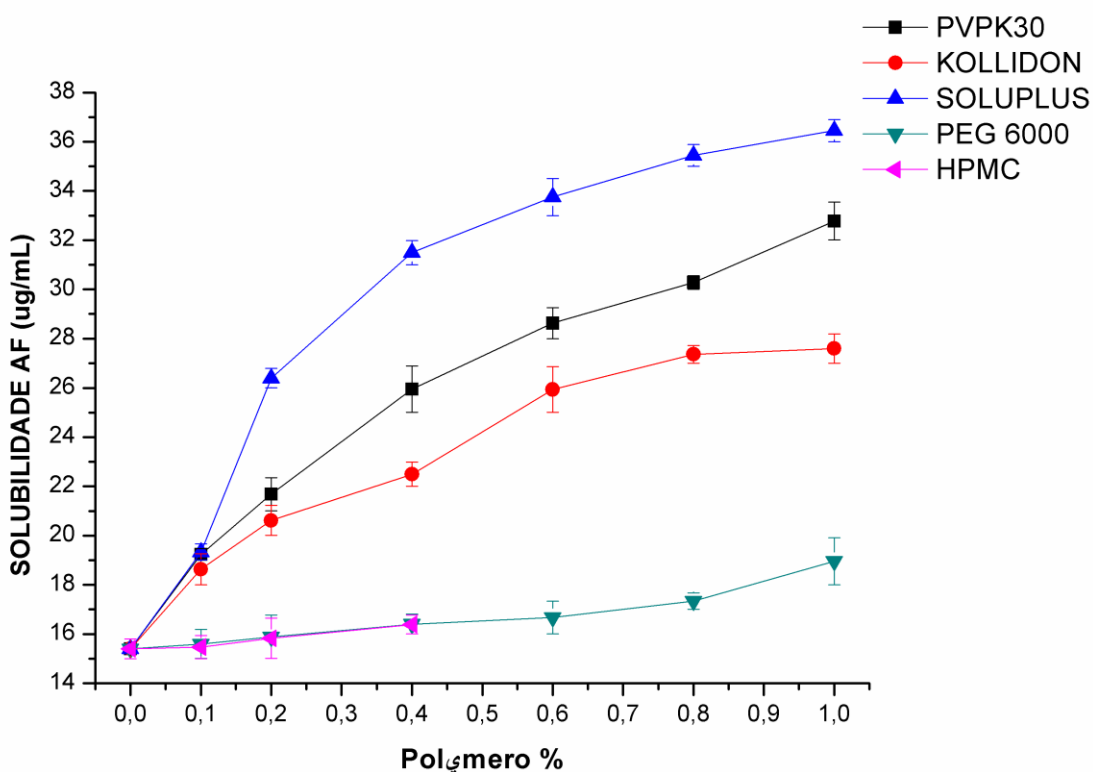
A determinação do valor da constante de estabilidade não garante que um fármaco formou um complexo de inclusão com uma CD, apenas sugere se ocorreu mudança na sua solubilidade. Ao encontrarmos valores baixos da constante indica a formação de complexos lábeis que liberam o fármaco facilmente, enquanto que valores elevados indicam a formação de complexos mais estáveis, podendo originar uma liberação lenta ou insuficiente do fármaco (LOFTSSON; SAOKHAM; SÁ COUTO, 2003; MORAIS; VEIGA, 2002).

Considerando a baixa eficiência de complexação das CDs para a maioria dos medicamentos e seu peso molecular relativamente alto, o uso destas geralmente resulta em aumento da massa da formulação além dos limites aceitáveis. Vários métodos têm sido utilizados para aumentar a eficiência da complexação, incluindo: adição de pequenas quantidades de polímeros hidrofílicos, ionização de medicamentos, formação de sal, adição de ácidos hidroxicarboxílicos, ácidos, bases voláteis e adição de co-solventes (LOFTSSON; BREWSTER, 2012; MEDAREVIĆ et al., 2015).

5.4.8 Seleção dos polímeros hidrofílicos

O objetivo desta análise foi observar a influência dos polímeros na solubilidade do AF de acordo com o aumento da concentração destes carreadores nas soluções. Esses resultados podem ser analisados de acordo com a Figura 34, obtida por meio de quantificações realizadas em CLUE-DAD, onde é importante verificar a crescente linearidade nas curvas que cada polímero apresentou de acordo com a concentração utilizada e o percentual de solubilização para o AF na solução.

Figura 34. Curvas do diagrama de solubilidade do AF com polímeros realizados em triplicata.



Constatou-se que o copolímero Soluplus[®] e o polímero PVP K30 tiveram o melhor desempenho, aumentando a solubilidade do AF de 15,40 para 36,45 µg/mL (57,8%) e 32,77 µg/mL (53%) na concentração de 1,0%, respectivamente.

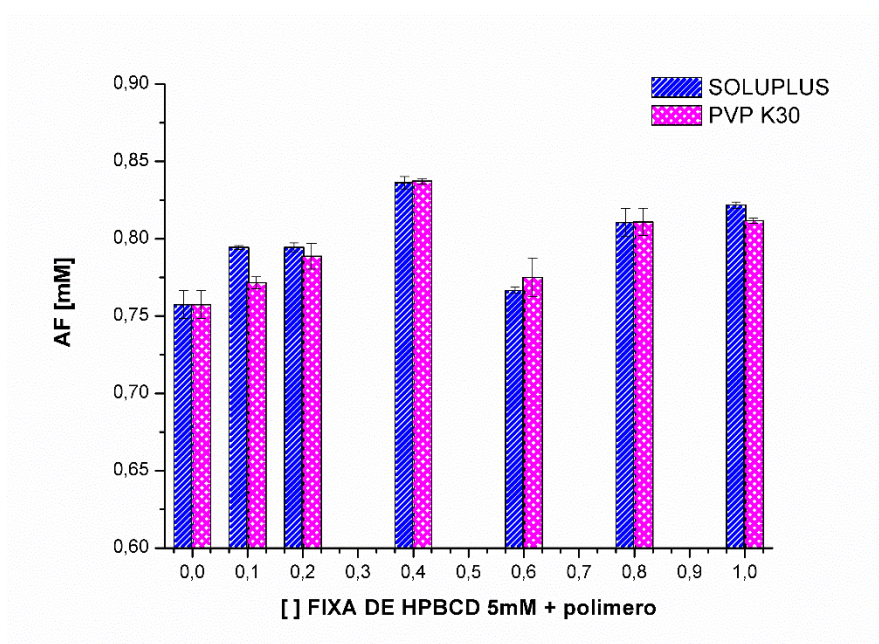
Soluplus[®] é um copolímero de caprolactam polivinil - acetato de polivinil - polietileno glicol, classificado como membro da quarta geração de portadores de dispersões sólidas, que visa alcançar o maior grau de aumento na dissolução de drogas com baixa solubilidade aquosa. Soluplus[®] é um solubilizador polimérico com estrutura anfifílica, com um grande número de grupos hidroxis presentes (SHAMMA; BASHA, 2013). Já o PVP K30 é um homopolímero de N-vinil-2-pirrolidona obtido por polimerização via radicalar em água ou em álcool isopropílico, de natureza higroscópica e compatível com uma ampla faixa de resinas hidrofílicas e hidrofóbicas. Este polímero é bastante difundido na tecnologia farmacêutica, em especial, na modulação da dissolução de fármacos pouco solúveis em água (DORNELAS et al., 2008; SILVA JÚNIOR et. al., 2017).

Diante disto, o Soluplus[®] e o PVPK30 foram os polímeros escolhidos para dar continuidade aos estudos subsequentes junto a HP-β-CD e o AF.

5.4.9 Efeito dos polímeros, em concentração fixa de CD

Os polímeros hidrossolúveis interagem com as moléculas de CDs ou com complexos fármaco-CD, formando complexos multicomponentes fármaco-CD-polímero (ASBAHR et al., 2009). Alguns autores têm demonstrado a possibilidade dos polímeros formarem complexos com CDs, aumentando a solubilidade dos ativos e também a permeação através de membranas biológicas (JANSOOK; LOFTSSON, 2009; MESSNER et al., 2010). A Figura 35 apresenta a influência dos polímeros Soluplus[®] e PVP K30 em concentrações de 0,1 a 1,0%, frente a concentração fixa de HP- β -CD.

Figura 35. Diagrama de solubilidade do AF em concentração fixa de HP- β -CD utilizando Soluplus[®] e PVP K30 em concentrações crescentes.



O aumento na solubilidade do AF foi melhor observado utilizando o Soluplus[®] e o PVPK30 nas concentrações de 0,4%. A análise estatística por ANOVA revelou que os resultados foram diferentes ($p < 0,05$) da concentração inicial, a qual continha apenas a solução de HP- β -CD com AF. Em termos de percentual o incremento do Soluplus[®] e PVP K30 na solubilidade do HP- β -CD: AF foi de 7,83% e 6,67%, respectivamente.

O efeito da associação de polímeros hidrofílicos com CDs para aumentar a solubilidade de drogas insolúveis está bem estabelecido na literatura, onde numerosos estudos

anteriores confirmam os benefícios da adição de polímeros para melhorar a eficiência da complexação de CDs (AMMAR et al., 2006; JABLAN; SZALONTAI; JUG, 2012; SOARES-SOBRINHO et al., 2012; AL, 2013; TAUPITZ et al., 2013; MEDAREVIĆ et al., 2015; VIEIRA et al., 2015; SOLIMAN; IBRAHIM; GHORAB, 2016). No entanto, o mecanismo envolvido ainda não está totalmente claro. O PVP é mencionado como melhorador da capacidade de complexação pelo aumento na intensidade das interações através das pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, conseqüentemente levando ao aumento na constante de estabilidade (LOFTSSON; FRIRIKSDÓTTIR, 1998; MURA; FAUCCI; BETTINETTI, 2001).

É interessante destacar que a interação da CD com cada fármaco tem uma dinâmica dependente da estrutura química deste, tipo e intensidade desta interação, então quando adicionado um terceiro componente ao meio, esta dinâmica pode ser alterada favorecendo ou não a solubilização da molécula. A adição de polímeros nem sempre resulta num aumento da solubilidade. O efeito sinérgico de polímeros hidrossolúveis na complexação pode ser dependente da concentração ou associação com algumas estratégias, como determinados tratamentos da solução como ultrassom (LOFTSSON, 1998).

Diante dos resultados obtidos no ensaio de solubilidade, a etapa em fase sólida foi planejada utilizando os melhores resultados dos polímeros em solução. Onde, PVP K30 e Soluplus[®] foram selecionados na concentração de 0,4% como bons candidatos para utilização em complexos multicomponentes envolvendo a HP- β -CD e o AF na estequiometria de 1:1.

5.4.10 Obtenção e quantificação dos complexos multicomponente

Os complexos foram obtidos com sucesso pelas técnicas de obtenção propostas, malaxagem e rotaevaporação. A tabela 14 reporta os rendimentos dos complexos obtidos para cada polímero, bem como o teor do AF nas amostras obtidas. De maneira que, o método que demonstrou melhor rendimento para obtenção dos sistemas foi através da malaxagem, com destaque para os rendimentos das amostras AF: HP- β -CD: PVP e AF: HP- β -CD: SOL com 74,02 e 80,31, respectivamente.

Os resultados da análise quantitativa mostraram que o fármaco foi incorporado de forma eficiente nos complexos multicomponentes ternários. Os valores da concentração do fármaco em 1 mg da matriz ocorreu na média de $0,1108 \pm 0,005$ mg e foram utilizados para planejamento de ensaios posteriores de performance.

Tabela 14. Análise do rendimento e teor do AF dos complexos multicomponentes obtidos por malaxagem e rotaevaporação.

Sistema multicomponente	Rendimento (%)	Teor AF(%)
Malaxado AF: HP- β -CD: PVP	74,02	88,96 \pm 0,34
Rotaevaporado AF: HP- β -CD: PVP	47,13	88,59 \pm 0,46
Malaxado AF: HP- β -CD: SOL	80,31	94,25 \pm 1,25
Rotaevaporado AF: HP- β -CD: SOL	64,32	97,77 \pm 1,71

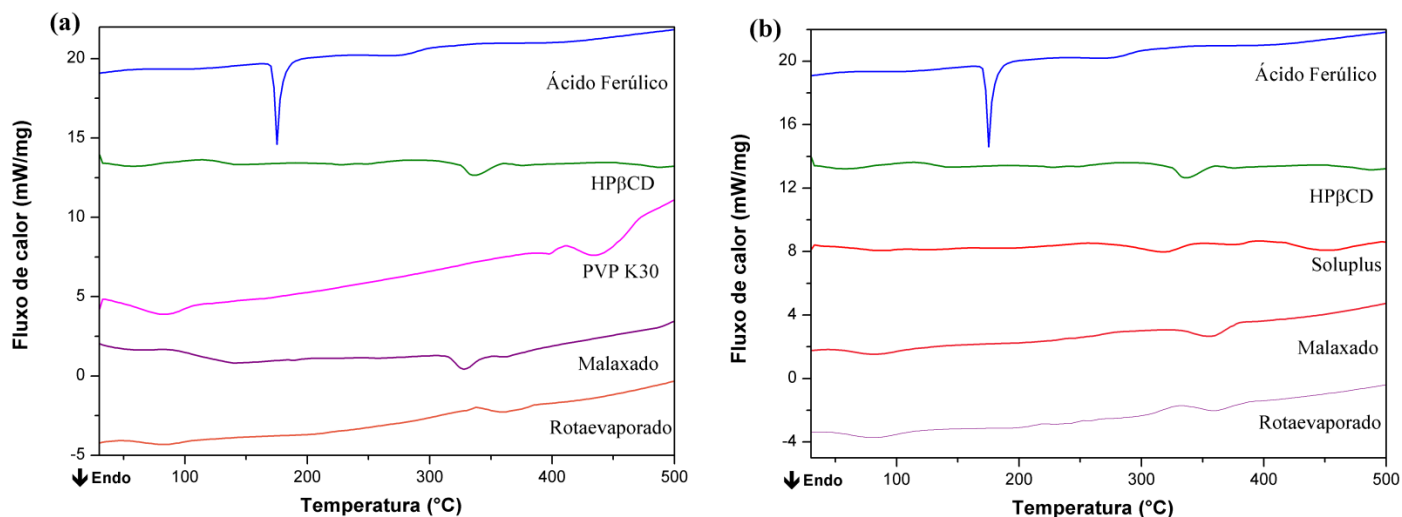
5.4.11 Caracterização físico-química dos complexos multicomponentes

Após a obtenção dos complexos multicomponentes as amostras foram submetidas a ensaios de caracterização físico-química para averiguação da ocorrência de interação entre o AF e os demais componentes.

5.4.11.1 Análise térmica

A técnica de DSC foi aplicada para avaliação do comportamento térmico dos componentes isolados e de possíveis interações entre os componentes nos complexos obtidos. Já a TG permite a monitorização da influência dos componentes na estabilidade térmica do fármaco em meio ao complexo. A Figura 36 ilustra as curvas de DSC dos componentes isolados e os complexos obtidos pelas técnicas de malaxagem e rotaevaporação.

Figura 36. Curvas DSC dos componentes isolados e complexos multicomponentes na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$: (a) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:Soluplus.



A curva DSC dos complexos não apresentaram os eventos característicos de fusão e degradação do AF que ocorrem em $167,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $192,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 175,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 179,8\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e $237,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $302,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 272,72\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 55,4\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), respectivamente.

Sendo observados em todas as curvas das obtenções, dois eventos principais, um que caracteriza a desidratação da amostra seguido de outro evento que corresponde possivelmente à degradação da mesma. Na curva calorimétrica do malaxado AF:HP- β -CD:PVP é possível verificar um evento endotérmico referente a perda de água com $T_{onset} = 46,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 91,6\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 54,8\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e outro inerente a degradação com $T_{onset} = 311,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 328,7\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 89,3\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) ocorrendo na mesma região correspondente a degradação da HP- β -CD, como esta substância estava em maior razão molar então, é provável o aparecimento de eventos característicos dela. Para o rotaevaporado AF:HP- β -CD:PVP tem-se a desidratação da amostra com $T_{onset} = 45,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 80,9\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 33,5\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e degradação caracterizada por um evento endotérmico sutil e alargado com $T_{onset} = 335,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 360,9\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 61,2\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$).

O malaxado AF:HP- β -CD:SOL apresenta inicialmente perda de água com $T_{onset} = 40,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 80,9\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 75,4\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) e apresenta evento endotérmico, indicativo de degradação da amostra com $T_{onset} = 323,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{peak} = 355,9\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 111,4\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$). No rotaevaporado foi verificado a desidratação da amostra com $T_{onset} = 42,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 82,14$

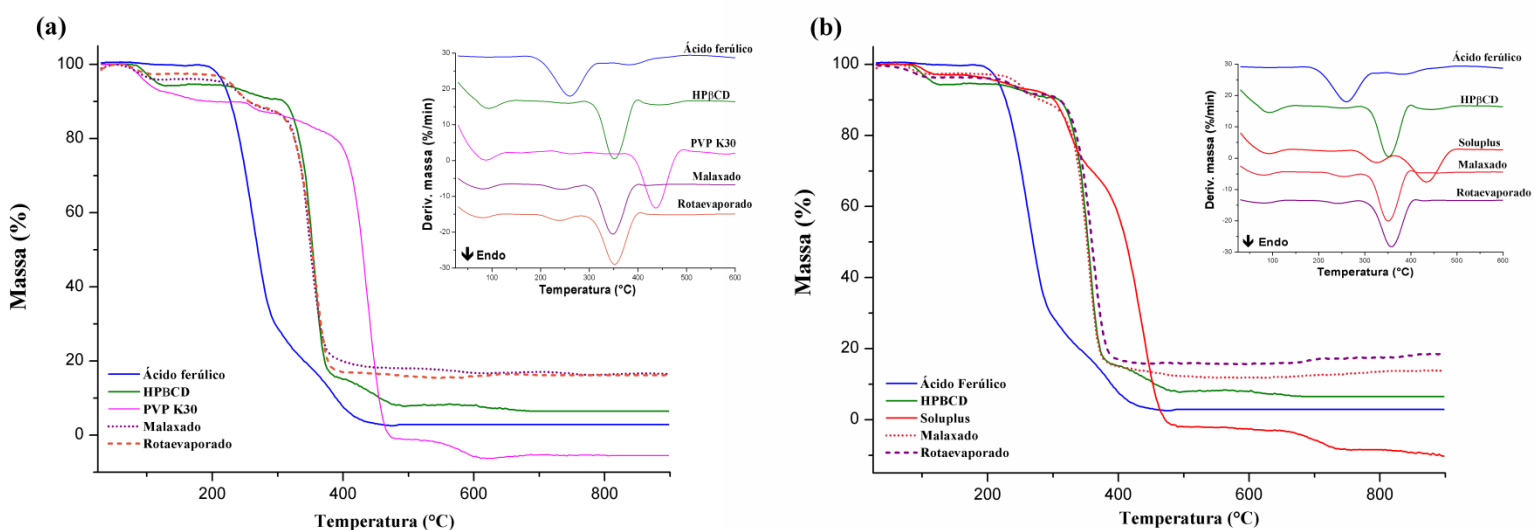
$J.g^{-1}$ e $T_{peak} = 80,1$ °C), seguido de um evento endotérmico característico de degradação com $T_{onset} = 330,1$ °C ($T_{peak} = 360,1$ °C; $\Delta H = 73,8$ $J.g^{-1}$).

O parâmetro normalmente utilizado para avaliar a complexação é o desaparecimento ou deslocamento do pico de fusão do fármaco (MARQUES; HADGRAFT; KELLAWAY, 1990). Em nenhuma curva DSC destes sistemas é possível visualizar o evento endotérmico que caracteriza a fusão e degradação do AF. Sugere-se que os sistemas obtidos podem ter proporcionado uma maior estabilidade térmica, que poderá ser confirmada através da análise de TG, bem como a amorfização do fármaco que será mais bem definida em análises subsequentes.

A TG tem sido amplamente empregada para caracterizar a formação de complexos de inclusão, pela comparação da temperatura de início de degradação da molécula hospede sozinha com o suposto complexo, partindo do princípio que a degradação do complexo ocorrerá em temperaturas mais elevadas, já que a molécula hospede está protegida pelos demais componentes do sistema (BARBOSA et al., 2014).

A Figura 37 apresenta as curvas termogravimétricas dos componentes isolados e dos complexos multicomponentes obtidos para cada polímero.

Figura 37. Curvas TG dos componentes isolados e complexos multicomponentes na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹: (a) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:Soluplus.



O comportamento das curvas foi verificado e as variações de perda de massa do evento que corresponde ao AF estão descritas na tabela 15. As curvas de TG/DTG mostraram que todos os perfis térmicos dos complexos multicomponentes apresentaram o evento principal de degradação do AF (175 – 296,5 °C), em temperaturas superiores ao do fármaco isolado, além disto, houve considerável redução do seu percentual de perda de massa nos complexos obtidos. Destacando-se as obtenções que continham Soluplus® em sua composição com etapa de decomposição correspondente ao AF, na faixa de temperatura entre 227,8-271,5 °C ($\Delta m = 5,7\%$) e 212,0 – 263,4 °C ($\Delta m = 4,2\%$) para o malaxado e rotaevaporado, respectivamente. De forma geral, estas análises indicaram que houve interação entre os componentes do sistema, concedendo aumento da estabilidade ao ativo.

Tabela 15. Análise termogravimétrica do AF e complexos multicomponentes na razão de aquecimento 10 °C.min¹.

Amostra	TG	
	ΔT (°C)	Δm (%)
Ácido ferúlico	175,0 – 296,5	81,5
Malaxado AF: HP- β -CD: PVP	212,9 – 284,9	7,5
Rotaevaporado AF: HP- β -CD: PVP	205,8 – 282,4	8,6
Malaxado AF: HP- β -CD: SOL	227,8 – 271,5	5,7
Rotaevaporado AF: HP- β -CD: SOL	212,0 – 263,4	4,2

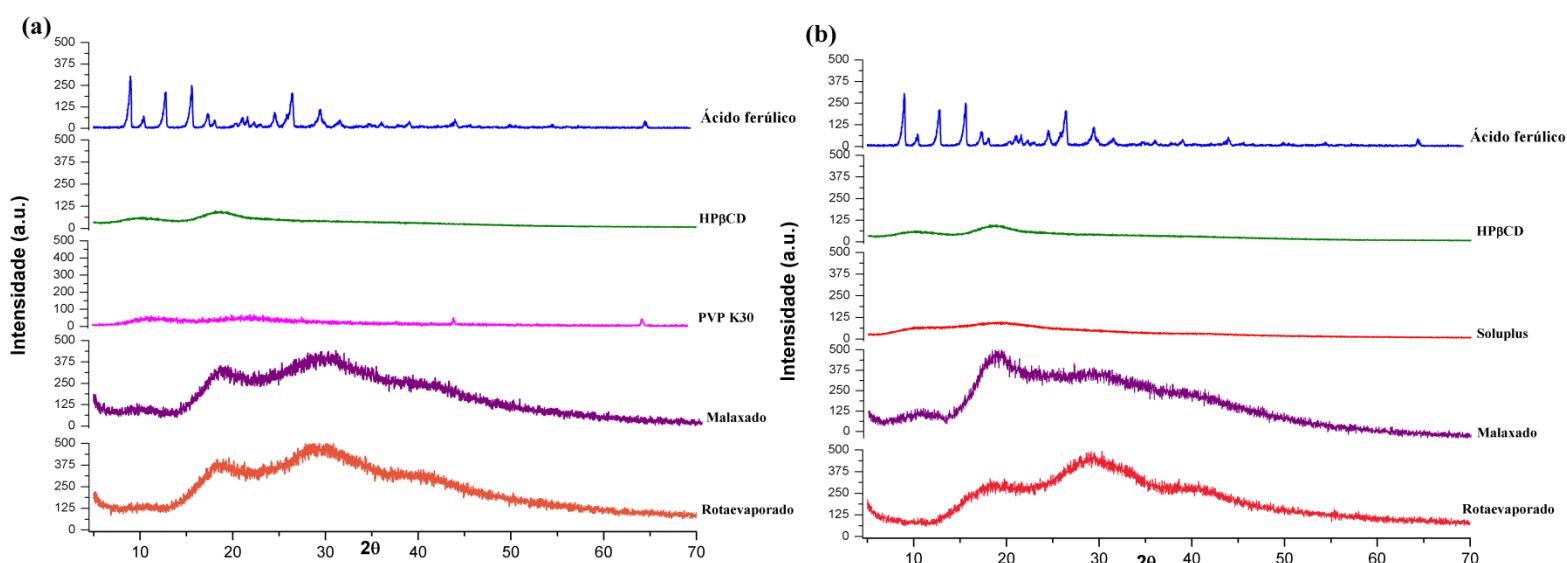
5.4.11.2 Difração de Raios X

A difração de raios X é uma das técnicas amplamente utilizadas para o desenvolvimento e análise de produtos farmacêuticos, sendo possível a partir desta a medição da cristalinidade de um material, através do gráfico que apresenta a relação entre a intensidade dos reflexos cristalinos e o ângulo de difração. Portanto, materiais cristalinos apresentam reflexos bem definidos e intensos, enquanto aqueles que não apresentam nenhuma ou baixa

intensidade são considerados substâncias amorfas (CHADHA; BHANDARI, 2014). A Figura 39 apresenta os difratogramas dos componentes isolados e dos complexos multicomponentes obtidos para cada polímero.

Figura 39. Difratogramas dos componentes isolados e complexos multicomponentes:

(a) Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP (b) Complexos obtidos com AF: HP- β -CD:Soluplus.



O AF apresentou um perfil cristalino característico com reflexões de alta intensidade a $9,1^\circ$, $12,8^\circ$, $15,7^\circ$, $17,3^\circ$, $26,4^\circ$, $29,3^\circ$ e algumas outras reflexões de menor intensidade. Este padrão do pó corrobora com o perfil cristalino descrito por Wang et al., 2011. Além disso, os difratogramas têm o mesmo perfil simulado de um estudo de cristal único, relatado por Nethaji ; Pattabhi ; Desiraju, 1988. Em relação ao PVP K30 e o Soluplus[®], observa-se a presença de um padrão halo, que é característico de pós amorfos (DE FRANÇA et al., 2018; DA SILVA JÚNIOR et al., 2019).

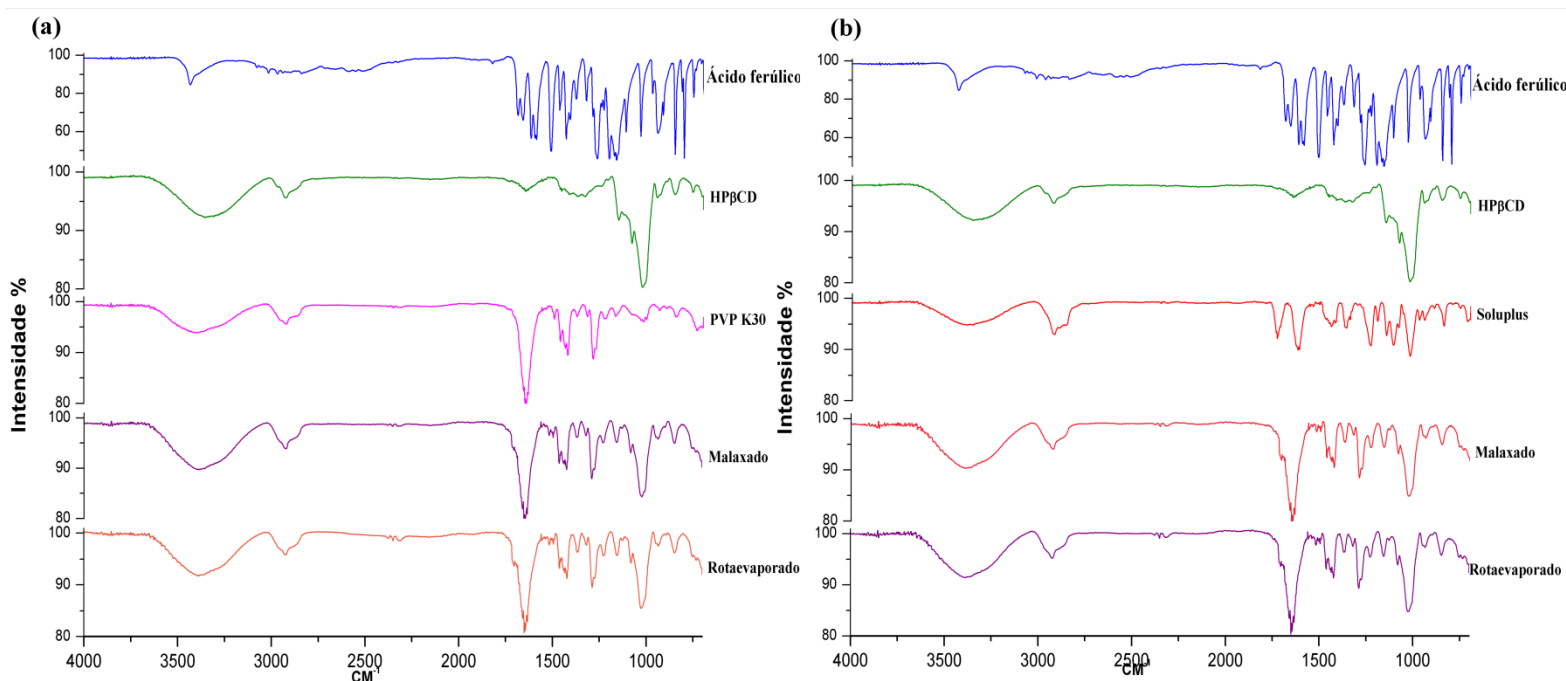
Através da comparação das reflexões características entre os componentes puros e os complexos obtidos, foi possível observar que nos complexos multicomponentes houve o desaparecimento das reflexões. Este fenômeno pode indicar a complexação ou passagem do estado cristalino para amorfo decorrente do processo empregado na obtenção do material (RIBEIRO et al., 2003; ZHANG, et al., 2007). Assim, entende-se que os componentes utilizados e os métodos de obtenção (malaxagem e rotaevaporação) aplicados para o

desenvolvimento dos complexos promoveram um processo de amorfização do fármaco, não ocorrendo diferenças significativas entre os sistemas obtidos.

5.4.11.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

O FTIR é uma ferramenta útil para confirmar a formação de complexos de inclusão entre moléculas hóspedes e CD. A Figura 40 apresenta os espectros dos componentes isolados e seus respectivos sistemas multicomponentes.

Figura 40. Espectros infravermelho dos componentes isolados e complexos multicomponentes: **(a)** Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:PVP **(b)** Complexos obtidos com AF:HP- β -CD:Soluplus.



O espectro FTIR do AF,exibe uma banda de absorção em 3430 cm^{-1} correspondente à deformação axial do grupo hidroxila (O-H) e outra banda em 2838 cm^{-1} inerente a vibração de alongamento do grupo metil C-H. Em 1687 e 1660 cm^{-1} , tem-se uma banda atribuída a carbonila (C=O) conjugada ao anel aromático. As regiões em 1619 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} , 1202 cm^{-1} são características do anel aromático. Em 1464 cm^{-1} a banda refere-se

a deformações em C – H e vibrações do anel aromático. Na região de 1266 cm^{-1} há vibração de alongamento assimétrico (C – O – C). Em 1160 cm^{-1} a banda corresponde ao grupamento carbonila. Já em 850 cm^{-1} e 801 cm^{-1} refere-se aos dois átomos de hidrogênio adjacentes ao anel fenil (CELEBIOGLU; UYAR, 2020; OLGA; STYLIANI; IOANNIS, 2015; WANG et al., 2011).

No caso da HP- β -CD existem regiões proeminentes localizadas em torno de $3324\text{--}3355\text{ cm}^{-1}$, 2930 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} correspondentes às vibrações de alongamento -OH, alongamento do C-H, flexão O-H e flexão -CH₃ da CD, respectivamente. As outras bandas de absorção principais observadas em 1028 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1180 cm^{-1} correspondem a vibrações de alongamento C – C, C – O acoplado e alongamento da ponte glicosídica C – O – C antissimétrica da CD (WANG et al., 2011; YUAN; LIU; LIU, 2015; PINHEIRO et al., 2017; DA SILVA JÚNIOR et al., 2019; DE ALMEIDA MAGALHÃES et al., 2020).

Com relação aos polímeros tem-se no o espectro do PVP K30 as principais bandas em 2931 cm^{-1} pelo estiramento C–H) e em 1645 cm^{-1} inerente ao estiramento C=O. Em 3415 cm^{-1} também pode ser visualizada uma larga banda atribuída à presença de água, confirmando o pico endotérmico detectado na análise por DSC (SILVA JÚNIOR et al., 2017; FRANÇA et al., 2018). Já para o Soluplus[®] há o alongamento inter-molecular ligado a hidrogênio –OH em 3383 cm^{-1} , alongamento de carbonil de éster em 1361 cm^{-1} , alongamento C = O para amida terciária em 1622 cm^{-1} , alongamento C – O para éster em 1233 e 1.110 cm^{-1} , assim como para CH₃ em 1.432 cm^{-1} (THAKRAL et al., 2012).

Observa-se que os espectros das obtenções de maneira geral, são muito semelhantes ao espectro da HP- β -CD e as bandas de absorção do AF e polímeros estão quase ocultas pelas bandas amplas, intensas da CD, substancialmente devido ao maior conteúdo de CD nas amostras. Os espectros das obtenções quando expandidos, indicaram várias bandas do AF com perfil atenuado e alterado quando comparado ao espectro do AF puro. A atenuação, desaparecimento, deslocamentos ou alargamento das regiões características de moléculas em espectros de FTIR sugerem a interação entre CD e moléculas convidadas pela inclusão da mesma dentro da cavidade (MURA, 2015; NARAYANAN et al., 2017; CELEBIOGLU; UYAR, 2020;).

Detectou-se que as regiões características do anel aromático do AF em 1619 cm^{-1} , 1511 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} , 1202 cm^{-1} , mudaram para 1632 cm^{-1} , 1516 cm^{-1} , 1428 cm^{-1} , respectivamente. As bandas 1591 cm^{-1} e 1202 cm^{-1} ainda relacionados ao anel aromático

desapareceram após a complexação. A banda em 1266 cm^{-1} é deslocada pra 1272 cm^{-1} . A região localizada entre 1687 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} foi convertida em uma única banda entre 1638 e 1655 cm^{-1} . A banda em 1266 cm^{-1} foi deslocada pra 1272 cm^{-1} . A banda larga da HP- β -CD em torno de 3324 e 3355 cm^{-1} unificou-se a banda do AF em 3430 cm^{-1} .

Diante destes resultados, podemos sugerir que houve a formação do complexo de inclusão entre o AF, ciclodextrina e polímeros. De maneira que, o anel aromático do AF foi inserido na cavidade da CD durante a complexação. Estudos semelhantes descrevem em diferentes tipos de CDs e seus derivados que a molécula do AF pode ser encapsulada no interior da cavidade através de sua parte hidrofóbica correspondente ao anel benzeno, já a fração de etileno e os grupos mais polares do AF estão próximos à borda mais larga da CD ou expostos fora da cavidade (CELEBIOGLU; UYAR, 2020; HSU et al., 2019; OLGA; STYLIANI; IOANNIS, 2015; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

5.4.12 Estabilidade oxidativa

Considerando a instabilidade do AF, principalmente frente a condições de oxidação e tomando como base estudos de estabilidade forçada por Ferreira, 2018 e Nadal et al., 2015 com o AF, foi realizado a avaliação da estabilidade dos complexos multicomponentes em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% utilizando espectroscopia UV-Vis. Esta avaliação foi realizada levando em consideração a intensidade das alterações no perfil espectral das amostras decorrentes da oxidação do complexo quando submetido ao H_2O_2 . Dessa maneira, foi realizado o acompanhamento do AF e dos complexos durante 24 horas ao abrigo da luz conforme demonstrado na Figura 41 e 42.

As amostras foram analisadas considerando as regiões de maior intensidade no espectro UV-Vis, sendo assim foi realizado o acompanhamento do comprimento de onda característicos do AF em 319 nm e 296 nm, que são referentes à transição da ligação dupla e a transição do grupo fenólico, respectivamente.

Figura 41. Perfil espectral das amostras em solução de H_2O_2 a 3% durante 24 hrs em espectrofotômetro UV-Vis entre 200 e 400 nm.

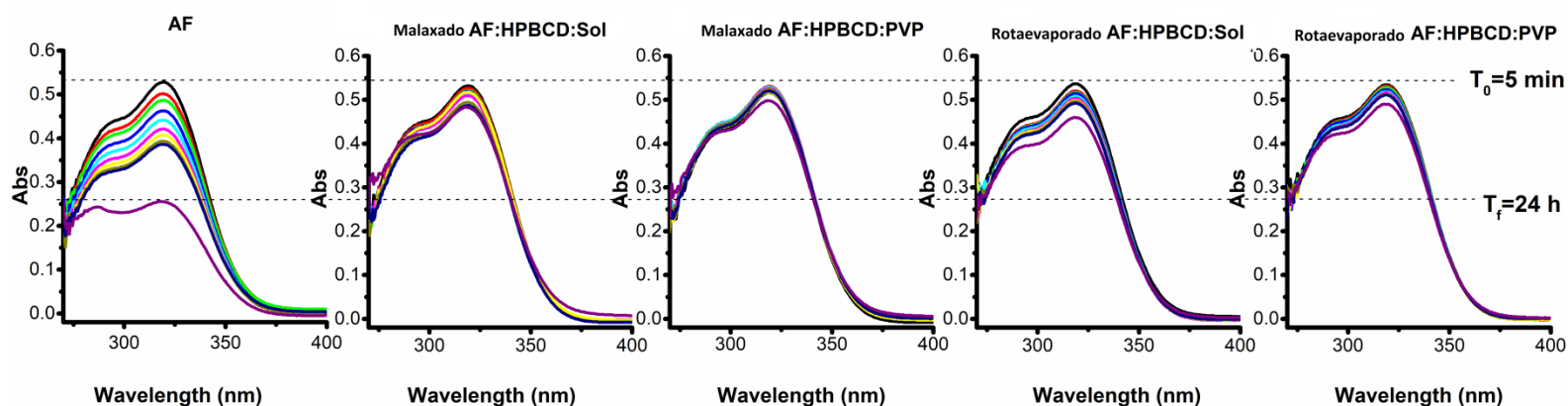
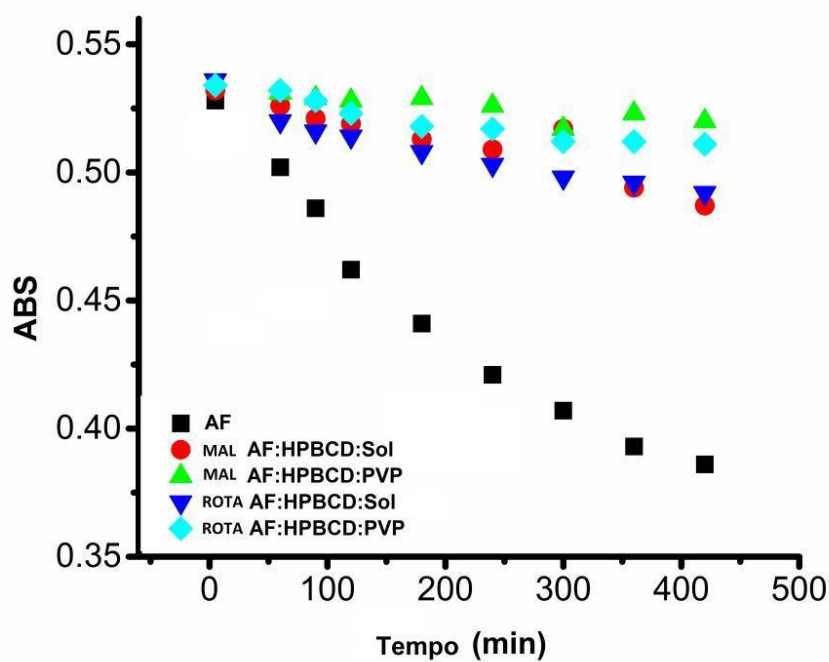


Figura 42. Representação esquemática do perfil de degradação do AF nas amostras ao longo do tempo de 8 h, acompanhando a redução na absorbância no comprimento de onda em 319 nm como parâmetro de degradação.



Analisando o AF puro e complexos frente ao H_2O_2 verificou-se, conforme apresentado nas Figuras 41 e 42, que ao longo do tempo em que as amostras são expostas a solução, ocorre diminuição da absorvância, indicando assim o consumo da amostra ao longo do tempo, com maior intensidade para o AF puro.

Diante disto, podemos observar que para o AF puro após 24 horas houve degradação de 51,65% da concentração inicial, já para os sistemas a degradação ocorreu na média de 8,96%. De forma que a degradação ocorreu na seguinte dinâmica: rotaevaporado AF:HP- β -CD:SOL (13,34%) > malaxado AF:HP- β -CD:SOL (9,17%) > rotaevaporado AF:HP- β -CD:PVP (7,5%) > malaxado AF:HP- β -CD:PVP (5,84%). Com destaque para o complexo multicomponente obtido pelo método de malaxagem AF:HP- β -CD:PVP que se degradou em apenas 5,84% após 24 horas de exposição da amostra ao peróxido de hidrogênio.

5.4.13 Atividade antioxidante *in vitro*

A produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio no organismo vivo está associada a diversas doenças como câncer, arteriosclerose, inflamações, disfunções cerebrais, diabetes, doenças neurodegenerativas, bem como envelhecimento precoce (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017). Portanto, ensaios antioxidantes *in vitro* são importantes para definir como uma substância é capaz de atuar inibindo reações de oxidação (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

As propriedades antioxidantes de uma molécula são reconhecidas através de três mecanismos principais, compreendidos como transferência do átomo de hidrogênio, transferência de elétron e quelação de metais de transição (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011). De forma que, as reações oxidativas podem ocorrer como uma reação em cadeia envolvida em iniciação, propagação e finalização, podendo a molécula antioxidante atuar em um ou mais estágios (PISOSCHI; POP, 2015). Assim, recomenda-se realizar a avaliação da atividade antioxidante de uma matéria-prima frente a diferentes metodologias, para que os mecanismos sejam definidos.

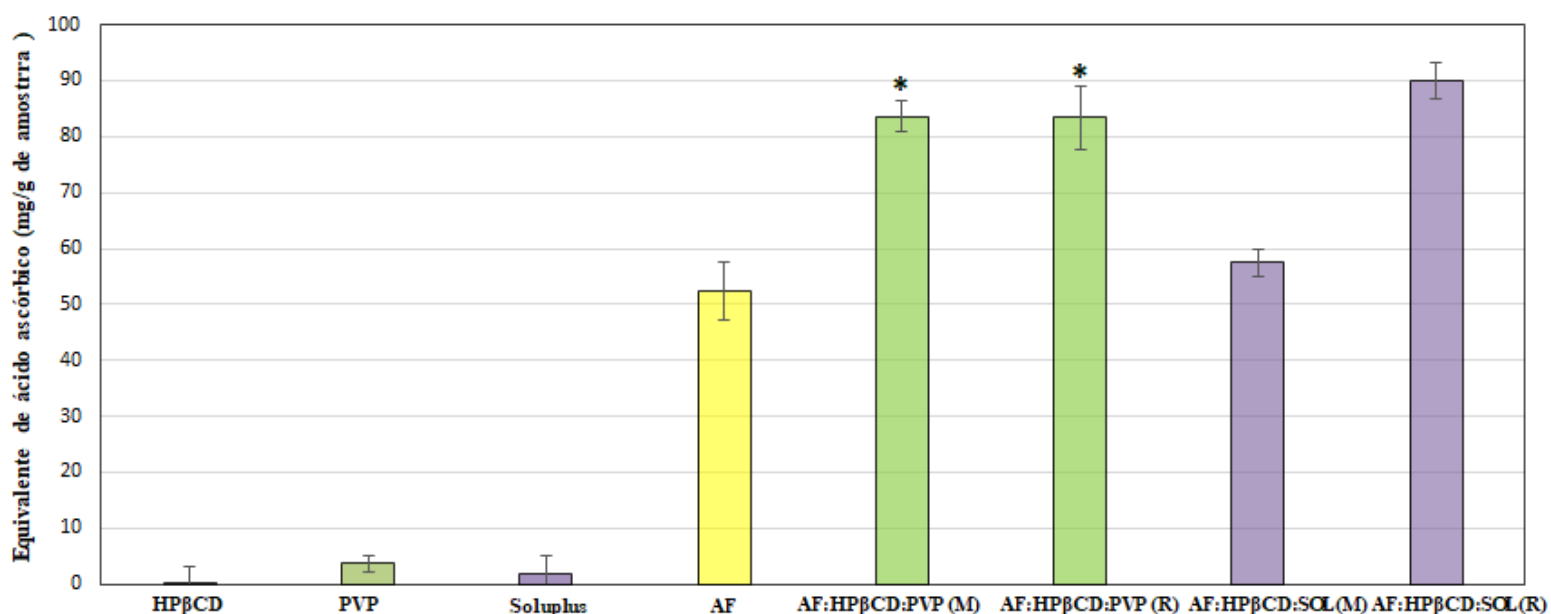
Portanto, objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante do AF e complexos multicomponentes para verificar se os complexos podem manter ou aperfeiçoar a atividade antioxidante do AF. Os métodos utilizados avaliaram a etapa de iniciação compreendendo a capacidade antioxidante total (CAT) e poder redutor, a etapa de propagação que inclui

atividade quelante de íons ferro (Fe^{2+}) e íons cobre (Cu^{2+}), e por fim a etapa de finalização avaliando-se a capacidade de sequestro do radical hidroxila (OH^\cdot).

5.4.13.1 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

O teste de capacidade antioxidante total avalia a capacidade das amostras doarem elétrons e tem seus resultados expressos como equivalente de ácido ascórbico, conforme apresentado na Figura 43.

Figura 43. Capacidade antioxidante total do AF, complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado (M) ou rotaevaporação (R).



(*) Amostras sem diferença significativa ($p > 0,05$).

Verifica-se que todos os complexos multicomponentes apresentam maior atividade que o AF puro, CD e polímeros utilizados nas obtenções. De maneira, que o AF apresentou 52,45 gramas de equivalente de ácido ascórbico. Já para as obtenções por malaxagem e rotaevaporação AF:HP- β -CD:PVP tem-se 83,65 e 83,38 gramas de equivalente de ácido ascórbico, respectivamente. Nas amostras por malaxagem e rotaevaporação AF:HP- β -CD:SOL constatou-se 57,42 e 90,03 gramas de equivalente de ácido ascórbico, respectivamente. Diante disto, é possível observar que todos os complexos se evidenciaram, com destaque para os complexos AF:HP- β -CD:PVP (malaxado e rotaevaporado) sem

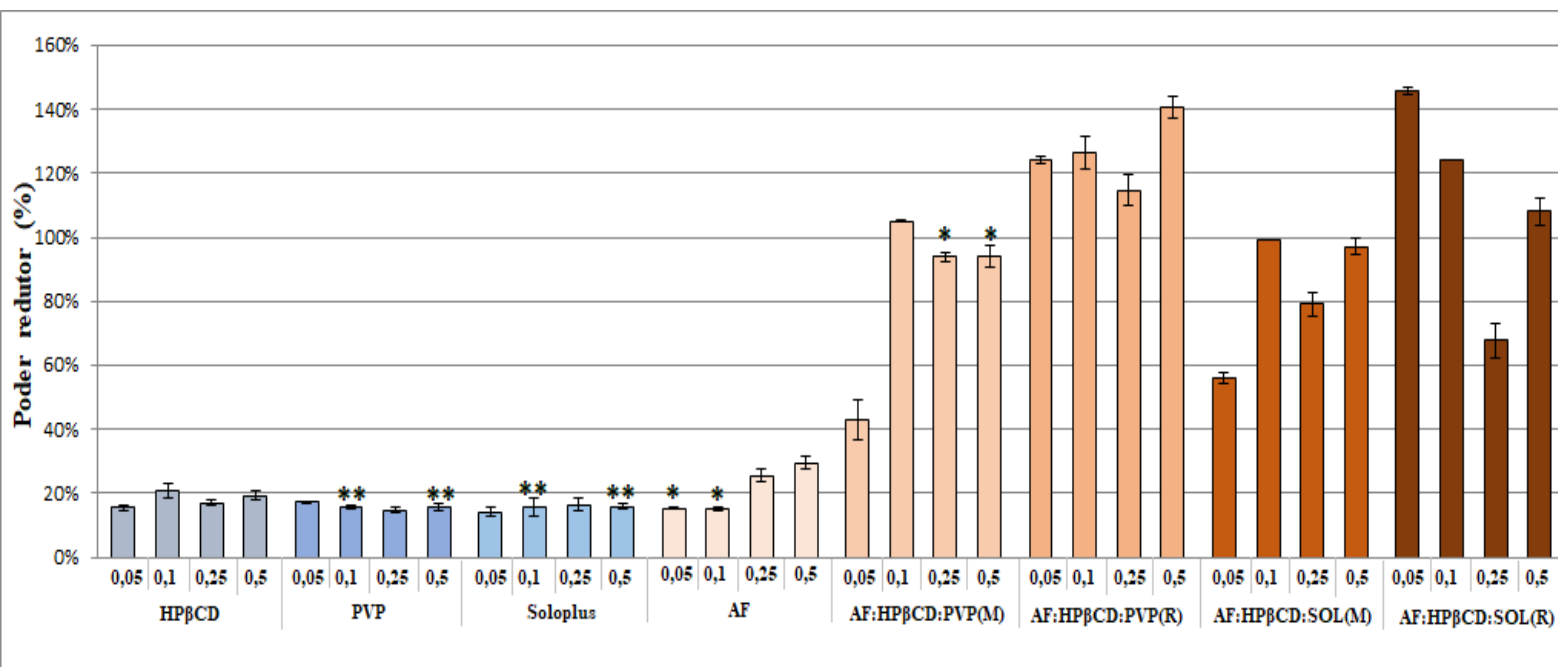
diferença significativa ($p > 0,05$) e AF:HP- β -CD:SOL (rotaevaporado) que apresentou o melhor desempenho neste ensaio.

Segundo Itagaki et al., 2009 a transferência de prótons do grupo fenólico do AF para os radicais ativos é o mecanismo principal para sua atividade antioxidante. De acordo com Natella et al., 1999 a presença do grupo CH=CH-COOH aumenta a atividade do AF por participar da estabilização dos radicais fenoxila por ressonância. A capacidade antioxidante foi aumentada para todos complexos multicomponentes, o que provavelmente está relacionado à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre a molécula hóspede e a CD (ZHANG et al., 2009; CHAO et al., 2017).

5.4.13.2 Poder redutor

O ensaio poder redutor baseia-se nos mesmos princípios do ensaio discutido no item anterior, estando relacionado à capacidade das moléculas doarem hidrogênios para quebrar a cadeia dos radicais livres, bem como reagir com percussores de peróxidos e assim prevenir sua formação. O resultado é expresso em percentual de poder redutor (ZHAO, H. et al., 2017). As amostras foram testadas nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5 mg/mL. O AF exibiu atividade de poder redutor em 15,2, 15,2, 25,5 e 29,6%, respectivamente, de forma que nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg/mL não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$). A Figura 44 apresenta em gráfico de barras os resultados dos componentes isolados e complexo multicomponentes.

Figura 44. Poder redutor do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado (M) ou rotaevaporação (R).



(*) Sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre diferentes concentrações da mesma amostra; (**) Sem diferença significativa na mesma concentração em amostras diferentes

A HP- β -CD apresentou atividade que variou de 15,5 a 20,9%, no PVP K30 ocorreu de 14,81 a 17,18% e para o Soluplus[®] observou-se atividade entre 14,2 a 16,3% nas concentrações testadas. A atividade de redução exibiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre concentrações da mesma amostra. Exceto, nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL onde o PVPK30 e Soluplus[®] não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Estes resultados indicam que estes componentes podem atuar potencializando a atividade antioxidante do AF.

Todos os complexos multicomponentes apresentaram percentual de poder redutor significativamente maior que o AF puro em todas as concentrações testadas. Vale ressaltar que para o complexo AF:HP- β -CD:PVP obtido por malaxagem não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$) no seu percentual de poder redutor nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL.

Neste ensaio destacam-se os complexos obtidos pelo método de rotaevaporação com destaque para o sistema AF:HP- β -CD:SOL que apresentou na menor concentração testada poder redutor de 146%, seguido do sistema AF:HP- β -CD:PVP obtido pelo mesmo método, que na concentração de 0,5 mg/mL apresentou atividade em 141%. Diante destes resultados,

observa-se que os sistemas pontencializaram a atividade antioxidante do AF de maneira que o possível mecanismo desta contribuição pode estar atrelado a mesma discussão abordada ao método anterior, uma vez que ele atua no mesmo processo que o CAT.

A capacidade de eliminar os radicais livres é uma característica proeminente dos compostos fenólicos. Além disso, evidências consideráveis demonstram que os ácidos fenólicos quando associados a polissacarídeos (precursores dos oligossacarídeos que compõem a CDs) exibem potencial antioxidante significativo (CURCIO et al., 2009; XIE et al., 2014; LIU et al., 2017; CAI et al., 2019).

5.4.13.3 Quelação de íons ferro e cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{2+})

Moléculas com capacidade quelante tem ação significativa nos processos antioxidantes, devido a capacidade de remover íons metálicos que podem participar na produção de radicais hidroxilas. Minimizando assim a produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2012). A tabela 16 compila os resultados do percentual de quelação de íons Cu^{2+} e ferro Fe^{2+} para o AF e os complexos multicomponentes obtidos.

Tabela 16. Atividade antioxidante para quelação de ferro e cobre do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado e rotaevaporação.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Quelação de Cu ²⁺ (%)	Quelação de Fe ²⁺ (%)
Ácido ferúlico	0,05	16,2 ± 3,5	18,5 ± 4,2
	0,1	23,1 ± 2,8	22,5 ± 2,3
	0,25	34,6 ± 2,9	34,5 ± 3,7
	0,5	51,4 ± 2,9	11,5 ± 4,2
AF:HP-β-CD:PVP (malaxado)	0,05	11,2 ± 3,3	25,1 ± 3,5
	0,1	19,6 ± 1,4	22,8 ± 0,53
	0,25	44,0 ± 3,0	19,6 ± 3,9
	0,5	55,8 ± 1,7	20,3 ± 2,9
AF:HP-β-CD:PVP (rotaevaporado)	0,05	23,0 ± 3,6	41,6 ± 4,6
	0,1	29,3 ± 1,1	42,0 ± 1,8
	0,25	41,9 ± 2,1	29,0 ± 2,3
	0,5	53,8 ± 0,9	30,5 ± 1,8
AF:HP-β-CD:SOL (malaxado)	0,05	11,2 ± 1,7	17,2 ± 2,2
	0,1	19,6 ± 2,4	14,0 ± 4,3
	0,25	44,0 ± 1,5	22,4 ± 1,2
	0,5	55,8 ± 1,9	32,4 ± 1,4
AF:HP-β-CD:SOL (rotaevaporado)	0,05	23,0 ± 1,3	23,7 ± 2,11
	0,1	25,8 ± 1,7	29,7 ± 0,21
	0,25	41,3 ± 1,7	27,4 ± 1,70
	0,5	56,4 ± 1,2	26,2 ± 1,17

Os polímeros e as CDs não apresentaram atividade significativa neste ensaio, portanto, não estão presentes na tabela.

Para o ensaio de quelação de íons Cu²⁺ observou-se uma atividade dose dependente, onde o percentual de quelação aumentou proporcionalmente a concentração testada. Embora, a análise estatística indique que ocorreram diferenças significativas entre o AF e os complexos, é importante destacar que os aumentos foram sutis ao compararmos com as demais atividades antioxidantes avaliadas. De modo que, a otimização da atividade ocorreu com maior intensidade nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL com destaque para o sistema AF:HP- β -CD:PVP (rotaevaporado).

Segundo Sucupira et al., 2012 compostos fenólicos quelam metais de transição, como o Fe^{2+} . Diante disso, observou-se atividade para todas as amostras com maior otimização no complexo rotaevaporado AF:HP- β -CD:PVP. Entretanto, nenhum sistema atingiu 50% ou mais da quelação dos íons Fe^{2+} . Neste ensaio foi constatado que em todas as amostras, com exceção do complexo obtido por malaxagem AF:HP- β -CD:SOL, um efeito pró-oxidante, caracterizado pela redução da atividade antioxidante em concentrações mais elevadas da amostra.

A interação de constituintes fenólicos com espécies de radicais livres em diferentes fases fornece diversas perspectivas sobre suas propriedades antioxidantes / pró-oxidantes. Vários efeitos biológicos podem ser obtidos no sistema *in vitro* em uma ampla faixa de níveis de concentração dos fenóis, dependendo do ensaio específico ou sistema modelo. O AF pode exibir atividade pró-oxidante em certos ensaios. Onde, acima de um limite de concentração os compostos passam a se comportar como pró-oxidantes. Os atributos estruturais dos ácidos fenólicos que conferem atividade antioxidante também podem ser responsáveis pela atividade pró-oxidante na presença de um metal de transição. O experimento deixa claro que esses compostos passam a se comportar como pró-oxidantes a partir das concentrações onde assumem propriedades redutoras de ferro (MAURYA; DEVASAGAYAM, 2010).

Diante disto, os complexos apresentaram aumento do potencial de ação antioxidante preventiva na fase de propagação, impedindo a formação de radicais livres.

5.4.13.4 Sequestro de Radical Hidroxila (OH^\cdot)

A formação de radicais hidroxila está relacionado à metais de transição. Na ausência de metais como ferro e cobre, o peróxido de hidrogênio está razoavelmente estável. A formação do radical hidroxila ocorre quando há perturbação na homeostasia desses metais (ARUOMA, 1998; ZHANG et al., 2012). O radical hidroxila (OH^\cdot) é o mais reativo quando comparado aos demais radicais de oxigênio, interagindo com diversas moléculas biológicas, provocando a formação de compostos tóxicos e levando ao dano celular (ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2017).

O mecanismo de ação do sequestro do radical OH^\cdot pode acontecer através de reações distintas, como inserção do radical à molécula através de ligações duplas, transferência de elétrons ou liberação do hidrogênio, conseqüentemente com formação de água. A tabela 17 descreve os valores em percentual da atividade investigada.

Tabela 17. Atividade antioxidante para sequestro do radical hidroxila do AF e complexos AF:HP- β -CD:PVP e AF:HP- β -CD:SOL, preparados por malaxado ou rotaevaporação.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Sequestro OH ⁻ (%)
HP-β-CD	0,05	-
	0,1	-
	0,25	-
	0,5	75,1 \pm 1,2
PVP	0,05	89,3 \pm 4,6
	0,1	69,7 \pm 4,0
	0,25	105,7 \pm 1,4
	0,5	91,0 \pm 2,8
Ácido ferúlico	0,05	-
	0,1	26,7 \pm 3,8
	0,25	63,6 \pm 1,0
	0,5	95,0 \pm 1,8
AF:HP-β-CD:PVP (malaxado)	0,05	81,1 \pm 4,0
	0,1	21,6 \pm 4,6
	0,25	67,3 \pm 3,6
	0,5	72,8 \pm 2,4
AF:HP-β-CD:SOL (malaxado)	0,05	-
	0,1	17,1 \pm 2,2
	0,25	45,5 \pm 4,0
	0,5	63,0 \pm 4,4

O Soluplus[®] e as obtenções por rotaevaporação não estão presentes na tabela, pois não apresentaram atividade significativa no sequestro do radical OH⁻.

É possível observar que a HP- β -CD apresentou atividade antioxidante somente na maior concentração de 0,5 mg/mL. Acredita-se que os radicais podem interagir com oxigênio da CDs favorecendo a sua estabilidade. Segundo Jullian et al., 2008 pode ocorrer que os radicais livres se tornem efetivamente estáveis na cavidade de CDs. Uma segunda hipótese, está relacionada à capacidade de desprotonação das CDs, caso o meio apresente-se básico

(MORAES et al., 2007), permitindo que átomos de hidrogênio neutralizem os radicais. Sugere-se que estes radicais são ainda mais neutralizados pelo maior número de substituintes hidroxílicos conforme encontrado na estrutura da HP- β -CD (LI, Q. et al., 2018).

O PVP K30 demonstrou elevado percentual de atividade chegando a 105,7% na concentração de 0,25 mg/mL. Este polímero é considerado uma substância com determinado efeito antioxidante, que pode ser devido à presença de grupos carbonil e ligações éster na sua composição molecular (JAVED et al., 2017). Diante disto, é possível que contribua de forma sinérgica junto a atividade antioxidante do AF

No AF observou-se que sua atividade foi dose dependente, de modo que na menor concentração não houve reação antioxidante. O complexo obtido por malaxagem AF:HP- β -CD:PVP destacou-se significativamente, apresentando na concentração de 0,05 mg/mL um percentual 81,1 % para sequestro do radical OH \cdot . O complexo por malaxagem AF:HP- β -CD:SOL não se destacou nesta atividade, de modo que não houve otimização quando comparado ao AF isolado. Estes resultados, demonstram que no complexo malaxado AF:HP- β -CD:PVP houve um possível sinergismo entre a capacidade antioxidante do AF e os componentes utilizados para esta otimização, principalmente o polímero PVP K30 .

O encapsulamento de substâncias fenólicas pode afetar sua atividade antioxidante dependendo da orientação das porções que são responsáveis por extinguir radicais livres, na cavidade da CD e na força da interação fenol - ciclodextrina. Desse modo, Anselmi et al., 2008 relatam que se um fenol for orientado de forma que os grupos hidroxila sejam protegidos dentro da cavidade, sua atividade antioxidante é reduzida em proporção à força da interação, enquanto que se os grupos hidroxila permanecerem fora da cavidade da CD nenhum efeito em sua atividade antioxidante será alterado. Por outro lado, foi relatado que um aumento da atividade antioxidante poderia ser devido à estabilização do radical na cavidade da CD. Em nosso caso, o impacto da encapsulação do ativo resultou de maneira geral no aumento atividade antioxidante do AF.

Zhang et al., 2009, com base em RMN e técnicas de modelagem molecular, relataram que a maioria dos grupos polares da molécula (resíduos carboxílicos, fenólicos e metoxi) são expostos fora ou próximo a borda da cavidade. Portanto, a inclusão do AF não deve proibir sua atividade antioxidante. O aumento na atividade antioxidante, também pode estar atrelado a quebra da ligação de hidrogênio intramolecular presente no AF devido ao encapsulamento, permitindo que atue de forma mais eficiente como um antioxidante (GIACOMELLI et al.,

2004; STRAŽIŠAR; ANDRENŠEK; ŠMIDOVNIK, 2008; OLGA; STYLIANI; IOANNIS, 2015).

6. CONCLUSÃO

As técnicas térmicas e microscópicas utilizadas para a caracterização das membranas estudadas foram bem sucedidas e permitiram demonstrar a efetiva ocorrência de impregnação da solução lipídica na malha polimérica da membrana. Onde, após 15 dias de impregnação, as membranas apresentaram menor interação com esta solução.

As formulações apresentaram-se estáveis na condição de temperatura a 4°C e os resultados da liberação *in vitro* utilizando a membrana otimizada sugerem que esta pode ser aplicada como uma membrana acessível e simples. Não apenas para caracterizar formulações tópicas, mas também para avaliar a liberação *in vitro* de substâncias ativas nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos medicamentos.

Com relação ao desenvolvimento dos sistemas multicomponentes, foram selecionados a hidroxipropil- β - ciclodextrina na razão molar de 1:1 e os polímeros PVP K30 e Soluplus[®] na concentração de 0,4%. Através das técnicas de caracterização (DSC, TG, DR-X, FTIR e MEV) foi possível observar que a CD e os polímeros selecionados possuem alto potencial para serem empregados em sistemas multicomponentes. Uma vez que aumentaram a estabilidade do AF frente a altas temperaturas, como também auxiliaram na transição no estado cristalino do fármaco para amorfo.

As técnicas de obtenção dos sistemas mostraram-se adequadas e com alto percentual de incorporação do ativo. Destacando-se o método de obtenção por malaxagem, que apresentou rendimento consideravelmente maior quando comparado ao método por rotaevaporação.

Para a estabilidade oxidativa dos complexos frente ao H₂O₂ a 3% verificou-se, que os componentes do sistema conferiram significativa estabilidade para o AF, de maneira que se destacou o sistema obtido através do método de malaxagem AF:HP- β -CD:PVP com apenas 5,84% de degradação da concentração inicial após 24 horas de experimento.

Na atividade antioxidante, analisada através de diferentes ensaios *in vitro*, os complexos multicomponentes conduziram a potencialização da atividade antioxidante do AF. Com destaque para os sistemas que continham em sua constituição o PVP K30.

Diante destes resultados, podemos constatar a obtenção de um novo insumo com ácido ferúlico, patenteado e registrado como Cicloferulic[®], que apresenta melhores propriedades físico-químicas e antioxidantes, fornecendo subsídios inovadores para que as indústrias farmacêuticas e cosméticas possam explorar seu potencial.

Expõem-se, perspectivas em realizar estudos cinéticos para avaliar com precisão a estabilidade da impregnação lipídica na membrana, bem como estudos de correlação *in vitro/in vivo* para garantir maior confiabilidade e predição da resposta biológica para a membrana. Além, disto realizar a incorporação dos complexos multicomponentes nas formulações gel e gel-creme propostas, avaliando-se a estabilidade destas formulações e a liberação *in vitro* utilizando a membrana otimizada.

REFERÊNCIAS

- AITIPAMULA, S.; DAS, S. Cocrystal formulations: A case study of topical formulations consisting of ferulic acid cocrystals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 149, p. 95–104, 2020.
- AKHTAR, N. Vesicles: A Recently Developed Novel Carrier for Enhanced Topical Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, v. 11, n. 1, p. 87–97, 2014.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALBERTI, I. et al. In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *Journal of Controlled Release*, v. 71, n. 3, p. 319–327, 2001.
- ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 164, n. 1, p. 26–40, 2012.
- ALLEN JUNIOR, L. V. Manipulando emulsões. *Int. J. Pharm. Compounding*, v.6, n.3, p.168 -170, 172 -174,176, 2004.
- ALMEIDA, H. M.; CABRAL MARQUES, H. M. Physicochemical characterization of finasteride: PEG 6000 and finasteride: Kollidon K25 solid dispersions, and finasteride: β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 70, n. 3–4, p. 397–406, 2011.
- ALMEIDA, T. S. S. et al. Development and evaluation of antimicrobial and modulatory activity of inclusion complex of euterpe oleracea mart oil and β -cyclodextrin or HP- β -cyclodextrin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 3, 2020.
- ALOISIO, C.; G. DE OLIVEIRA, A.; LONGHI, M. Cyclodextrin and Meglumine-Based Microemulsions as a Poorly Water-Soluble Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, n. 9, p. 2703–2711, 2016.
- ALONSO, L.; CUESTA, P.; GILLILAND, S. E. Effect of β -cyclodextrin on trans Fats, CLA, PUFA and Phospholipids of Milk Fat. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 86, n. 4, p. 337–342, 2009.
- ALONSO, L.; FONTECHA, J.; CUESTA, P. Combined effect of *Lactobacillus acidophilus* and β -cyclodextrin on serum cholesterol in pigs. *British Journal of Nutrition*, v. 115, n. 1, p. 1–5, 2016.

ALVES, M. C. Permeação cutânea e vaginal de fármacos: rotas alternativas. 2018. Disponível em: <<http://e-journal.ua-jy.ac.id/14649/1/JURNAL.pdf>>. Acesso em: 15 de setembro de 2020.

AMMAR, H.O. et al. Implication of inclusion complexation of gimepiride in cyclodextrin-polymer systems on its dissolution, stability and therapeutic efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, n. 1–2, p. 53–57, 2006.

ANSELMINI, C. et al. Analytical characterization of a ferulic acid/ γ -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 4, p. 875–881, 2006.

_____. Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photostability and delivery: NMR and modeling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 4, p. 645–652, 2008.

ANVISA. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: Uma abordagem sobre os ensaios físico e químicos**. Brasília: Anvisa, 2007.

_____. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2004

ANWER, M. K. et al. Preparation of spray dried amorphous solid dispersion of diosmin in soluplus with improved hepato-renal protective activity: In vitro anti-oxidant and in-vivo safety studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, 2020.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.

ASBAHR, A. C. C. et al. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HP β CD and polymers: Preparation and characterization. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 2718–2723, 2009.

ATHUKORALA, Y. et al. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 184–191, 2006.

AZEVEDO, E. P.; MEYER, P.F., OLIVEIRA, G.M.C. **Associação entre radiofrequência e uso tópico de ácido ferúlico ou ácido hialurônico e sua utilização para o tratamento do cutâneo como anti-aging**, Brazil patent BR 102017016356-3. 2017.

BAPTISTA VEIGA, F. J.; PECORELLI, C. C. M. F.; DOS SANTOS RIBEIRO, L. S. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. 1 ed. Minerva Coimbra, 2006, p. 228.

BARBOSA, J.M. et al. **Composição cosmética e uso da mesma**. Brazil patent BR 102015003242-0 A2. 2016.

BARROS LIMA, Í. P. et al. Compatibility study of tretinoin with several pharmaceutical excipients by thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 733–747, 2015.

BAERT, B. et al. A new discriminative criterion for the development of franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 218–230, 2010.

BAIRAGI, U. et al. Preparation, Characterization, and *in vivo* Evaluation of Nano Formulations of Ferulic Acid in Diabetic Wound Healing. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 11, p. 1783–1796, 2018.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology *in vitro***, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2009.

BARBOSA, J. A. A. et al. Triethanolamine stabilization of methotrexate- β -cyclodextrin interactions in ternary complexes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 17077–17099, 2014.

BARONE, E.; CALABRESE, Æ. V. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, v.10, n.2, p. 97–108, 2009.

BARRY, B. W.; MEYER, M. C. The rheological properties of carbopol gels ii. oscillatory properties of carbopol gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2, p. 27–40, 1979.

BEMVINDO, C. S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BERBEN, P. et al. Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, n. April, p. 219–233, 2018.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.

BERMEJO, M. et al. PAMPA - A drug absorption *in vitro* model: 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. **European Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 21, n. 4, p. 429–441, 2004.

BEZERRA, G. S. N. et al. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1683–1691, 2017.

BLUME, G. **Novel carrier system for the transport of active substances into the skin**. Depositante: Gabriele Brume. US 2013 0011455A1. 2013

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1–2, p. 115–130, 2004.

BORG, D. C. Oxygen free radicals and tissue injury: a reference outline. **Oxygen free radicals in tissue damage**. New York: Springer Science + Business Media 1993.

BORTOLOMEAZZI, R. et al. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1481–1489, 2007.

BRAGA, S. S.; PAIS, J. Getting under the skin: Cyclodextrin inclusion for the controlled delivery of active substances to the dermis. In: GRUMEZESCU, A.M. **Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications**. Portugal: William Andrew Publishing, 2018, p 407-449.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm Wiss Technol**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645–666, 2007.

BURNS, E. M. et al. Differential Effects of Topical Vitamin E and C E Ferulic (R) Treatments on Ultraviolet Light B-Induced Cutaneous Tumor Development in Skh-1 Mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

BUSCHMANN, H.; ECKHARD SCHOLLMAYER. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, p. 185, 2002.

CAI, W. D. et al. Preparation, characterization, rheological and antioxidant properties of ferulic acid-grafted curdlan conjugates. **Food Chemistry**, v. 300, p. 125221, 2019.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 467–478, 2008.

CAO, Y.-J. et al. Ferulic acid inhibits H₂O₂ induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF- κ B pathway.

International Immunopharmacology, v. 28, n. 2, p. 1018–1025, 2015.

CARNEIRO, S. B. et al. Cyclodextrin – Drug Inclusion Complexes: *in Vivo* and *in Vitro* Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n.3, p. 1–23, 2019

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 78–99, 2007.

CASAGRANDE, R. et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 183–190, 2007.

CASSANO, R. et al. A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 232–238, 2009.

CAVALCANTI, A. L. M. et al. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 506, n. 1–2, p. 351–360, 2016.

CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Development of ferulic acid/cyclodextrin inclusion complex nanofibers for fast-dissolving drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 584, p. 119395, 2020.

CERQUEIRA, D. A.; CARVALHO, R. D. A. H-NMR Characterization of Cellulose Acetate Obtained from Sugarcane Bagasse. **Polímeros**, v. 20, p. 85–91, 2010.

CHADHA, R. et al. Valsartan inclusion by methyl- β -cyclodextrin: Thermodynamics, molecular modelling, Tween 80 effect and evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 300–309, 2014.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening–Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHALLA, R. et al. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. 329–357, 2005.

CHANDER J.V. et al. Transdermal drug delivery systems: Approaches and advancements in drug absorption through skin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 20, n. 1, p. 47–56, 2013.

CHAO, J. et al. Host-guest inclusion system of ferulic acid with p-Sulfonatocalix[n]arenes:

Preparation, characterization and antioxidant activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 579–584, 2017.

_____. Investigation of the inclusion behavior of ofloxacin with. **Journal of Molecular Liquids**, v. 200, p. 404–409, 2014.

CHEN, M.; LIU, X.; FAHR, A. Skin Delivery of Ferulic Acid from Different Vesicular Systems. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 6, n. 5, SI, p. 577–585, 2010.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos General aspects in transdermal systems of drugs release. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7–13, 2007.

CHOI, J.H.; HA, S.F., JAE, K.Y. **Cosmetic composition for preventing skin aging by heating**. Korea patent KR 20180073305. 2018.

CHRISTENSEN, J. M. et al. Hydrocortisone Diffusion Through Synthetic Membrane, Mouse Skin, and EpidermTM Cultured Skin. **Archives of Drug Information**, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

CIRRI, M. et al. Influence of the preparation method on the physical-chemical properties of ketoprofen-cyclodextrin-phosphatidylcholine ternary systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 690–694, 2009.

CONCEICAO, J. et al. Cyclodextrins as Drug Carriers in Pharmaceutical Technology: The State of the Art. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 13, p. 1405–1433, 2017.

CONCEIÇÃO, J. et al. Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 6, p. 1274–1284, 2018.

CONNORS, K. A.; MULSKI, M. J.; PAULSON, A. Solvent Effects on Chemical Processes. 2. Binding Constants of Methyl Orange with α -Cyclodextrin in Binary Aqueous-Organic Solvents. **Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 1794–1798, 1992.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofilicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 73–78, 2005.

CORTI, G. et al. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: I. Assessment of artificial membrane composition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 346–353, 2006

_____. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. v. 7, p. 354–362, 2005.

DUARTE, F. Í. et al. In vitro release studies of ferulic acid in semi-solid formulations with optimized synthetic membrane. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102106, 2020.

COUTEAU, D.; MATHALY, P. Purification of ferulic acid by adsorption after enzymic release from a sugar-beet pulp extract. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 237–252, 1997.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 15–19, 2010.

CURCIO, M. et al. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5933–5938, 2009.

CRUZ, A.C et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 385–389, 2011.

CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DAVID R. et al. Review of the Basic and Clinical Pharmacology of Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBECD). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 10, p. 2145–2157, 2006.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals : past , present and future. **Rev Drug Discov.** v. 3, n.12, p. 1023-1035, 2004.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430–1435, 2011.

DIANSYAH, A. et al. Novel Effects of a Single Administration of Ferulic Acid on the Regulation of Blood Pressure and the Hepatic Lipid Metabolic Profile in Stroke-Prone

Spontaneously Hypertensive Rats. **J Agric Food Chem.**v.56, n.8, p. 2825–2830, 2008.

DI CAGNO, M.; BIBI, H. A.; BAUER-BRANDL, A. New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 29–34, 2015.

DJEKIC, L. et al. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, n. 1–2, p. 25–33, 2012.

DORNELAS, C. B. et al. Preparação e avaliação reacional de nanocompósitos de PVP K-30 - Montmorilonita (natural e organicamente modificada) por difração de raios X. **Polimeros**, v. 18, n. 2, p. 187–192, 2008.

DOU, S. et al. An inclusion complex of thymol into β -cyclodextrin and its antifungal activity against *Geotrichum citri-aurantii*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 138, p. 31–36, 2018.

DU, L. et al. Physicochemical characteristics, hydroxycinnamic acids (Ferulic acid, p-coumaric acid) and their ratio, and in situ biodegradability: Comparison of genotypic differences among six barley varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4777–4783, 2009.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 4, p. 606–614, 2008.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4–5, p. 203–222, 2008.

ELIAS, P. M. The skin barrier as an innate immune element. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 1, p. 3–14, 2007.

ENGESLAND, A. New Applications of Phospholipid Vesicle-Based Permeation Assay: Permeation Model Mimicking Skin Barrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1588–1600, 2013.

ERDEMGIL, S. et al. Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol – water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. **Talanta**, v. 72, n.2, p. 489–496, 2007.

FANG-YU LI; DANE O. KILDSIG; ASHIM K. MITRA. Derivatives With Steroids Effects

of Chain Length. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 15, p. 1599–1612, 1992.

FERRARI, M.; ROCHA FILHO, P. A. da. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba o copaiba**. 1998. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FERREIRA, J. C. **Desenvolvimento e validação de um método por CLUE-DAD para identificação e quantificação do ácido ferúlico e seus produtos de degradação forçada**. 2018. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018

FRANÇA C. D. L. et al. Amorphous solid dispersions of hecogenin acetate using different polymers for enhancement of solubility and improvement of anti-hyperalgesic effect in neuropathic pain model in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 870–879, 2018.

FREITAS, Z. M. F. et al. Development and characterization of ketoconazole cream to treat superficial mycoses: In vitro permeation and in vivo retention studies. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 7, p. 1304–1310, 2015.

FERREIRA, E.B. et al. Characterization and Antiproliferative Activity of a Novel 2-Aminothiophene Derivative- β -Cyclodextrin Binary System. **Molecules**, v.23, 2018.

GABRIELE, D. et al. Food Hydrocolloids Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 619–628, 2009.

GALANO, A.; LEÓN-CARMONA, J. R.; ALVAREZ-IDABOY, J. R. Influence of the environment on the protective effects of guaiacol derivatives against oxidative stress: Mechanisms, kinetics, and relative antioxidant activity. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 24, p. 7129–7137, 2012.

GARCÍA-ZUBIRI, I.X., GONZÁLEZ-GAITANO, G., SÁNCHEZ, M., ISASI, J. R. FITIR study of dibenzofuran-2-carboxylic acid and its complexes with B-cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 33, p. 205–213, 2003.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 123–128, 2006.

GASPARRINI, M. et al. Strawberry-based cosmetic formulations protect human dermal

fibroblasts against UVA-induced damage. **Nutrients**, v. 9, n. 6, 2017.

GHOSH, S. et al. New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 41–55, 2017.

GIACOMELLI, C. et al. Antioxidant activity of phenolic and related compounds: A density functional theory study on the O-H bond dissociation enthalpy. **Redox Report**, v. 9, n. 5, p. 263–269, 2004.

GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International**, 2015.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. Ed. Pharma ed. [S.l.: s.n.], 2010.

GONTIJO, M. et al. Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 43-48, 2018.

GONZÁLEZ-MONDRAGÓN, E. et al. Thermodynamic analysis of ferulate complexation with cyclodextrins **Thermochemica Acta**, v. 634, p. 1–5, 2016.

GOODMAN, M.; BARRY, B. W. Lipid-protein-partitioning (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 29–40, 1989.

GÓRNAS, P. et al. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 190–196, 2009.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 435–448, 1992.

GRAF, J. Antioxidants and skin care: The essentials. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 1, p. 378–383, 2010.

GRATIERI, T. et al. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GREBOGI, I. H. et al. Binary and ternary inclusion complexes of dapsone in cyclodextrins and polymers: Preparation, characterization and evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, n. 1–4, p. 467–474, 2012.

GUEDES, F. de L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 3, p. 220–225, 2008.

GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, H.; AQVIST, J. **Linear Interaction Energy: Method and applications in Drug Design. In: Riccardo Baron (eds). Computacional Drug Discovery and Design. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. 819. ed. New York: [s.n.], 2012.

HAHN, H. J. et al. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. **Annals of dermatology**, v. 28, n. 6, p. 740–748, 2016.

HAIGH, J. M. et al. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments **International Journal of Pharmaceutics**, v. 2, n. 2, p. 1153–1156, 1992.

HAQ, A.; DORRANI, M.; et al. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1–2, p. 58–64, 2018.

HAQ, A.; GOODYEAR, B.; et al. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 432–437, 2018.

HARWANSH, R. K. et al. Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. **Life Sciences**, v. 141, p. 202–211, 2015.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. **Advances Analysis Chemistry Instruments**. v. 4, p. 117–212, 1965.

HIGUCHI, W. I. Analysis of Data on the Medicament Release from Ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 8, p. 802–804, 1962.

HSU, C. M. et al. Characterization of in vitro and in vivo bioactivity of a ferulic acid-2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, n. 91, p. 68–74, 2019.

HUA, D. et al. Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 74, v.4, p. 783–790, 2007.

HO, K. et al. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. **Cancer Epidemiol**, v. 33, p. 155–160, 2009.

HYUN, J. M.; GYOO, P. S., NA, J. S. **Composition for improving skin wrinkle**. Korea patent KR 20110101727. 2011.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 147–162, 1997.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

ITAGAKI, S. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 466–471, 2009.

JABLAN, J.; SZALONTAI, G.; JUG, M. Comparative analysis of zaleplon complexation with cyclodextrins and hydrophilic polymers in solution and in solid state. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, p. 35–44, 2012.

JANGDE, R.; SINGH, D. Investigation of Drug-Excipients Compatibility of Ellagic Acid for Development of Formulation Containing Liposomes. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 2, n. 4, p. 15–18, 2014.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CDs as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 1–2, p. 32–40, 2009.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018.

JANSSENS, S. et al. Influence of polyethylene glycol chain length on compatibility and release characteristics of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethylene glycol/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 203–210, 2008.

JAVED, R. et al. PVP and PEG doped CuO nanoparticles are more biologically active: Antibacterial, antioxidant, antidiabetic and cytotoxic perspective. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 108–115, 2017.

JEONG, Y.C.; JAE, H.M.; KEUN, H. . Isolation and identification of 3-methoxy-4

hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity **Korean J. Food Sci. Technol.**, v. 32, n. 6, p. 1403–1408, 2000.

JIN, M. et al. **Composition for anti-inflammation**, Korea patent KR 20110068258. 2011.

JING, W. et al. **Ferulic acid cyclodextrin or cyclodextrin derivate inclusion compound and preparation method**, China patent CN 101485447. 2016.

JOHNSON, D.; HILAL, N. Characterisation and quantification of membrane surface properties using atomic force microscopy: A comprehensive review. **DES**, n. 2014, p. 1–15, 2016.

_____. Polymer membranes – Fractal characteristics and determination of roughness scaling exponents. **Journal of Membrane Science**, v. 570–571, p. 9–22, 2019.

JULLIAN, C. et al. Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin. A thermodynamic and reactivity study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 269–275, 2008.

KANSKI, J. et al. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure – activity studies. v. 13, p. 273–281, 2002.

KARN, P. R. et al. Preparation and evaluation of cyclosporine A-containing proliposomes: A comparison of the supercritical antisolvent process with the conventional film method. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 5079–5091, 2014.

KHULBE, K. C.; MATSUURA, T.; FENG, C. Y. Synthetic membrane characterisation – a review: part II. **Membrane Technology**, v. 2017, n. 8, p. 7–12, 2017.

KIM, H. et al. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Toxicology**, v. 282, n. 3, p. 104–111, 2011.

KIM, J. et al. Effect of a Topical Antioxidant Serum Containing Vitamin C, Vitamin E, and Ferulic Acid after Q-Switched 1064-Nm Nd:YAG Laser for Treatment of Environment-Induced Skin Pigmentation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, 2020.

KITAGAWA, S. et al. Efficient Topical Delivery of Chlorogenic Acid by an Oil-in-Water Microemulsion to Protect Skin against UV-Induced Damage. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 6, p. 793–796, 2011.

KLEIN, R. R.; HECKART, J. L.; THAKKER, K. D. In vitro release testing methodology and variability with the vertical diffusion cell (VDC). **Dissolution Technologies**, v. 25, n. 3, p. 52–61, 2018.

KOLAWOLE, A. O.; AGABA, R. J.; OLUWOLE, M. O. Spectroscopic characterisation of interaction of ferulic acid with aldehyde dehydrogenase (ALDH). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 247–255, 2017.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. v. 4, p. 86–93, 2014.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.

LAHIANI-SKIBA, M. et al. Solubility and dissolution rate of progesterone-cyclodextrin-polymer systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 9, p. 1043–1058, 2006.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n.1, p. 1–7, 2009.

ŁASZCZ, M. et al. Study on Compatibility of Imatinib Mesylate With Pharmaceutical Excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 88, n. 2, p. 305–310, 2007.

LEAL-CALDERON, F.; THIVILLIERS, F.; SCHMITT, V. Structured emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 206–212, 2007.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

LEVEQUE, N. et al. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p. 323–328, 2004.

LI, B. et al. Preparation and characterization of baicalin-poly -vinylpyrrolidone coprecipitate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1–2, p. 91–96, 2011.

LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 81–98, 2014.

LI, Q. et al. Propyl gallate/cyclodextrin supramolecular complexes with enhanced solubility and radical scavenging capacity. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1062–1069, 2018.

LI, L. et al. **Ferulic acid and phospholipid complex and application thereof to preparation of skin-whitening cosmetics**, China patent CN 105581919. 2016.

LIMA, A.A.N. et al. **Desenvolvimento de sistemas multicomponentes com ácido ferúlico**, Brasil patent BR 102016022392-0. 2018.

LIMA, Á. A. N. et al. Alternative Technologies to Improve Solubility of Poorly Water Soluble Drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789–797, 2008.

LIMA, Á. A. N. et al. Influence of the physico-chemical aspects of drugs in the development of medicines: Benznidazole case study. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, n. 9, p. 1981–1990, 2016.

LIN, F. et al. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. **J Invest Dermatol**, v.125, n.4, p. 826–832, 2005.

LIN, L. L. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

LIPPACHER, A.; MU, R. H. Liquid and semisolid SLN e dispersions for topical application : rheological characterization. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, n.3, p. 561–567, 2004.

LIU, J. et al. Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 999–1017, 2017.

LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. **Pharmazie**, v. 53, n. 11, p. 733–740, 1998.

LOFTSSON, T et al. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 110, n. 2, p. 169–177, 1994.

LOFTSSON, T; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019–3032, 2012.

LOFTSSON, T; FRIRIKSDÓTTIR, H. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1–2, p. 115–121, 1998.

LOFTSSON, T; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations : theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15–30, 2001.

LOFTSSON, Thorsteinn; OLAFSSON, J. H. Cyclodextrins: New drug delivery systems in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 241–246, 1998.

LOFTSSON, Thorsteinn; SAOKHAM, P.; SÁ COUTO, A. R. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, n. 5, p. 228–234, 2003.

LOPES, P. S. et al. Evaluation of in vitro percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 225–231, 2008.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 379–402, 2017.

LUPI, F. R. et al. A rheological analysis of structured water-in-olive oil emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 3–4, p. 296–303, 2011.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 117–124, 2010.

MANSO, L. et al. Development of cosmetic formulations containing glucan polymer of Cassava (*Manihot esculenta*): stability and sensory analysis. **Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 12, n. 1, p. 91–98, 2015.

MAISUTHISAKUL, P.; HARNSILAWAT, T. Characterization and stabilization of the extract from mango seed kernel in a cosmetic emulsion. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 45, n. 3, p. 521–529, 2011.

MALDE et al. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.7, n.12, p. 4026-4037,2011.

MAMBRO, M. D.; BORIN, M. F.; FONSECA, M. J. V. Topical formulations with superoxide dismutase : influence of formulation composition on physical stability and enzymatic activity. **J Pharm Biomed Anal**. v. 32, p. 97–105, 2003.

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

MARQUES, H. M. Cabral; HADGRAFT, J.; KELLAWAY, I. W. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 63, n. 3, p. 259–266, 1990.

MARQUES, Helena Ma Cabral. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313–326, 2010.

MARRETO, R. N. et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochemica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 53–58, 2008.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Physico-chemical characterization of starch ferulates of different degrees of substitution. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 579–589, 2007.

MATHUR, V.; SATRAWALA, Y.; RAJPUT, M. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 173, 2010.

MATILTA, P.; HELLSTRÖM, J.; TÖRRÖNEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7193–7199, 2006.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3369–3373, 2010.

MENDONÇA, C. M. S. et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2277–2285, 2014.

MIRANDA, J. C. et al. Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 665–681, 2011.

MEDAREVIĆ, D. et al. Influence of hydrophilic polymers on the complexation of carbamazepine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 273–285, 2015.

MEGÍAS, C. et al. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 2, p. 353–359, 2009.

MEIRELES, S. et al. Characterization of asymmetric membranes of cellulose acetate from biomass: Newspaper and mango seed. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 954–961, 2010.

MELO, E. K. S. **Caracterização e estudos de liberação e permeação cutânea in vitro de preparações tópicas do cidofovir**. 2012. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

MELO, P.N. et al. Host–guest interactions between benzimidazole and beta-cyclodextrin in multicomponent complex systems involving hydrophilic polymers and triethanolamine in aqueous solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 186, p. 147–156, 2013.

MESSNER, M. et al. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1–2, p. 199–208, 2010.

MICHAELIS, M. et al. Treatment of drug-resistant human neuroblastoma cells with cyclodextrin inclusion complexes of aphidicolin. **Anti-Cancer Drugs**, v. 12, n. 5, p. 467–473, 2001.

MILANI, L. P. G. et al. Extract from byproduct *Psidium guajava* standardized in ellagic acid: additivition of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation. **Rev. bras. farmacogn.** v. 28, n. 6, p. 692–696, 2018.

MILLUCCI, V. et al. Apparent Solubility and Dissolution Profile at Non-Sink Conditions as Quality Improvement Tools. **Promising Pharmaceutics**, 2012.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 263–269, 2009.

MONTENEGRO, L. et al. Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 5, p. 539–548, 2006.

MONTI, D. et al. Permeation and distribution of ferulic acid and its α -cyclodextrin complex from different formulations in hairless rat skin. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 514–520, 2011.

MORAES, C. M. et al. Preparação e caracterização físico- química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 777–784, 2007.

MORAIS, M. M. R. F.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.

MORI, T. et al. Solubilization of ultraviolet absorbers by cyclodextrin and their potential application in cosmetics. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 93, n. 1–2, p. 91–96, 2019.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226–238,

2015.

MURA, P.; FAUCCI, M. T.; BETTINETTI, G. P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 187–194, 2001.

MURRAY, J. C. et al. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 3, p. 418–425, 2008.

NADAL, J. M. et al. A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: Development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 7–11, 2015.

NARAYANAN, G. et al. Analytical techniques for characterizing cyclodextrins and their inclusion complexes with large and small molecular weight guest molecules. **Polymer Testing**, v. 62, p. 402–439, 2017.

NATELLA, F. et al. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure- activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1453–1459, 1999.

NETHAJI, M; PATTABHI, V.; DESIRAJU, R.. Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid). **Acta Crystallographica Section C**, p. 275–277, 1988.

NEACȘU, A. Physicochemical investigation of the complexation between γ -cyclodextrin and doxorubicin in solution and in solid state. **Thermochemica Acta**, v. 661, n. July 2017, p. 51–58, 2018.

OLEJNIK, A.; NOWAK, I. Atomic force microscopy analysis of synthetic membranes applied in release studies. **Applied Surface Science**, v. 355, p. 686–697, 2015.

OLGA, G.; STYLIANI, C.; IOANNIS, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 185, p. 33–40, 2015.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

ORESANO, C. et al. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 290–297, 2008.

OUIMET, M. A. et al. Ferulic Acid-Based Polymers with Glycol Functionality as a Versatile Platform for Topical Applications. **BIOMACROMOLECULES**, v. 16, n. 9, p. 2911–2919, 2015.

PAIVA, L. B. et al. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 395–411, 2013.

PAULA, E. L.; MANO, V. Preparação, caracterização e estudos de biodegradação de blendas à base de PDLLA e PVP **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1084–1089, 2012.

PAN, Y. et al. Pharmacokinetic characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin- included complex of cryptotanshinone, an investigational cardiovascular drug purified from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*). **Xenobiotica**, v. 38, n. 4, p. 382–398, 2008.

PAN, Z. et al. **Cosmetic compositions containing at least one flavonoid and ferulic acid**. United States patent US 2014107046 A1. 2014

PANWAR, R. et al. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 21–31, 2016.

PERES, D. D. et al. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, p. 46–49, 2018.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIANOVSKI, A. R. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões múltiplas O / A / O com. **Revi. Bras. Farm.**, v. 89, n. 2, p. 155–159, 2008

PINHEIRO, J. G. de O. et al. Inclusion complexes of copaiba (*Copaifera multijuga hayne*) oleoresin and cyclodextrins: Physicochemical characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

POLININI, H. C. et al. Evaluation of Percutaneous Absorption Performance for human female sexual steroids into pentravan cream. **International Journal of Pharmaceutical Compounding** v. 18, n. 4, p. 332–340, 2014.

POPA, N. et al. Hydrogels based on chitosan-xanthan for controlled release of theophylline. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 4, p. 1241–1248, 2010.

PRABHAKARA, P.K., PRASADB,R., ALIB, S.M. D. Phytomedicine Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 20, n. 6, p. 488–494, 2013.

PREMARATHNE, E. P. N.; KARUNARATNE, D. N.; PERERA, A. D. L. C. Controlled release of diclofenac sodium in glycolipid incorporated micro emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 2, p. 890–898, 2016.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

QUAGLIA, F. et al. The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 30, n. 3, p. 374–382, 2009.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34–41, 2016.

QUINTANS, J. S. S. et al. Host–guest inclusion complexation of β -cyclodextrin and hecogenin acetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 123–131, 2017.

QVIST, M. H. et al. Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 59–68, 2000.

RAJPUT, K. N.; PATEL, K. C.; TRIVEDI, U. B. β -Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glucanotransferase from an Alkaliphile Microbacterium terrae KNR 9 Using Different Starch Substrates. **Biotechnology Research International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

RAMAR, M. et al. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1–3, p. 226–235, 2012.

REIS, J. M. et al. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 781–789, 2013.

RIBEIRO, R.C.A et al. Production and Characterization of Cosmetic Nanoemulsions Containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Extract as Moisturizing Agent. **Molecules**, v.20, n.2, p. 2492–2509, 2015.

RHO, S. J. et al. Physicochemical interactions of cyclodextrin with phenolic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 980–989, 2017.

RIBEIRO, L. et al. Investigation and Physicochemical Characterization of Vinpocetine-Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin Binary and Ternary Complexes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 8, p. 914–922, 2003.

RODE, M. F. T.; STEINHART, C. R. H. Determination of Green-Tea Catechins in Cosmetic Formulations and in In-Vitro Skin Extracts by High- Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 55, n.1, p. 43–48, 2002.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 5816–5825, 2010.

RUKKUMANI, R. et al., Hepatoprotective Role of Ferulic Acid: A Dose-Dependent Study. **J Med Food**, v. 7, n. 4, p. 456–461, 2004.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39–47, 2000.

SAJEESH, S. et al. Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: An oral delivery system for insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 3, p. 377–384, 2010.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophysical Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 133–149, 2004.

SANMIGUEL, G.S; NUNEZ J.M.S., ZAMORA, J.M. **Systems and methods for skin rejuvenation**, United States patent US 2013345307. 2013.

SANTOSH KUMAR, S.; PRIYADARSINI, K. I.; SAINIS, K. B. Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2002.

SAOKHAM, P.; LOFTSSON, T. γ -Cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1–2, p. 278–292, 2017.

SARAF, S.; KAUR, C. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 1, p. 22, 2010.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. v. 112, p. 654–658, 2009.

SCHNEIDER, H.-J. et al. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1755–1786, 2002.

SCHOUBBEN, A. et al. Evaluation and optimization of the conditions for an improved ferulic acid intercalation into a synthetic lamellar anionic clay. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 604–613, 2006.

SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. **J Pharm Biomed Anal**, v. 15, n.6, p. 795–801, 1997.

SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid Dispersions: Revival with Greater Possibilities and Applications in Oral Drug Delivery. **Crit. Rev. Ther.**, v. 20, n. 2003, p. 215–247, 2003.

SHAIKH, H. M. et al. Utilization of sugarcane bagasse cellulose for producing cellulose acetates: Novel use of residual hemicellulose as plasticizer. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 23–29, 2009.

SHAKEEL, F. et al. Solubility and thermodynamics of apremilast in different mono solvents: Determination, correlation and molecular interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 1, p. 410–417, 2017.

SHAMMA, R. N.; BASHA, M. Soluplus®: A novel polymeric solubilizer for optimization of Carvedilol solid dispersions: Formulation design and effect of method of preparation. **Powder Technology**, v. 237, p. 406–414, 2013.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202–1205, 2009.

SHIOW-FERN, N. et al. A Comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using franz diffusion cells. **Pharmaceutics**, v. 2, n. 2, p. 209–223, 2010.

SHYAMALA, B. N. et al. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7738–7743, 2007.

SILVA, E. P. et al. Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 933–939, 2016.

SILVA, J. . et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de ciencias farmaceuticas basica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 225–231, 2010.

SILVA JÚNIOR, W. F. et al. Development, physicochemical characterization and in vitro anti-inflammatory activity of solid dispersions of α,β amyirin isolated from protium oilresin. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

SILVA JUNIOR et al. **Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs. Multifunctional Systems for Combined Delivery**. 1ed. Amsterdanr: Elsevier Inc., 2017.

SILVA JÚNIOR, W. F. et al. Inclusion complexes of β and HP β -cyclodextrin with α , β amyirin and in vitro anti-inflammatory activity. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2019.

SILVA, P. C. D. et al. Compatibility study between lipoic acid with polymers used in controlled drug release systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 965–971, 2016.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234–241, 2016a.

_____. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 234–241, 2016b.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G. R. Stress metabolites and their role in coastal plants. **Vegetatio**, v. 62, n. 1–3, p. 273–278, 1985.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benznidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.

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

_____. Solid dispersion of efavirenz in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p. 166–174, 2014.

SOLIMAN, K. A. B.; IBRAHIM, H. K.; GHORAB, M. M. Effect of different polymers on avanafil- β -cyclodextrin inclusion complex: in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 168–177, 2016.

SOUZA, C. R. F.; FERRAZ-FREITAS, P. N.; OLIVEIRA, W. P. Complexos de inclusão binários, ternários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 979–986, 2016.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Recent Advances in Indian Herbal Drug Research Guest Editor: Thomas Paul Asir Devasagayam Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 92–100, 2007.

STANIFORTH, V. et al. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 443–451, 2012.

STELLA, V. J. et al. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 3–16, 1999.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 30–42, 2008.

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

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014. Disponível em: <<http://revistas.unopar.br/index.php/biologicas/article/view/442>>. Acesso em 18 de set. de 2020.

SUDHEER, A. R. et al. Ferulic Acid Modulates Altered Lipid Profiles and Prooxidant / Antioxidant Status in Circulation During Nicotine-Induced Toxicity: A Dose-Dependent Study. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 15, p. 375–381, 2005.

SUN, L. et al. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of Biotechnology**, v. 281, n. July, p. 144–149, 2018.

SUWANDECHA, T. et al. Host-guest interactions between sildenafil and cyclodextrins: Spectrofluorometric study and molecular dynamic modeling. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 77, p. 115–120, 2017.

SUZUKI, A. et al. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v. 7061, n. 01, p. 351–357, 2002.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743–1754, 2002.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 17–28, 1999.

SZENTE, L.; SZEMÁN, J.; SOHAJDA, T. Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 347–365, 2016.

YANGHAI ELETRONIC. **Skin whitening facial mask**, China patent CN 103637924. 2014

YVES, B.; JACQUES, L. **Use of ferulic acid, its salts and/or derivatives as lipolytic agent to prepare a cosmetic and/or pharmaceutical composition to prevent and/or treat the adipose overloads and/or cellulitis, by systemic and/or local administration**, France patent FR 2907338. 2008.

TADA, Y.; TAYAMA, K.; AOKI, N. Acute oral toxicity of ferulic acid, natural food additive, in rats. **Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.**, v.50, p.311-313, 1999.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 109, p. 303–318, 2004.

TAI, A. et al. Biochimica et Biophysica Acta Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **BBA - General Subjects**, v. 1810, n. 2, p. 170–177, 2011.

TAKAHASHI, A. I. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. p. 99, 2009.

TAUPITZ, T. et al. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: Itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 3, p. 378–387, 2013.

THAKRAL, N. K. et al. Soluplus-solubilized citrated camptothecin - A potential drug delivery strategy in colon cancer. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 59–66, 2012.

FIDDLER, W. et al., Thermal Decomposition of Ferulic Acid. v. 15, n. 5, p. 757–761, 1967.

TOURNAS, J. A. et al. Ubiquinone, Idebenone, and Kinetin Provide Ineffective Photoprotection to Skin when Compared to a Topical Antioxidant Combination of Vitamins C and E with Ferulic Acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1185–1187, 2006.

TROMBINO, S. et al. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a novel cellulose hydrogel containing trans-ferulic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 184–188,

2009.

UCHIDA, T. et al. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-MTM. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, p. 113–118, 2015.

URBANIAK, A.; SZELA, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. v. 1012, p. 33–40, 2013.

VALERO, M.; PÉREZ-REVUELTA, B. I.; RODRÍGUEZ, L. J. Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:β-cyclodextrin complex. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, n. 1–2, p. 97–110, 2003.

VIEIRA, A. C. C. et al. Multicomponent systems with cyclodextrins and hydrophilic polymers for the delivery of Efavirenz. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 133–140, 2015.

VILLANUEVA-BERMEJO, D. et al. Solubility of Bioactive Substances in Ethyl Lactate + Water Mixtures: Ferulic Acid and Caffeine. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 10, n. Suppl-1, M7, p. 50–58, 2016.

WAIBEL, J. S. et al. Laser-assisted delivery of Vitamin C, Vitamin E, and ferulic acid formula serum decreases fractional laser postoperative recovery by increased beta fibroblast growth factor expression. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 3, p. 238–244, 2016.

WANG, B. et al. Sodium Ferulate Inhibits Atherosclerogenesis in Hyperlipidemia rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 43, n. 4, p. 1–2, 2004.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127–132, 2008.

_____. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1069–1075, 2011.

WONG, P. C. Y.; KWON, Y.-N.; CRIDDLE, C. S. Use of atomic force microscopy and fractal geometry to characterize the roughness of nano-, micro-, and ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 340, n. 1–2, p. 117–132, 2009.

XIE, M. et al. Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9128–9136, 2014.

XIE, X.; DAI, C. Bioresource Technology Degradation of a model pollutant ferulic acid by

the endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. **Bioresource technology**, v. 179, p. 35–42, 2015.

YUAN, C.; LIU, B.; LIU, H. Characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 36–40, 2015.

ZHANG, H. et al. Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for in vitro permeation studies using Franz diffusion cell device. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 4, p. 302–311, 2017.

ZHANG, L. et al. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives : Evaluation of their efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1–2, p. 44–51, 2010.

ZHANG, M. et al. Theoretical and experimental study of the inclusion complexes of ferulic acid with cyclodextrins. **Supramolecular Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 597–602, 2009.

ZHANG, X. et al. Investigation and physicochemical characterization of clarithromycin-citric acid-cyclodextrins ternary complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 2, p. 163–171, 2007.

ZHANG, Z. et al. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1140–1146, 2012.

ZHAO, H. et al. Purification, in vitro antioxidant and in vivo anti-aging activities of exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 351–357, 2017.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic Acid Is Quickly Absorbed from Rat Stomach as the Free Form and Then Conjugated Mainly in Liver. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 11, p. 3083–3088, 2004.

ZI, Y. et al. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells. **J Cosmet Dermatol**. v.17, n.6, p. 1108–1114, 2018.

ZIDAN, A. S. et al. Near-Infrared Investigations of Novel Anti-HIV Tenofovir Liposomes. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 2, p. 202–214, 2010.

ZILLICH, O. V. et al. Antioxidant activity, lipophilicity and extractability of polyphenols from pig skin - development of analytical methods for skin permeation studies. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 11, p. 1444–1451, 2013.

ZOPPI, A. et al. Enalapril: β -CD complex: Stability enhancement in solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 716–721, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Patente: Desenvolvimento de sistemas multicomponentes com ácido ferúlico



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016022392-0 A2

(22) Data do Depósito: 27/09/2016

(43) Data da Publicação: 02/05/2018



* B R 1 0 2 0 1 6 0 2 2 3 9 2 A

(54) Título: DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTICOMPONENTES COM ÁCIDO FERÚLICO

(51) Int. Cl.: A61K 31/192; A61K 47/40; A61K 47/32; A61P 39/06

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

(72) Inventor(es): ÁDLEY ANTONINI NEVES DE LIMA; ANA PAULA BARRETO GOMES; ELISSA ARANTES OSTROSKY; FERNANDA ÍLARY COSTA DUARTE

(57) Resumo: A presente patente de invenção refere-se ao processo de obtenção de sistemas multicomponentes com o ácido ferúlico para aplicação nas áreas farmacêutica, alimentícia e cosmética. O ácido ferúlico destaca-se por suas atividades fotoprotetora e antioxidante, entretanto seu uso é limitado pela instabilidade e baixa solubilidade em meio aquoso. Assim, a presente patente propõe a utilização do ácido ferúlico, com ciclodextrinas e polímeros hidrofílicos para a formação de sistemas multicomponentes ternários, a fim de conferir ao fármaco maior estabilidade e solubilidade aquosa.

APÊNDICE B – Marca Registrada: CICLOFERULIC®



Pedido de Registro de Marca de Produto e/ou Serviço (Nominativa)

Número do Processo: 920266673

Especificação de Produtos ou Serviços, segundo a Classificação de NICE e listas auxiliares

Classe escolhida: NCL(11) 1

Descrição da Especificação:

- Antioxidantes para uso em fabricação
- Antioxidantes para uso na fabricação de cosméticos
- Antioxidantes para uso na fabricação de produtos farmacêuticos

APÊNDICE C – Artigos publicados/aceitos para publicação em periódicos internacionais como autora **Artigo 1.** *In vitro* release studies of ferulic acid in semi-solid formulations with optimized synthetic membrane. Aceito para publicação – *in press* na **JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY.**

In vitro release studies of ferulic acid in semi-solid formulations with optimized synthetic membrane

Fernanda Ilary Costa Duarte, Anne Beatriz Sabino de Mendonça Costa, Jonas Fernandes Vieira Filho, Victoria Louise Pinto Freite, Jamile Vitória Alves Freire, Attilio Converti, Márcio Ferrari, Ana Paula Barreto Gomes, Elissa Arantes Ostrosky, Ádley Antonini Neves de Lima



PII: S1773-2247(20)31395-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102106>

Reference: JDDST 102106

To appear in: *Journal of Drug Delivery Science and Technology*

Received Date: 28 July 2020

Revised Date: 4 September 2020

Accepted Date: 17 September 2020

Artigo 2. Ferulic Acid Activity in Topical Formulations: Technological and Scientific Prospecting. Aceito para publicação na **CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN**



Current Pharmaceutical Design

Para adleyantonini@yahoo.com.br e mais 3

16 de set. às 08:33

Reference#: BMS-CPD-2020-282

Submission Title: Ferulic Acid Activity in Topical Formulations: Technological and Scientific Prospecting

Dear Dr. Ádley Antonini Neves de Lima,

I am pleased to inform you that your article entitled "**Ferulic Acid Activity in Topical Formulations: Technological and Scientific Prospecting**" has been provisionally approved for publication in "**Current Pharmaceutical Design**". Please

Artigo 3. Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: *In Vivo* and *In Vitro* Approaches.

Publicado na **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES**.



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches

Simone Braga Carneiro ¹, Fernanda Ílary Costa Duarte ², Luana Heimfarth ³,
Jullyana de Souza Siqueira Quintans ³, Lucindo José Quintans-Júnior ³,
Valdir Florêncio da Veiga Júnior ⁴ and Ádley Antonini Neves de Lima ^{2,*}

¹ Chemistry Department, Amazonas Federal University, Av. Rodrigo Octavio, 6200, Manaus AM 69080-900, Brazil; Braga.simone.c@gmail.com

² Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59012-570, Brazil; fernandailary@gmail.com

³ Laboratory of Neuroscience and Pharmacological Assays (LANEF), Federal University of Sergipe, São Cristóvão SE 49100-000, Brazil; luahei@yahoo.com.br (L.H.); jullianaquintans@gmail.com (J.d.S.S.Q.); lucindojr@gmail.com (L.J.Q.-J.)

⁴ Military Institute of Engineering, Praça General Tiburcio, 80, Praia Vermelha, Rio de Janeiro RJ 22290-290, Brazil; valdir.veiga@gmail.com

* Correspondence: adleyantonini@yahoo.com.br; Tel.: +55-84-99928-8864


Received: 20 November 2018; Accepted: 27 December 2018; Published: 2 February 2019



APÊNDICE D – Artigos publicados/aceitos para publicação em periódicos internacionais como colaboradora

Artigo 1. Thermal behavior of ferulic acid employing isoconversional models and artificial neural network. Publicado na **JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY**.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
<https://doi.org/10.1007/s10973-019-08114-x>



Thermal behavior of ferulic acid employing isoconversional models and artificial neural network

Luana Guedes Brito¹ · Geovana Quixabeira Leite¹ · Fernanda Ílary Costa Duarte¹ · Elissa Arantes Ostrosky¹ · Marcio Ferrari¹ · Adley Antonini Neves de Lima¹ · Fernando Henrique Andrade Nogueira¹ · Cícero Flávio Soares Aragão¹ · Bárbara Darós de Lelis Ferreira² · Maria Betânia de Freitas Marques³ · Maria Irene Yoshida² · Wagner da Nova Mussel² · Rita de Cássia de Oliveira Sebastião² · Ana Paula Barreto Gomes¹

Received: 21 August 2018 / Accepted: 15 February 2019
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Artigo 2. Therapeutic Applications of Solid Dispersions for Drugs and New Molecules: In Vitro and In Vivo Activities. Publicado na **PHARMACEUTICS**.




Review

Therapeutic Applications of Solid Dispersions for Drugs and New Molecules: In Vitro and In Vivo Activities

Verônica da Silva Oliveira¹, Amanda Silva de Almeida², Ingrid da Silva Albuquerque², Fernanda Ílary Costa Duarte¹, Bárbara Cristina Silva Holanda Queiroz¹, Attilio Converti³  and Adley Antonini Neves de Lima^{1,2,*} 

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN 59012-570, Brazil; veronicasoliver47@gmail.com (V.d.S.O.); fernandailary@gmail.com (F.Í.C.D.); barbaracqueiroz@gmail.com (B.C.S.H.Q.)

² Department of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN 59012-570, Brazil; amandasdealmeida@gmail.com (A.S.d.A.); ingridmariaalbuquerque@gmail.com (I.d.S.A.)

³ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, Genoa University, I-16145 Genoa, Italy; converti@unige.it

* Correspondence: adleylima13@gmail.com; Tel.: +55-8499-928-8864

Received: 17 September 2020; Accepted: 27 September 2020; Published: 30 September 2020 