

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Camila Reck Rampelotto

**NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO:
DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E
CITOPROTEÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEADAS HUMANAS**

**Santa Maria-RS,
2020**

Camila Reck Rampelotto

**NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO: DESENVOLVIMENTO,
AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E CITOPROTEÇÃO EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Controle de qualidade e avaliação biofarmacêutica de insumos e medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Scheila Rezende Schaffazick

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rampelotto, Camila Beck
NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO: DESENVOLVIMENTO,
AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E CITOPROTEÇÃO EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS HUMANAS / Camila Beck Rampelotto.- 2020.
66 p.; 30 cm

Orientador: Cristiane de Sona da Silva
Coorientador: Scheila Rezende Schaffazick
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Nanopartículas 2. Antioxidante 3. Ácidos fenólicos
4. Citoproteção 5. Genoproteção I. de Sona da Silva,
Cristiane II. Rezende Schaffazick, Scheila III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UNIM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

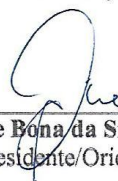
Declaro, CAMILA RECK RAMPELOTTO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Camila Reck Rampelotto

**NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO: DESENVOLVIMENTO,
AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E CITOPROTEÇÃO EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Controle de qualidade e avaliação biofarmacêutica de insumos e medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 16 de janeiro de 2020:



Cristiane de Bona da Silva, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Scheila Rezende Schaffazick, Dr^a (UFSM)
(Coorientadora)



por parecer

Fernanda Cramer Flores, Dr^a (URI-FW)



Luana Mota Ferreira, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Taís, meu amor e companheira, por mais essa etapa concluída, por compartilharmos nossas vidas, sonhos e preocupações, por ser meu porto seguro sempre. Pelo afeto e, também, pela transparência, construção e, principalmente, desconstrução. Pela família moderna e alternativa que temos, mas cheia de amor e princípios. Obrigada por tudo! Estendo os agradecimentos à não humanos, mas integrantes da família: Penny, Amora e Fuetsu. Vocês enchem as nossas vidas de um amor incondicional e, também, alguns pelos, conforto nos momentos difíceis e conciliações.

À Profa. Cristiane, pela oportunidade, paciência e todas as conversas e trocas de ideias que enriqueceram mais que o meu trabalho ou formação profissional. Por todo o carinho e compreensão ao longo desses anos, por não desistir de mim e confiar em mim mais do que eu mesma. Muito obrigada.

À Profa. Scheila que me acompanhou desde a iniciação científica, por todas as oportunidades e pelo exemplo de pessoa e profissional íntegra e comprometida com a excelência em todos os seus projetos. Pelos conhecimentos e valores que adquiri em sua convivência e por toda as conversas, em especial as motivacionais.

Às Profas. Andrea e Letícia, pelas conversas de corredores sobre assuntos técnicos ou não, que apesar de singelas, sempre foram muito construtivas e inspiradoras, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo carinho de sempre.

Aos colaboradores desse trabalho pela disponibilidade e atenção: Michele Rorato Sagrillo, Alencar Kolinski Machado, Tatiana Emanuelli, Sabrina Somacal e André Gündel.

Aos TAEs do DFI, pela boa convivência e suporte para a realização do trabalho. Em especial à Charlene pelos empréstimos de materiais, análises no master e zeta quando a coisa apertava, sempre muito disposta, solícita e compreensiva. E em especialíssimo, à Rosemary pelo convívio diário, por todo apoio, por poder compartilhar um pouco das minhas angústias e preocupações, hoje compartilho também a minha felicidade na conclusão de uma etapa. A mãe de todos no lab., a organizadora de confraternizações, a sempre disposta Rosemary Bueno, muito obrigada!

Aos Lab mais Mara, Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, pelas pessoas maravilhosas e inspiradoras que encontrei e pela oportunidade de conhecer melhor cada um de vocês, por compartilharmos conhecimentos e também nossas expectativas durante nossas trajetórias: Jéssica, Vanessa, Roberta, Nadine, Aline, Júlia, Dida, Tatiele, Tielli, Kadu, Gabriel, Lara, Barbara, Igor e Laura.

À Viviane minha fiel escudeira, por estar sempre pronta e disposta, por toda a dedicação e atenção sempre dedicados ao nosso projeto. Além de ótima profissional, és uma ótima amiga, obrigada por todas as conversas do teu jeito único e calmo. Sou muito grata por ter te encontrado no meu caminho.

Aos colegas integrantes e ex-integrante do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica por toda troca de ideia e inspirações, por todo o acolhimento que o grupo sempre teve comigo, desde a minha iniciação científica.

Ao departamento de bioquímica da UFSM pelo empréstimo de equipamentos, em especial a Profa. Cristina Nogueira e aos alunos Vinícius e Sabrina.

Em especial ao meu amigo Vini! Agradeço por toda a ajuda, por estar sempre disponível, me motivando e ajudando. Tu és um presente, desde a graduação. Foi muito bom caminhar ao teu lado s2.

Ao Marcel por todo apoio técnico e pelas trocas de ideias, tenho muita admiração pela pessoa e profissional que és. Muito obrigada por tudo!

Por fim, mas não menos importante, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino de qualidade e gratuito.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia Farmacêutica (INCT-NANOFARMA), que é apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, Brasil, Proc. n. 2014/50928-2) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil, Proc. n. 465687/2014-8); do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

NANOCÁPSULAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO: DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E CITOPROTEÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEADAS HUMANAS

Autora: Camila Reck Rampelotto

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane de Bona da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Scheila Rezende Schaffazick

O ácido ferúlico é um composto fenólico relatado por possuir atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica e citoprotetora, porém, sua baixa biodisponibilidade oral limita sua aplicação terapêutica. Para contornar tais limitações, as nanopartículas poliméricas, e dentre elas, as nanocápsulas, possuem o potencial de carrear substâncias de interesse farmacêutico, podendo ser delineadas para contornar efeitos indesejáveis, melhorar a estabilidade e a performance biológica de substâncias. Nesse sentido, este trabalho objetivou o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo ácido ferúlico, utilizando etilcelulose como polímero, a fim de avaliar a sua capacidade de inibição de radicais livres, a interação e irritação em mucosas, citocompatibilidade e a capacidade de cito e genoproteção das células frente ao estresse oxidativo, em diferentes modelos. A partir dos resultados, foi possível obter nanocápsulas contendo ácido ferúlico na concentração de 0,5 mg/mL, com características físico-química adequadas (112 ± 3 nm; PdI: $0,10 \pm 0,01$; PZ: $-7,0 \pm 0,4$ mV; $100,9 \pm 0,9$ % teor relativo ao AF). Os nanocarreadores promoveram a liberação controlada do ácido ferúlico em meio ácido pH 2,0 e ainda, potencializaram a inibição do radical ABTS, além de interagirem com a mucina e reduzirem o potencial de irritação, demonstrado pelo teste de HET-CAM. Nos testes de citotoxicidade, as nanocápsulas demonstraram ser citocompatíveis, bem como promoveram cito e genoproteção frente ao estresse oxidativo. Além disso, foi possível a obtenção de produtos secos redispersíveis a partir da liofilização das nanocápsulas, melhorando a estabilidade do ácido ferúlico em relação às suspensões aquosas. Considerando os resultados, a associação do ácido ferúlico à nanocápsulas poliméricas de etilcelulose demonstrou ser uma estratégia tecnológica importante e promissora para viabilizar a sua aplicação profilática e/ou terapêutica.

Palavras-chave: Ácidos fenólicos. Antioxidante. Citoproteção. Genoproteção. Nanopartículas. *Scavenging*.

ABSTRACT

FERULIC ACID-LOADED NANOCAPSULES: DEVELOPMENT, SAFETY AND CITOPROTECTION EVALUATION IN HUMAN MONONUCLEATED CELLS

Author: Camila Reck Rampelotto
Advisor: Prof^ª. Dra. Cristiane de Bona da Silva
Co-advisor: Prof^ª. Dra. Scheila Rezende Schaffazick

Ferulic acid is a phenolic compound that has antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. However, it has limited oral bioavailability, challenging its therapeutic application. Thus, polymeric nanocapsules are carriers of substances of pharmaceutical interest and may be delineated to mitigate undesirable effects, improve stability and biological performance of the substances. In this way, the present investigation aimed to develop ferulic acid loaded-nanocapsule suspensions and evaluate their *in vitro scavenging* capacity, particle interaction and irritation potential with mucous membrane, cytocompatibility, cytoprotection and genoprotection in human mononucleated cells against oxidative stress. From the results, it was possible to obtain nanocapsules containing ferulic acid at a concentration of 0.5 mg/mL, with adequate physicochemical characteristics (112 ± 3 nm; IPd: 0.10 ± 0.01; PZ: -7,0 ± 0.4 mV; 100.9 ± 0.9 % ferulic acid relative content). The nanocarriers promoted controlled release of ferulic acid in hydrochloric medium pH 2.0; its potentiated ABTS radical inhibition, interact with mucin and reduce irritation potential, demonstrated by HET-CAM test. In the cytotoxicity tests, the nanocapsules proved to be cytocompatible, as well as promoted cytoprotection and genoprotection front hydrogen peroxide. Moreover, it was possible to obtain suitable dispersible dried products from freeze-drying of nanocapsule suspensions, improving the stability of ferulic acid relative to aqueous suspensions. Considering the results, the association of ferulic acid with ethylcellulose polymeric nanocapsules showed be an important and promising technological strategy to enable its prophylactic and/or therapeutic application.

Palavras-chave: Antioxidant. Cytotoprotection. Hydroxycinnamic acid Genoprotection. Nanoparticles. Scavenging capacity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Estrutura química do ácido ferúlico.....	16
Figura 2 - Representação gráfica de nanocápsulas poliméricas.	19

ARTIGO: Ferulic acid-loaded nanocapsules: evaluation of mucosal interaction, safety and antioxidant activity in mononucleated cells.

Figure 1 - Morphological analysis of nanocapsule suspensions.	45
Figure 2 - In vitro release profile of ferulic acid-loaded nanocapsule suspension.	45
Figure 3 - Inhibition of ABTS radical in ferulic acid-loaded nanocapsules.....	46
Figure 4 - Evaluation of cytotoxicity in human mononuclear cells exposed to ferulic acid- loaded nanocapsules.	47
Figure 5 - Evaluation of cytoprotection of ferulic acid-loaded nanocapsules.....	48

DISCUSSÃO

Figura 3 - Avaliação do efeito scavenger frente ao radical ABTS das suspensões de nanocápsulas com 3% de TCM ou OC carreadoras de AF.	51
Figura 4 - Teor de AF nos liofilizados durante o estudo de estabilidade.	54

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Trabalhos científicos envolvendo o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo AF e suas aplicações. 18

ARTIGO: Ferulic acid-loaded nanocapsules: evaluation of mucosal interaction, safety and antioxidant activity in mononucleated cells.

Table 1 - Scores and classification of HET-CAM irritation evaluation.46

DISCUSSÃO

Tabela 2 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas com 3% de óleo.50

Tabela 3 - Percentual relativo aos ácidos graxos identificados na amostra comercial de óleo de coco..... 52

Tabela 4 - Caracterização físico-química dos liofilizados de nanocápsulas poliméricas contendo AF, após a preparação. 54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	ESTRESSE OXIDATIVO	14
3.2	ÁCIDO FERÚLICO	15
3.3	NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	18
4	DESENVOLVIMENTO	21
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	APÊNDICE A – PERFIL GRANULOMÉTRICO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	66
	APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	67

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi organizado em INTRODUÇÃO, OBJETIVOS e REVISÃO DE LITERATURA. A parte experimental e os resultados se encontram apresentados na forma de ARTIGO. Os itens finais correspondem à DISCUSSÃO, na qual estão contempladas informações relevantes e alguns resultados obtidos na elaboração deste trabalho, englobando testes preliminares que não estão descritos no artigo, finalizando com a CONCLUSÃO.

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo, atualmente, é um dos principais mecanismos fisiopatológicos alvo de pesquisa e desenvolvimento de terapia e profilaxia, visto que esse processo está especialmente relacionado na senescência biológica, sendo o precursor de processos inflamatórios, mutagênicos e carcinogênicos, além de estar envolvido em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, distúrbios psicossomáticos como ansiedade e depressão (KANDOLA; BOWMAN; BIRCH-MACHIN, 2015; GENESTRA, 2007; RAJENDRAN et al., 2014). Nesse sentido, a utilização de antioxidantes é uma estratégia que permite a atenuação do estresse oxidativo, vislumbrando a prevenção e terapia de patologias que envolvem esse processo, como as supracitadas.

Dentre os antioxidantes, o ácido ferúlico (AF) é um ácido fenólico encontrado amplamente e de forma natural em espécies de vegetais, em especial em cereais como arroz, milho e trigo (GHOSH et al., 2017; ZHAO e MOGDASIAN, 2008). Esse composto se destaca, principalmente, por apresentar pronunciada atividade antioxidante, além de ser relatada sua aplicação profilática e/ou terapêutica em processos fisiopatológicos associados ao estresse oxidativo, apresentando propriedades anti-inflamatórias, protetor de fotocarcinogênese, citoprotetor em células saudáveis e redutor da viabilidade celular em linhagens tumorais; de neuroproteção, atenuação de síndromes metabólicas e cardiopáticas, além de aplicação em doenças relacionadas à senescência fisiológica (BARONE; CALABRESE; MANCUSO, 2009; MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Apesar disso, o AF possui sua aplicação clínica limitada devida a sua baixa biodisponibilidade pela via oral, com meia vida em torno de 40 minutos (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). Assim como outros ácidos fenólicos e polifenóis, demonstra ser pró-oxidante em altas concentrações, sendo a utilização de formas farmacêuticas de liberação controlada uma estratégia para garantir segurança e eficácia em sua utilização (MAURYA e DEVASAGAYAM, 2010).

Nesse contexto, se destacam os sistemas nanoestruturados, como as nanocápsulas poliméricas, que são partículas submicrométricas compostas por um involucro polimérico e um núcleo geralmente oleoso (SCHAFFAZICK et al., 2003). Esses sistemas possuem o potencial de proteger os compostos frente a estresses físicos, além de proporcionar vantagens voltadas a performance biológica, como controle da liberação, mucoadesão, retenção gastrointestinal, melhora da solubilidade aparente e da bioatividade intrínseca à substância carregada, além da diminuição de efeitos indesejados como, por exemplo, a irritação em mucosas (CHO et al., 2013; EL-HABASHY; ALLAM; EL-KAMEL, 2016; GEHRCKE et al., 2017; MARCHIORI

et al., 2017; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2009; POHLMANN et. al, 2014; SAVIAN et al., 2015).

A partir do exposto, esse trabalho tem como objetivo o delineamento de nanocápsulas poliméricas para a associação do ácido ferúlico, utilizando etilcelulose como polímero. Esse propósito é justificável devida a necessidade de viabilizar a utilização do ácido ferúlico como antioxidante, tanto em termos de uma possível melhora na biodisponibilidade e manutenção dos níveis plasmáticos, como na redução de efeitos indesejados em decorrência de uma factível administração contínua, vislumbrando ao sistema proposto integrar uma base de opções profilática e/ou terapêutica às patologias relacionadas ao estresse oxidativo. Ainda, avaliou-se a partir de testes *in vitro*, a performance biológica dos sistemas desenvolvidos, em especial sua segurança e potencial de prevenir, tratar e/ou reverter danos oxidativos em células monucleadas humanas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é desenvolver nanocápsulas de etilcelulose para a veiculação do ácido ferúlico e avaliar esses sistemas empregando métodos alternativos indicadores de segurança e eficácia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e avaliar as características físico-químicas de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo o ácido ferúlico, utilizando etilcelulose como polímero;
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade para a determinação do teor de ácido ferúlico nas suspensões;
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do ácido ferúlico a partir das suspensões de nanocápsulas;
- Avaliar o potencial antioxidante do ácido ferúlico associado às nanocápsulas frente à inibição de radical livre;
- Avaliar o potencial mucoadesivo das nanopartículas *in vitro*;
- Determinar o grau de irritação *in vitro* do ácido ferúlico associado e não associado às nanocápsulas;
- Avaliar a citotoxicidade do ácido ferúlico nanoencapsulado em células mononucleadas humanas;
- Avaliar *in vitro* o potencial de prevenção, tratamento e/ou reversão de danos oxidativos em células mononucleadas humanas;
- Determinar a estabilidade das suspensões desenvolvidas;
- Obter produtos secos a partir da liofilização da suspensão de nanocápsulas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERs) e os mecanismos de neutralização através de antioxidantes fisiológicos (GENESTRA, 2007). Essas moléculas são altamente reativas por apresentarem, em geral, elétrons desemparelhados em sua camada de valência (radicais livres) e/ou baixa estabilidade química (espécies não radicalares). Alguns exemplos são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o óxido nítrico (NO_2) (LEONARDUZZI et al. 2010; PISOSCHI e POP, 2015).

Essas moléculas são geradas pelo metabolismo aeróbico, sendo subprodutos da respiração celular e/ou, ainda, através da ativação fagocitária. Ainda, sua geração pode ser potencializada e/ou causada por fatores extrínsecos, devido à exposição a agentes nocivos químicos e/ou físicos ambientais e ocupacionais, além de ser influenciada pelo estilo de vida, pois hábitos como o etilismo e tabagismo aceleram a oxidação fisiológica (KANDOLA; BOWMAN; BIRCH-MACHIN, 2015; POLJSAK; SUPUT; MILISAV, 2013; PISOSCHI e POP, 2015).

Fisiologicamente, esses podem ser convertidos a metabólitos menos reativos a partir de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Por sua vez, os antioxidantes não-enzimáticos possuem a capacidade de doar prótons e/ou elétrons a espécies reativas originando produtos menos nocivos ao microambiente tecidual. Dentre esses, os antioxidantes exógenos são maioria e desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostasia oxidativa, destacando-se as vitaminas A, E e C, além de fitocompostos como os carotenoides, ácidos fenólicos e polifenólicos. Ainda, apesar de minoritários, dentre os antioxidantes endógenos, destacam-se a glutatona, proteínas como ferritina e transferrina, e o complexo coenzima Q (LEONARDUZZI et al. 2010; POLJSAK; SUPUT; MILISAV, 2013; PISOSCHI e POP, 2015).

Dessa forma, quando em excesso, as EROs interagem com biomoléculas causando alterações estruturais como a peroxidação lipídica em membranas celulares, provocando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, agravando e/ou causando doenças inflamatórias. Além disso, os mediadores oxidativos e condições inflamatórias são citotóxicos e provocam a redução da viabilidade celular e a diminuição da capacidade de regeneração tecidual. Tais moléculas podem interagir com material genético celular, causando alterações nos reguladores do ciclo celular e nos processos relacionados à genotoxicidade, mutagenicidade e

carcinogênese. Por isso, a oxidação está envolvida em diversas patologias, desde processos inflamatórios e noceptivos, mutagênese e carcinogênese, síndromes metabólicas, cardiopatias, doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, além de condições psicossomáticas como ansiedade e depressão, podendo ser considerado um importante alvo terapêutico (LÓPEZ-ALARCONA e DENICOLA, 2013; MAULIK et al., 2013; MELLO-FILHO et al., 1983).

Nesse sentido, a terapia antioxidante tem sido uma estratégia para reduzir os impactos do estresse oxidativo nos processos patológicos supracitados, permitindo um avanço para a manutenção e/ou resgate da qualidade de vida e longevidade humana, contribuindo para a melhoria do prognóstico clínico dessas doenças, podendo, muitas vezes, ser utilizada como tratamento principal ou adjuvante (GUARATINI et al., 2007; SANTHAKUMAR et al., 2014; WILLETT, 2006).

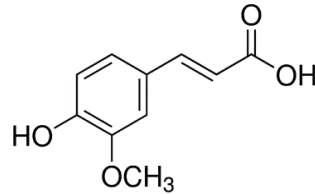
3.2 ÁCIDO FERÚLICO

O ácido ferúlico (AF) é um ácido fenólico encontrado de forma natural em espécies vegetais, em especial no arroz, trigo, milho e café, podendo estar presente também em frutas como na laranja e maçã (CHOWDHURY et al., 2016; GHOSH et al., 2017; ZHAO e MOGDASIAN, 2008). Essa substância é obtida comercialmente na forma de um pó fino praticamente branco com massa molar de 194,18 g/mol, possui solubilidade moderada em água e coeficiente de partição de 1,5, sendo classificado como irritante em contato com olhos (H319) e pele (H315) (Sigma-Aldrich, 2019; PubChem database, 2019).

Esse princípio ativo se destaca, principalmente, por sua pronunciada atividade antioxidante, atribuída primeiramente a mecanismos moleculares de inibição e/ou atenuação de ERs, relacionados a sua estrutura química, que é composta por um anel fenólico com uma cadeia lateral vinílica, que liga o grupamento carboxila ao anel (figura 1). Dessa forma, o AF inibe radicais livre através das seguintes características estruturais: i) o anel fenólico é o principal contribuinte para sua atividade antioxidante, uma vez que, em contato com espécies reativas, o mesmo doa hidrogênio às mesmas, gerando um radical fenoxila, o qual é estabilizado pelo fenômeno de ressonância envolvendo o anel aromático; ii) os radicais fenoxila podem se fundir e formar um derivado curcumínico e/ou a própria curcuma, que possui estabilidade adicional devido à estabilização da molécula por ressonância, além de apresentar propriedades de inibição de radicais; iii) a cadeia vinílica contribui para o fenômeno de ressonância, potencializando o efeito do grupamento carboxílico; iv) o grupamento carboxílico, quando em ressonância, se torna um novo sítio alvo de oxidação, contribuindo para a estabilização da

molécula e, adicionalmente, interage com membranas lipídicas, auxiliando na performance antioxidativa frente à peroxidação lipídica (GHOSH et al., 2017; KASKI et al., 2002; SGARBOSSA; GIACOMAZZA; DI CARLO, 2015; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007; ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

Figura 1 - Estrutura química do ácido ferúlico



Fonte: Sigma-Aldrich (2019)

O AF possui propriedades protetoras frente à peroxidação lipídica, carbonilação proteica e danos ao DNA, que além da capacidade de inibição de ERs estão relacionadas à propriedade de indução de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (AMBOTHY; PRASAD; BALUPILLAI, 2015; GRAF, 1992). Possui, também, atividade anti-inflamatória, que está relacionada à prevenção de efeitos oxidativos que geram mediadores inflamatórios e à modulação de agentes pró-inflamatórios, como citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (AMBOTHY; PRASAD; BALUPILLAI, 2015; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007). Ainda, é capaz de prevenir a carcinogênese, através de suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória, sendo capaz de modular os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, protegendo, dessa forma, os mecanismos de reparação do ciclo celular (AMBOTHY; PRASAD; BALUPILLAI, 2015).

Além disso, o ácido ferúlico tem sido explorado em diversos modelos de patologias que envolvem o estresse oxidativo. Dentre esses se destacam processos inflamatórios (GHOSH et al., 2017), prevenção de fotocarcinogênese através da aplicação cutânea (AMBOTHY; PRASAD; BALUPILLAI, 2015), citoproteção frente a condições oxidativas (KANSKI et al., 2002) e supressão da viabilidade celular em linhagens tumorais (ZHANG, X. et al, 2016); prevenção e tratamento de síndromes metabólicas como dislipidemias e diabetes e suas comorbidades, além de consequente cardioproteção (CHOWDHURY, et al. 2016; OHSAKI et al., 2008; SONG et al., 2016; WANG et al., 2017). Ainda, foi evidenciada grande potencialidade desse bioativo frente à neuro-oxidação e neuro-inflamação, dentre outras vias farmacológicas, sendo demonstrada eficácia em modelos relacionados a prejuízos cognitivos

(BOULTADAKIS; LIAKOS; PITSIKAS, 2010; WANG, et al., 2017), ansiedade e depressão (CHEN et al, 2015; LIU et al, 2017ab; ZENI et al., 2012ab), doenças neurodegenerativas (NAGARAJAN et al., 2015; SGARBOSSA, 2012; SGARBOSSA; GIACOMAZZA; DI CARLO, 2015) e neurotoxicidade (YU et al., 2006).

Contudo, o AF possui limitações em relação a sua performance biológica, como sua baixa biodisponibilidade por via oral, devido ao seu rápido metabolismo hepático através de mecanismos de conjugação, apresentando um tempo de meia vida de 10 a 30 minutos em roedores e de 42 minutos em humanos (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). Maurya e Devasagayam (2010) demonstraram a possibilidade de ácidos fenólicos, incluindo o AF, serem antioxidantes ou pro-oxidantes em dose e condições dependente. Essa característica foi observada frente à neutralização de radicais livres como 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e hidroxila em concentrações a partir de 20 e 5 μM , respectivamente. A última técnica citada envolve a reação de Fenton e os autores atribuem a ação pro-oxidante à capacidade dos ácidos fenólicos de reduzirem os íons de ferro (III). Neste sentido, as formas farmacêuticas de liberação prolongada podem ser uma alternativa para amenizar possíveis efeitos secundários, aumentando a segurança e eficácia de ativos de interesse farmacêutico (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2013; GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012; EL-HABASHY; ALLAM; EL-KAMEL, et al., 2016; SAVIAN et al., 2015).

Dentro deste contexto, a literatura descreve a associação do AF a alternativas tecnológicas, como a nanotecnologia. Os trabalhos relatados encontram-se descritos na tabela 1 e evidenciam a utilização de sistemas nanoestruturados para contornar a baixa biodisponibilidade do AF por via oral, melhorando a sua performance biológica e potencializando seus efeitos intrínsecos.

A exemplo, Granata e colaboradores (2018) desenvolveram suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando poli- ϵ -caprolactona, pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, contendo diferentes ácidos hidroxicinâmicos (ácidos caféico, cumárico, ferúlico e sinápico), com foco em aplicação nutracêutica. Essas suspensões apresentaram diâmetro de partículas na faixa nanométrica (224-253 nm) com distribuição homogênea (IPd<0,2), potencial zeta negativo (-11 a -7 mV), pH ácido (3,4 a 4,2) e eficiência de encapsulamento na faixa de 53 a 78 %. Além disso, ao submeterem as suspensões ao meio gástrico simulado, observaram uma liberação das substâncias de, aproximadamente, 30% após uma hora de experimento; contudo, para o meio intestinal simulado os compostos apresentam liberação superior a 90% após uma hora, evidenciando a potencialidade das nanocápsulas poliméricas em promover a liberação controlada dos ácidos hidroxicinâmicos, como o AF.

Tabela 1 - Trabalhos científicos envolvendo o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo AF e suas aplicações

Sistemas nanoestruturados	Método de preparação	Aplicações
Nanoesferas de PLGA* (Merlin et al., 2012)	Dupla emulsificação	Redução <i>in vitro</i> da viabilidade celular em linhagem de carcinoma de não-pequenas células pulmonares (NCI-H460).
Nanopartículas lipídicas sólidas (Trombino et al., 2013)	Homogeneização em alta velocidade e filtração	Inibição <i>in vitro</i> da peroxidação lipídica em microssomas cerebrais murinos frente a três diferentes indutores.
Carreadores lipídicos nanoestruturados (Carbone et al., 2014)	Inversão de fases por temperatura	Controle da liberação do AF e redução da viabilidade celular em linhagens de glioblastoma (U87MG).
Nanoemulgel (Harwansh et al., 2015)	Inversão de fases por composição (nanoemulsão)	Prevenção do estresse oxidativo na pele de ratos submetidos à radiação UVA.
Nanoesferas de quitosana (Pawanwar et al., 2016)	Gelificação ionotrópica	Redução do metabolismo fúngico em biofilmes de <i>Candida albicans</i> , mantendo-se citocompatível com células renais embrionárias (HEK-293) em comparação com o bioativo não encapsulado.
Carreadores lipídicos nanoestruturados (Zhang, Y. et al., 2016)	Microemulsificação a quente	Melhora da biodisponibilidade oral em relação ao bioativo livre, em ratos.
Carreadores lipídicos nanoestruturados (Hassanzadeh et al., 2018)	Homogeneização a alta pressão	Citoproteção de linhagens de células neuronais (PC-12), além de demonstrar neuroproteção frente a um modelo de hipoperfusão cerebral em ratos.

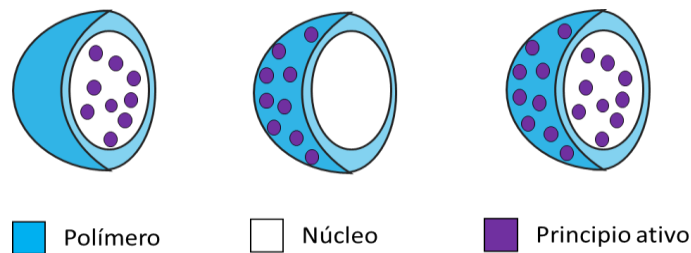
*poli(ácido láctico-co-ácido glicólico).

3.3 NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Sistemas nanoestruturados possuem o potencial de serem aplicados à farmacoterapia, por serem capazes de carrear princípios ativos, proporcionando características físico-químicas diferenciadas das evidenciadas em seu estado não associado, visando melhorar a sua eficácia terapêutica (D'MELLO; DAS; DAS, 2009; PATHAK, 2009). Dentre esses sistemas, destacam-

se as nanocápsulas poliméricas que são sistemas coloidais compostos por partículas que possuem um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo geralmente oleoso, podendo carrear substâncias ativas dissolvidas em seu núcleo e/ou adsorvidas à parede polimérica, conforme o ilustrado pela figura 2 (POHLMANN et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 2 - Representação gráfica de nanocápsulas poliméricas.



Fonte: próprio autor, baseado em SCHAFFAZICK et al., 2003.

As nanocápsulas são sistemas reservatórios e multiparticulados de princípios ativos, que possuem uma grande aplicabilidade na área farmacêutica e cosmética. Esses sistemas são capazes de conferir vantagens técnicas às formulações, como a proteção de substâncias frente a estresses físico-químicos e de controle de liberação. Além disso, o delineamento de nanocápsulas poliméricas pode proporcionar mucoadesão, gastrorretenção, melhora da solubilidade aparente, melhora da bioatividade intrínseca da substância carreada, além da diminuição de efeitos indesejados (GUTERRES; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; POHLMANN et al., 2014).

Dentre os polímeros utilizados destaca-se a etilcelulose que é um derivado semissintético da celulose, convencionalmente aplicado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Na indústria farmacêutica é utilizada em formas farmacêuticas orais ou tópicas como promotor de viscosidade, agente de revestimento, modificador de liberação de fármacos e aplicada na melhora da estabilidade de formulações (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Além disso, a etilcelulose é um polímero biocompatível, considerada segura por agências regulatórias como o FDA (United State Food and Drug Administration). Ainda, pode melhorar a segurança e performance biológica de bioativos associados a formas farmacêuticas convencionais, micro ou nanoparticuladas (ADELEKE, 2019; EL-HABASY et al., 2019)

Nesse sentido, nanocápsulas de etilcelulose como carreadores de substâncias de interesse farmacêutico têm sido desenvolvidas, visando a uma aplicação pela via oral, tópica ou pulmonar, em especial devido às características de biocompatibilidade desse polímero (CHASSOT et al., 2014; LORENZONI, 2015; MARCHIORI et al., 2017). Chassot e

colaboradores (2014) desenvolveram nanocápsulas de etilcelulose para administração pela via pulmonar do dipropionato de beclometasona, obtendo características físico-químicas adequadas aos sistemas coloidais, além de ser capaz de proteger o fármaco frente a fotólise, não demonstrando citotoxicidade *in vitro* e nem danos aos pulmões em roedores. Ainda, outros trabalhos evidenciaram que as nanocápsulas de etilcelulose, além de promover uma liberação controlada e proteção física frente à radiação (UVA e UVC), não apresentaram citotoxicidade *in vitro* para linhagens celulares de fibroblastos e células mononucleadas sanguíneas e potencializaram a capacidade de inibição de radicais livres; ainda, foram capazes de inibir a proliferação de linhagens celulares de melanoma e câncer de mama *in vitro* (MARCHIORI et al., 2017; LORENZONI, 2015).

4 DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento desse trabalho será apresentado na forma de artigo científico, o qual será submetido a periódico de interesse e contem os itens: resumo, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências.

ARTIGO - Ferulic acid-loaded nanocapsules: evaluation of mucosal interaction, safety and antioxidant activity in human mononucleated cells.

A ser submetido a periódico científico de interesse

FERULIC ACID-LOADED NANOCAPSULES: EVALUATION OF MUCOSAL INTERACTION, SAFETY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN HUMAN MONONUCLEATED CELLS

Camila Reck Rampelotto¹; Viviane Gonçalves Pereira²; Larissa da Silva Silveira³; Aline Rossato³; Alencar Kolinski Machado³; Michele Rorato Sagrillo³; Gündel, André⁴; Scheila Rezende Schaffazick⁵; Cristiane de Bona da Silva^{1,5}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³ Programa de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴ Universidade Federal do Pampa, Bagé, RS, Brazil.

⁵ Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

FERULIC ACID-LOADED NANOCAPSULES: EVALUATION OF MUCOSAL INTERACTION, SAFETY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN HUMAN MONONUCLEATED CELLS.

Abstract

Ferulic acid is a phenolic compound that has antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties; besides, it also presents cytoprotective activity. However, it has limited oral bioavailability, challenging its therapeutic application. In this way, the present investigation aimed to develop ferulic acid loaded-nanocapsule suspensions prepared with ethylcellulose (NC-FA) and evaluate their *in vitro* release profile, mucoadhesion and irritation potential with mucous membrane, *scavenging* capacity, cytotoxicity, cytoprotection and genoprotection against hydrogen peroxide-induced damage in human mononucleated cell (hMNC) culture. The nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer method and NC suspension without AF was also prepared (NC-B). Both formulations presented adequate physicochemical characteristics compatible with colloidal systems (NC-FA: 112 ± 3 nm; NC-B: 107 ± 3 nm). They had a homogeneous size distribution (PDI<0.2; Span<2.0) and negative zeta potential. In addition, the nanoparticulate system was able to promote the ferulic acid controlled release, increasing the half-life twice through the *in vitro* dialysis method using hydrochloric buffer pH 2.0. NC-AF and NC-B were able to interact with mucin, which is an indicative of mucoadhesive properties and the association of ferulic acid with nanocapsules showed decreased irritation in the choroallantoic membrane. Besides, the NC-FA did not present cytotoxicity in cells of peripheral blood and improved the ATBS radical scavenging capacity. Moreover, it prevented, treated and reversed oxidative conditions in a hydrogen peroxide-induced model in hMNC. Therefore, this novel nanocarrier may be a promising formulation for therapeutic applications that have an oxidative mechanism involved.

Keywords: Alternative methods. Cytotoxicity. Hydroxycinnamic acid. Polymeric nanoparticles. Scavenging capacity.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are metabolic by-products spontaneously and naturally produced through cellular energy metabolism and this production is influenced by environmental factors and lifestyle (KANDOLA, et al. 2015). These species are highly reactive and unstable and when they are excessive, they interact with biomolecules and structures that may cause damage to the tissue microenvironment, such as lipid peroxidation, protein carbonylation and damage to the cellular genetic material (GENESTRA, 2007; RAJENDRAN, 2014).

Regarding this, the ferulic acid (FA) is a phenolic compound known by its anti-oxidant effect, which can make it useful for the development of substances aiming therapeutic and prophylactic applications in pathophysiological processes associated with oxidative stress. FA was described as anti-inflammatory, photocarcinogenesis protector, cytoprotector in healthy cells and it also reduce the viability of tumor lineages. In addition it is useful in the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer's, metabolic syndromes as dyslipidemia and diabetes, as well as psychosomatic disorders such as anxiety and depression, physiological senescence and age-related diseases are reported to be treated with FA as well (BARONE et al., 2009; GHOSH et al., 2017; KANDOLA et al., 2015). However, this biocompound has limited water solubility and low oral bioavailability with a half-life about 40 minutes. Furthermore, as it is a weak acid, FA is mainly absorbed in the stomach and its longer residence time would favor its bioavailability (ZHAO, 2004; ZHAO and MOGHADASIAN, 2008; ZHANG et al., 2016). It is important to emphasize that this acid and its anti-inflammatory characteristics may cause long-term gastric irritation. In this way, a prolonged stomach-directed release may be a strategy to improve its bioavailability and reduce possible unwanted effects. This alternative would reduce plasma fluctuations, representing a gain for the FA therapeutic efficacy, also because potent antioxidants can become pro-oxidant at high concentrations (MAURYA and DEVASAGAVAM, 2010).

In this context, polymeric nanocapsules (NCs) are promising technological alternatives to carry substances of pharmaceutical interest. These systems are vesicular carriers composed of an oil core surrounded by a polymeric enclosure. Besides, these systems may promote a drug-controlled release, physicochemical protection, mucosal adhesion and gastrointestinal retention properties enhancing the pharmacological effects of the carried active substance, for instance, the antioxidant activity. The drug therapeutic performance is increased and drug

toxicity is reduced (ADELEKE, 2019; SIMONAZZI et al., 2018; CHASSOT et al., 2015; CHO et al., 2013; MORA-HUERTAS et al., 2009).

Therefore, this work aimed to develop ferulic acid-loaded ethylcellulose nanocapsules. In this sense, the proposed system could integrate prophylactic and therapeutic options based on pathologies related to oxidative stress. This may contribute to the improvement of patients' quality of life and longevity. Furthermore, it is intended to *in vitro* evaluate the indicative of biological performance of the developed systems, focusing on safety and potential to prevent, treat and / or reverse the oxidative damage in human monucleated cells.

2 Material and methods

2.1 Material

Ferulic acid (FA) (<99%), Span 80[®] (sorbitan monooleate), ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and acetonitrile HPLC grade were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Tween 80[®] (polysorbate 80), medium chain triglycerides (MTC) e ascorbic acid was acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil); methanol chromatographic grade was provided by AppliChem Panreac/ITW companies (Ottoweg, Alemanha). Absolute ethyl alcohol ACS, methanol UV/HPLC grade, disodium EDTA and PA acetone was supplied by Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, Brazil); Ethycellulose (Ethocel[™] Standard 20 Premium) was donated by Colorcon[®] (Cotia, Brazil). Hydrogen peroxide (H₂O₂) was obtained from Synthlab (Diadema, Brazil). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and hydrochloric acid were obtained from Proquímios Reagentes (Rio de Janeiro, Brazil). Phosphoric acid and sodium hydroxide (NaOH) were acquired from Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, Brazil). Potassium chloride (KCl) and PA acetone were obtained from Química Moderna (Barueri, Brasil).

2.2 Analytical procedures

The FA quantification in the nanocapsules was determined by liquid chromatography (HPLC). The experiments were performed on a Shimadzu LC-10A HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT model pump, a UV/VIS SPD-M20A detector (Diode array detectors – PDA) at 323 nm, an SIL-20A HT auto-sampler model (injection volume of 20 µL) and a CBM-20A system controller. The separation was obtained using a RP C₁₈ Inertesil

column (150 x 4.60 mm; 5 μ m; Gl science) coupled with a C₁₈ guard column at room temperature. In order to develop a stability-indicating method, the FA forced degradation study (0.5 mg/mL EtOH 25%) was carried out according to the following conditions: acid hydrolysis (HCl 1.0 M until six days), basic hydrolysis (NaOH 1.0 M until six days) and photolytic (UVA light by 60 min.; 0.5 mg/mL methanolic solution) conditions (BLESSY et al., 2014). Thus, the mobile phase was chosen based on chromatographic parameters such as peak purity, resolution and theoretical plates over photolysis degradation product. The method for the AF determination was validated considering the following parameters: specificity, linearity, accuracy and precision, observing specific guidelines (ANVISA, 2015 and 2017; ICH, 2005).

An FA standard solution (S-AF; 0.5 mg/mL) was diluted by range of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 μ g/mL in methanol for linearity evaluation (n=3, using linear least-square regression analysis). The chromatographic method specificity was evaluated by comparison of the chromatograms obtained for S-AF, NC-AF and NC-B. To evaluate the accuracy, the recovery assay was performed spiking the NC-B with known S-AF concentrations (8.0, 10.0 and 12.0 μ g/mL; n=3). The repeatability and intermediate precision were performed in similar experimental conditions, intra-day and inter-day analyses were carried out with different analysts, respectively, then it was calculated RSD % (n=12).

2.3 *Nanocapsule suspensions preparation*

Nanocapsule suspensions were prepared (n=3) by the interfacial deposition of a preformed polymer (FESSI et. al, 1989). An organic phase constituted of ethylcellulose (0.20 g), Span[®] 80 (0.154 g), MCT (0.30 g) and acetone (108 mL) was kept under moderate magnetic stirring at 40 °C for the complete dissolution of the components. After, FA (0.010 g) was added to the organic phase and dissolved under stirring. In sequence, the organic phase was poured into 108 mL of a Tween[®] 80 aqueous phase (0.154 g) and magnetic stirring was maintained for 10 minutes. At the end of the process, the organic solvent and part of the water were eliminated by evaporation under reduced pressure. EDTA (0.010 g) was added to a final phase, and a volume was completed to 20 mL, reaching the FA concentration of 0.5 mg/mL (NC-FA). For comparison purposes, formulations without the bioactive (NC-B) were also prepared. The suspensions were stored at room temperature and protected from light (amber glass bottle).

2.3 *Nanocapsule suspensions characterization*

2.3.1 *Granulometric distribution, particle size and zeta potential analysis*

The granulometric distribution profile (n=3) was determined by laser diffraction (Mastersizer[®] 3000, Malvern instruments, UK) by wet dispersion under obscuration range of about 10%, it was used distilled water as a dispersing medium and 1.47 was refractive index.

The NC-FA and NC-B mean particle size and polydispersity index (PDI) were determined by photon correlation spectroscopy (PCS), after the samples dilution in ultrapure water (1:500, v/v) using a Zetasizer[®] Nano-ZS ZEN 3600 model (Malvern Instruments, UK). With the same equipment, zeta potential was measured by microelectrophoresis after NCs dilution in 10 mM NaCl (1:500, v/v).

2.3.2 *FA content and encapsulation efficiency*

Total FA content in colloidal systems (n=3) was determined by HPLC method described above after sample dissolving (10.0 µg/mL) and extraction with methanol by sonication for 5 minutes. The samples were filtered in a 0.45 µm membrane and then analyzed. The FA encapsulation efficiency (EE%) was estimated using the ultrafiltration/centrifugation technique. For this, 300 µL of NC-FA were placed in an Amicon[®] ultra centrifugal filter device (10,000 MW, Millipore) and centrifuged (2200×g for 10 min.). The ultrafiltrate was diluted 50 times and analyzed by the HPLC method. The EE % was calculated by the difference between FA total concentration (NC-FA) and free FA concentration (ultrafiltrate).

2.3.3 *Morphological analysis and pH measure*

The morphological analysis of NC-FA and NC-B were performed by Atomic Force Microscopy technique using the equipment Agilent Technologies 5500. The samples were diluted in ultrapure water (1:10, v/v), a drop of the solution was dripped on cleaved mica and left to dry at room temperature. The images were obtained at room temperature, using non-contact mode with high-resolution tips SSS-NCL (Nanosensors, force constant 48 N/m, resonance frequency 154 kHz). The images were captured using the PicoView 1.14.4 software (Molecular Imaging Corporation) and analyzed using PicoImage 5.1.

The pH values of the NC suspension were verified by direct potentiometry in a previously calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, Brazil) at room temperature (n=3).

2.4 *In vitro ferulic acid release from nanoparticle suspensions*

The *in vitro* release study was conducted according to the dialysis bag diffusion technique in triplicate batches. Under *sink* conditions, cloridric buffer pH 2.0 was used as medium and the experiment was performed at 37 °C. The dialysis bag (10,000 Da, Sigma Aldrich) containing 2.0 mL of NC-AF or S-AF (0,5 mg/mL EtOH 50%) was immersed in 50 mL of medium under constant moderate stirring. At predetermined periods, an aliquot of 1 mL of the external medium was withdrawn and replaced by the same fresh medium volume. The FA content in medium was determined by HPLC, according to previously mentioned conditions in *section 2.2*. For the assay, the linearity method was evaluated at 0.25 – 25.0 µg/mL (Detection limit = 0.06 µg/mL; Quantification limit = 0.18 µg/mL).

2.5 *Evaluation of ABTS scavenger activity*

The ABTS radical scavenging capacity of the formulations was based on the method described by Re and co-workers (1999) and Matiazzi and co-workers (2019). In this work, the ABTS radical cation concentration was 50 µM in the plate well and it was used ultra-pure water as a diluent. Thus, the NC-AF, S-AF (DMSO 10%) and NC-B samples were tested at 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.5 µg/mL relative to FA concentration. Besides, an ascorbic acid aqueous solution (0,5 mg/mL – S-AA) was used as positive control, in the same conditions. It was also tested an EDTA aqueous solution at max tested concentration and DMSO 10% (S-AF vehicle) and no difference was observed in relation to the negative control absorbance ($p > 0,05$; *t-test*). The radical scavenging activity was expressed as follows:

$$SC (\%) = 100 - \frac{(Abs - Abb)}{Abc} \times 100$$

Where *SC (%)* is the scavenging capacity in percentage, *Abs* is the absorbance of the incubated with radical, *Abb* is the blank sample absorbance without radical and *Abc* is the negative control absorbance. (n=3)

2.6 *Mucoadhesive property determination*

The NC-AF and NC-B suspensions were diluted (1:500, v/v) in porcine type II mucin (0.1%, w/v) to evaluate mucoadhesive properties. Thus, the mean particle size and zeta potential were measured according to the procedures described in section 2.3.1. before and after being on mucin incubation (30 min). (DE-LIMA et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2005).

2.7 *Evaluation of nanocapsule suspensions irritation test*

The conventional Hen's Egg Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) test was used to evaluate the nanocapsule suspensions irritation potential. It was tested (n=6): NC-FA, NC-B, S-FA (in ethanol 20%), vehicle (ethanol 20%), EDTA solution (0.05%, w/v), negative (saline) and positive controls (NaOH 0.1 M and Sodium Lauryl ether Sulphate 1% w/v - SLS). The assay followed the ICCVAM (2010) protocol. It was used 10-day-fertilized chicken eggs, so the eggshell was carefully removed and the shell membrane was saline washed and it was carefully removed, exposing the CAM where it was applied 300 μ L of samples. After 20 s, the samples were washed with saline solution and the CAM was monitored until 300 s to verify the occurrence of hemorrhage, vascular lysis and coagulation events and their respective times were registered.

This way, events over time periods were scored according to the following: Lysis score 5 (<0.5 min.), 3 (<2 min.) and 1 (<5 min.); Hemorrhage score 7 (<0.5 min.), 5 (<2 min.) and 3 (<5 min.); Coagulation score 9 (<0.5 min.), 7 (<2 min.) and 5 (<5 min.). The classification occurred according to Luepke (1985) adding the scores: up to 0.9 – practically none irritant; 1 to 4.9 – slight irritant; 5 to 8.9 - moderate irritant; 9 and above strong irritant. (Luepke and Kemper, 1986)

2.8 *Blood collection and cells culture*

A prospective *in vitro* study was performed used human mononuclear cells of peripheral blood (hMNC) obtained from discarded samples without identification from the Laboratory of Clinical Analysis of the Universidade Franciscana (Santa Maria - RS, Brazil) with Ethics Committee approval (CAAE: 31211214.4.0000.5306). The sample was taken by venous puncture with heparine tube (vacutainer[®]). After this, it was used for MCPB separation through centrifugation by density gradient (Histopaque[®] - 1077) and the 2×10^5 cells/mL concentration

was adjusted after the count in a Neubauer's chamber (trypan blue 0.4%, w/v). All culture cell manipulation was conducted under laminar flow.

2.8.1 Cytotoxicity assay

The nanocapsules cytotoxicity was evaluated in terms of cells viability and ROS levels using the experimental protocol described by Sagrillo and co-workers (2015). The tested samples (n=3) were NC-FA (FA-loaded nanocapsules), NC-B (blank nanocapsules), FA with surfactants dispersion (D-FA), at 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FA related concentrations. The D-FA was prepared with the same surfactants and concentrations in relation to NC suspension (polysorbate 80 and sorbitan monooleate, both at 0.77% w/v). The negative control was composed of cells and culture medium and the positive control by cells, culture medium and H_2O_2 (100 μM). After the treatments, the plates were kept at 37 °C (5% CO_2) for 24 h, and it was applied the MTT, diclofluorescein diacetate and nitric oxide assay. In another moment, the dispersion of surfactants without FA (vehicle) at concentrations higher than the tested ones had no impacts on the markers.

2.8.2 Evaluation of cytoprotecting and genoprotection from hydrogen peroxide

To test NC-AF and D-AF protective effects (0.125, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cell viability, oxidative stress and DNA damage in human lymphocytes, it was performed a similar protocol to the one described by Sagrillo and co-workers (2015). It was investigated a way to apply the developed formulation on damage in cells culture induced by H_2O_2 (100 μM). This way, it was proposed a prevention model (samples were applied in cells culture 2 h before induction), a treatment model (samples and induction at the same time) and a reversion model (samples were applied 2 h after induction). The negative control was composed of cells and culture medium, and the positive control by cells, culture medium and hydrogen peroxide (100 μM). After this, the plates were kept at 37 °C (5% CO_2) for 24 h, and it was applied the MTT, DNA picogreen and nitric oxide assay. The experiment was performed in triplicate.

2.8.3 Cell viability

The MTT assay was performed according to Mosmann (1983). After the incubation time, 20 μL MTT solution at 5 mg/mL (0.01M PBF buffer pH 7.4) was added to cells that were

kept under shaking, light protection and at 37 °C (5% CO₂) for 4 h. In sequence, the supernatant was removed from the wells and the cells washed with PBS and then resuspended in 200 µL of DMSO. The absorbance was determined with ELISA reader (560 nm). The cytotoxic potential was calculated in relation to the negative control.

2.8.4 *Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay*

To verify the total free radicals' ratio, the reagent 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used according to Esposti (2002). This reagent has the capacity to cross the cell membrane being deacetylated by mitochondrial enzymes what produces 2,7-dichlorodihydrofluorescein. This 2,7-dichlorodihydrofluorescein reacts with reactive oxygen species (ROS), mainly H₂O₂, and produces 2,7-dichlorofluorescein (DCF) that emits fluorescence. Therefore, the fluorescence in the spectrofluorimeter equipment (Shimadzu, Japan) was determined based on the wavelengths of 488 nm excitation and 525 nm emission. The result was expressed as a percentage of DCF in relation to the negative control.

2.8.5 *Fluorimetric DNA quantification*

The fluorimetric DNA quantification assay was performed following the methodology described by Sagrillo et al. (2015) to complement the cell viability determination. Thus, for the quantification of free DNA the (Invitrogen; *life technologies*) DNA-PicoGreen[®] reagent was used, which has as a principle a fluorescent dye that binds to the double-stranded DNA formed when the treatment causes disruption and cell death. The experiment was performed in 96-well plates containing culture medium, cells and treatment. After 24 h of incubation (37 °C and 5% CO₂), the dye was added, then the experiment was incubated for more 5 min under the same conditions and the results were measured using the spectrofluorimeter at wavelength of 480 nm of excitation and 520 nm of emission.

2.8.6 *Oxide nitric assay*

After the incubation time (2.8.1 and 2.8.2), 100 µL supernatant was taken to another 96-well plate, where it was added 100 µL of Griess reagent, and kept at room temperature for 15 min and then measured on spectrofotometer (540 nm). This assay allows detecting organic nitrite through the revelation by azo (N-1-naphthylenediamine-bichloromethylhydrate)

compound that interacts with the diazonium salts showing pink color in the sample. (CHOI et al., 2012; NOH et al., 2015)

2.9 Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation. For statistical inferences it was used one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls or Dunnet test, as indicated in each data. In addition, Student's t test was used to compare two means. The GraphPad Prism software version 5 (San Diego, CA, USA) was used to perform these analyses. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Analytical method development and validation

In preliminary tests, it was possible to establish a starting chromatographic condition for the forced degradation assay. Besides that, in a preliminary photolise test was noticed a chromatographic signal about the photolise degradation product that presented coelution with the FA peak. This way, it was possible to optimize the analytical method allowing FA separation ($\alpha > 2.0$; purity peak index > 0.99 and theoretical plates > 2000) applied as mobile phase acid water pH 2.6 (phosphoric acid):acetonitrile:methanol (64:18:18, v/v/v) pumped on 1.0 mL/min. and detection at 323 nm. This method was used for other degradation assays where it was noticed that FA was susceptible to acid hydrolyses with residual content decrease at 87 ± 4 % on one day and 53 ± 1 % on six days. Meantime, FA was not susceptible to basic hydrolysis ($p > 0.05$; *t-test*). Besides, in this condition it was not possible to see chromatographic signals about basic and acid conditions.

Considering this, the method was validated and can be considered specific, it showed that no interference from the nanostructures constituents in the verified FA peak. The FA purity peak was confirmed with a photodiode array (peak purity index > 0.99); it was linear because it showed significant linear regression ($p < 0.05$) without linearity deviation ($p > 0.05$) and the equation was calculated by the least square method ($y = 94345x - 32173$; $r = 0.9996$). It was precise showing an adequate intra-day (SDR = 1.6 %) and inter-day precision (SRD = 1.8 %) since the RSD values were lower than 2.0 % and accurate because the average recovery (three levels of concentration) was 99.2 ± 1.3 % (SDR < 2.0).

3.2 *Nanocapsule suspensions characterization*

After preparation, both NC-AF and NC-B presented homogeneous and colloidal systems with milky appearance and no precipitation signs. The analysis of NC-FA and NC-B by laser diffraction demonstrated that 90% of the particles were lower than $0.366 \pm 0.052 \mu\text{m}$ and $0.370 \pm 0.065 \mu\text{m}$, respectively. A homogeneous particle size distribution was evinced with $\text{Span} < 2.0$ and $\text{Pdl} < 0.2$ for both formulations (NC-FA: 1.22 ± 0.13 and 0.10 ± 0.01 ; NC-B: 1.10 ± 0.22 and 0.13 ± 0.01 , respectively). The NC-FA presented mean size diameters of $112 \pm 3 \text{ nm}$ and NC-B of $107 \pm 3 \text{ nm}$ by PCS (first choice technique for colloidal range). In addition, both particles presented spherical shape, colloidal size range (figure 1) by Atomic Force Microscopy. Besides, the zeta potential was negative for both formulations with values of $-7.0 \pm 0.1 \text{ mV}$ for NC-FA and $-7.1 \pm 0.4 \text{ mV}$ for NC-B. Moreover, the FA total content in the suspension was near to theoretical value ($100.9 \pm 0.9 \%$) and encapsulation efficiency was close to 50 %. Also, the pH obtained for NC-FA and NC-B were 4.1 ± 0.1 and 4.9 ± 0.1 , respectively.

3.3 *In vitro ferulic acid release from nanoparticles suspension*

Analysis showed that nanocapsules promoted FA controlled release starting at 1 h ($p < 0.05$; *t*-test) as shown in figure 2. It possible to note that S-FA realease about 100% at 4 h, while FA realease from the NC was about 85% at the same time. The total FA release when associate to nanosystems was reached within 24 h.

3.4 *Evaluation of ABTS scavenger activity*

In this assay, the FA antioxidant potential showed more ABTS radical scavenging capacity than the ascorbic acid (S-AA) on tested conditions. Besides, the nanocapsules improved the FA radical inhibition capacity in all tested concentrations (figure 3).

3.5 *Mucohesive property determination*

It was possible to notice that both nanocapsules increased mean particle size after incubation ($p < 0.05$, *t*-test) indicating interaction between the nanoparticles and porcine type II mucin (NC-FA: $260 \pm 11 \text{ nm}$; NC-B: 373 ± 59 ; detected by PCS). Meantime, it was evident the

increase in module of zeta potential after incubation (NC-FA: -10.2 ± 0.4 mV; NC-B: -9.7 ± 0.6 mV; $p < 0.05$, *t-test*).

3.6 *Evaluation of nanocapsule suspensions irritation test*

Moreover, in the HET-CAM assay, all controls had the acceptance criteria from non-irritating to negative control and strongly irritating to positive controls, as shown in table 1 (ICCVAM, 2010). In addition, the EDTA solution and ethanol 20% did not present measurable irritation events (non-irritating). Thus, the association of FA with nanocapsules was able to reduce the FA irritation potential in solution, changing from strongly irritating to slightly irritating, such as the nanocapsules without FA.

3.6 *Cytotoxicity and genotoxicity assay*

As observed in figure 4, the tested formulations did not affect cell viability and nitric oxide levels at tested concentrations. On the other hand, it was observed that the dispersion and the nanocapsule suspension containing FA decreased total ROS levels (DCF levels) at concentrations of 1.0 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$ as for the negative control. Besides, it was not performed the fluorimetric DNA quantification because no cell damage was observed in these safety tests. Also was applied a dispersion only with the surfactants in a concentration greater than the teste curve (equivalent to a 3.3 $\mu\text{g/mL}$ point), and was not evidenced significative differences in relation to negative control ($p > 0.05$), ensuring that the surfactant system does not influence the tests performed.

3.7 *Evaluation of cytoprotection and genoprotection from hydrogen peroxide damage*

As shown in figure 5, overall both D-AF and NC-FA were able to maintain the cell viability of human mononucleated cells in the prevent model. In addition, both samples were able to as reduce the levels of nitric oxide (NO) and double stranded DNA (dsDNA) of the supernatant, relative to positive control (H_2O_2), but only the NC-AF was effective at the lowest concentration tested.

Furthermore, overall both samples treated the cells while maintaining their viability and reduce NO levels, in relation to positive control. However, the genoprotection was just observed with the NC-AF (0.125 - 0.5 $\mu\text{g/mL}$) with a reduction in dsDNA levels. Moreover, NC-AF was

able to improve cell viability at concentrations of 0.25 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and D-AF only at concentrations of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ over damage induced by H_2O_2 in the reversion model. Besides, both formulations maintained nitric oxide levels. Also, about genotoxicity in the reversion model there was not significant differences regarding the negative control for both formulations in the tested concentrations. As well in the dsDNA levels, both samples presented differences in relation to positive control at a few tested concentrations, in a not dose-depending way.

Moreover, was possible to observe that in all models tested, the formulations present cell proliferation in some concentrations, not being correlated with a specific formulation or exhibiting a dose-dependent relation.

4 Discussion

In this work, it was possible to developed FA-loaded nanocapsule suspensions, presenting size, dispersion, morphology and surface charge compatible with those of colloidal suspensions, according to the range obtained for ethylcellulose nanocapsules (CHASSOT et al., 2015; MARCHIORI et al., 2017). Regarding the FA content in nanocapsules, the stability indicating analytical method was validated, showed specificity, linearity, precision and accuracy according to Brazil and ICH guidelines. The FA content was very close to theoretical value (0.5 mg/mL), indicating minimal losses and discarding a possible compound degradation throughout the formulation preparation process. In addition, encapsulation efficiency was about 50%, indicating that a portion of FA should be partitioned in the aqueous phase. This result may be explained by the FA log P value of 1.5 (PubChem database, 2019), which demonstrate a drug preference for nonpolar vehicles at the same time the bioactive may diffuse to external aqueous phase (GEHRCKE et al., 2018).

Furthermore, it was possible to evidence that the nanocapsules were able to modify the FA release starting one hour of experiment compared to their solution. This result indicates that in the first moment there is the release of FA that is not encapsulated, around 50%. From that point the control release was provide by the encapsulation of FA was evidence. These data are consistent with other studies using ethylcellulose as a release-modifying agent, including nanoparticulate systems (CHASSOT et al., 2015; LOKHAND et al., 2013ab; MARCHIORI et al., 2017). Also, Granata and co-workers (2018) developed poly- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules with ferulic acid, getting a particle size close to 250 nm and homogeneous size distribution, negative zeta potential (-11 mV) and also partial encapsulation efficiency (62%). Also, this particle was able to promote controlled FA release in simulated gastric medium

(around 30% in 1 hour) compared to intestinal simulated medium (around 90% in 1 hour). In this way, the release control is a strategy to improve the biologic performance and the bioavailability of compounds of pharmaceutical interest, such as FA, which has a plasma half-life of about 40 minutes (GRANATA et al., 2018; ZHANG et al., 2016; ZHAO and MOGHADASIAN, 2008).

The gastrointestinal retention is a property that can be delineated by polymeric nanocapsules, and it is usually mediated by mucoadhesion properties, which are potentiated by their small particle size and high surface area, promoting a close contact with the mucosa. This association with drugs creates an absorption window in the stomach that may increase residence time in the absorption place with the potential to improve their bioavailability and therapeutic efficacy (STREUBEL et al., 2006; ZHAO et al., 2004). It was evaluated the *in vitro* interaction between nanoparticles and mucin, a main mucus glycoprotein. Therefore, it was possible to observe the increase in mean particle size, possibly caused by aggregates formation between nanocapsules and mucin and the expansion of hydrodynamic ratio due to mucin adhesion to the particle surface. Besides this, the electrostatic attraction between mucin (negative charge) and positive particles is well known in the literature (DE-LIMA et al., 2017) but the increase in modulus of zeta potential supports the hypothesis that there is interaction of mucin with particles because the negative interfacial charge is reinforced by a similar charge. Chaves and co-worker (2017) showed that both cationic and anionic nanoparticles could be mucoadhesive. Moreover, it is presented in other works the application of ethylcellulose in mucoadhesive and gastroretentive dosage forms (ADELEKE, 2019; BALZUS et al, 2017). In this way, Zhang and co-workers (2016) developed nanostructured lipid carries and solid lipid nanoparticles containing ferulic acid, which were able to improve FA bioavailability in rats. This, therefore, the nanosystems increased the absorption surface area and the residence time in the gastrointestinal tract in conjunction with the controlled release promoted by the nanosystems (ZHANG et al., 2016).

Although the HET-CAM alternative method was validated for eye irritation because of the method's high sensitivity, it can be applied to predict irritation in other mucous membranes, such as a gastric mucosa, initially avoiding *in vivo* testing. Thus, this method was applied and it was possible to notice that NC-AF was less irritant in comparison with S-AF, which presented hemorrhagic and coagulation events. Being in agreement with literature results, a weak acid has the characteristic of causing or potentiating gastric irritation. Therefore, regarding the HET-CAM alternative method results, it was demonstrated that nanocapsules have the potential to reduce mucosal irritation (SAVIAN et al., 2015). Besides that, EL-HABASY and co-worker

(2016) presented the nanoencapsulation of piroxicam as an alternative to reduce its ulcerogenic properties applying the ethylcellulose as polymer.

To complete the safety assessment in this work, *in vitro* cytotoxicity assays were performed using hMNC. Both suspensions (NC-FA and NC-B) applied showed no signs of cell culture damage, no decrease in viability and no changes in NO levels, as well as D-FA. On the other hand, it was observed a decrease in the total level of ROS in the highest concentrations used, for NC-FA and D-FA, what is feasible due to the antioxidant properties associated with FA (GRAF, 1992). In addition, as no signs of cell injury were observed, the genotoxicity test was not performed. According to the literature, polymeric nanocapsules loaded with antioxidant actives present no cytotoxicity in similar methods (FERREIRA et al., 2018; MARCHIORI et al., 2017).

The free radical inhibition potential of the nanocapsules was evaluated through the ATBS cationic radical based assay because it is entirely performed in aqueous medium, which allows maintaining the integrity of the nanostructured system. The FA scavenging capacity could be explained by the presence of two proton donor groups in its structure, neutralizing free radicals and keeping stabilized by the resonance phenomenon (GRAF, 1992; GHOSH et al., 2017). Also, some authors attribute the improvements in scavenging capacity assays to the nanostructures, because they have small particle size, high surface area and increased an apparent solubility of the carried assets what justifies the improvements (GEHRCKE et al., 2017; MARCHIORI et al., 2017; MATIAZZI et al., 2019).

Finally, we can demonstrate the antioxidant activity of NC-AF in a more complex model than the previous one. To explore the potentialities of the developed suspension, we applied models based on the prevention, treatment and reversal of oxidative damage in hMNC. Thus, KANSKI and co-workers (2002) also demonstrated the FA effects in preventing AAPH-induced cell toxicity (hippocampal neuronal cells) maintaining cell viability, reducing total ROS levels, lipid peroxidation and protein carbonylation through anti-oxidative pathways. FA was described as having a potential to neutralize reactive nitrogen and oxygen species, as well as its association with nanoparticles (HASSANZADEH et al., 2018; KETSAWATSAKUL et al., 2000; TROMBRINO et al., 2013). Such potential reinforces its ability to maintain nitric oxide levels, which was observed in this study in all proposed induction models. Moreover, the NC-AF did better than D-FA in the treatment model, mainly because of genoprotection supported by AMBOTHY and co-workers (2015) work. They demonstrated the FA anticarcinogenic potential through complex mechanisms involving more than radicals

inhibition, the induction of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GPx), the modulation of inflammatory mediators and p53 tumor suppression gen (AMBOTHI et al., 2015).

In the same way, it was possible to observe that in some concentrations of the formulation containing ferulic acid there was an increase in cell viability, without genotoxicity evidence, this effect may be explained by the inflammatory modulation reported for ferulic acid (AMBOTHI et al., 2015). Similar to that Capeleto and co-workers (2015) that evaluated the resveratrol effect on human peripheral blood mononuclear cells, found a significant increase of lymphocyte viability by MTT assays. Also, Ferreira and co-workers (2016) observed an increase in cell viability when applying pomegranate oil nanoemulsions to human mononucleated cells, attributing this result to the antioxidant and anti-inflammatory related effects of this phytomaterial of pharmaceutical interest.

Thus, some studies show that nanoencapsulation of potent antioxidants may favor *in vitro* efficacy (TROMBINO et al., 2013), which may be associated with the prolonged release provided by these systems, since it has been demonstrated that potent antioxidants can become pro-oxidant in high concentrations (MAURYA and DEVASAGAYAM, 2010). This would explain the results obtained for the proposed oxidation reversal model because NC-AF was able to maintain cell viability at intermediate concentrations. Despite, both samples tested (NC-FA and D-FA) did not prove to be dose-dependent for the reversion model about genoprotection, they did not show difference between the negative control on dsDNA levels, confirming they have moderate cytoprotection and genoprotection in the reversal model. Thereby the objective of the work was achieved because of the success in the evaluation of the antioxidant activity of ferulic acid-loaded nanocapsules from different perspectives, drawing a comparative profile between their respective dispersion in different therapeutic situations applying an alternative *in vitro* cell culture model through the measure of cytological health markers.

5 Conclusion

Nanocapsules containing ferulic acid were able to prevent, treat and reverse oxidative and nitrosative damage induced by hydrogen peroxide, as well as promote genoprotection in the same models. In conclusion, ethylcellulose nanocapsules may be a promising platform for ferulic acid delivery considering the set of results that indicate the potential of this system to improve bioavailability and reduce possible undesirable effects. Besides, the system improved the antioxidant activity making possible its application in the prevention, treatment and reversal

of neurodegenerative and aging-associated diseases, metabolic syndromes and inflammatory processes where oxidative mechanisms are reported to be involved.

REFERENCES

- ADELEKE, O. A. Premium ethylcellulose polymer based architectures at work in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 1, p. 1-15. 2019.
- AMBOTHI, K. et al. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 72-78. 2015.
- ANVISA (AGENCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução de diretoria colegiada - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015: Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **DOU nº 233 de 07 de dezembro de 2015**.
- ANVISA (AGENCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017: Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **DOU nº 141 de 25 de julho de 2017**.
- BALZUS, B. Formulation and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin the corneal epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 122-130. 2017.
- BARONE, E. et al., Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, v. 10, p. 97-108, 2009.
- BLESSY, M. R. D. P. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.
- CAPELETO, D. et al. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, v. 16, n. 5, p. 621-630, 2015.
- CHASSOT, J. M. et. al. Beclomethasone dipropionate-loaded polymeric nanocapsules: development, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* evaluation of acute lung injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-10, 2015.
- CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 2093-2110, 2013.
- CHOI, W.S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cell Immunol.** 2012 v. 280, n. 2, p. 164-70. 2012. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.12.007.
- DE-LIMA, J. A. et al. Novel Pemulen/Pullulan blended hydrogel containing clotrimazole-loaded cationic nanocapsules: Evaluation of mucoadhesion and vaginal permeation. **Materials Science & Engineering C**, v. 16. 2017.

EL-HABASHY, S. E. Ethyl cellulose nanoparticles as a platform to decrease ulcerogenic potential of piroxicam: formulation and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2369-2380, 2016.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, p. 335-340, 2002.

FERREIRA, L. M et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 2968-2977, 2016.

FERREIRA, L. M. et al. Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 91, p. 1, 2018.

FESSI, H. et al. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v. 19, p. 1807-1819, 2007.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science & Engineering C- Materials for Biological Applications**, v. 74, p. 279-286, 2017.

GEHRCKE, M. et al. Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its antinociceptive action in acute pain animal models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 133-141, 2018.

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.

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

HASSANZADEH, P. et al. Ferulic acid-loaded nanostructured lipid carriers: A promising nanoformulation against the ischemic neural injuries. **Life Science**, v. 193, p. 64-76, 2018.

ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. **ICCVAM In Vitro Ocular Evaluation Report**. 2010.

ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use). **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. 2005. Available at: < <https://www.ich.org>>.

KANDOLA, K. et al. Oxidative stress – a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 1-8, 2015.

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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 273-281. 2002.

KETSAWATSAKUL, U. A reevaluation of the proxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 279, p. 692-699. 2000.

NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **J Ethnopharmacol**. 2015. pii: S0378-8741(15)00039-2. doi: 10.1016/j.jep.2015.01.024.

LOKHANDE, A. B. et al. Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and in vitro release study of drug loaded nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 414–420, 2013a.

LOKHANDE, A. B. et al. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 421–426, 2013b.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, 1986.

MARCHIORI, M. C. L. et al. Nanoencapsulation improves scavenging capacity and decreases cytotoxicity of silibinin and pomegranate oil association. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3236-3246, 2017.

MATIAZZI, J. et al. Incorporation of 3,3'-Diindolylmethane into Nanocapsules Improves Its Photostability, Radical Scavenging Capacity, and Cytotoxicity Against Glioma Cells. **AAPS PharmSciTech**, v.49, p. 20-49. 2019.

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, p. 3369-3373. 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.

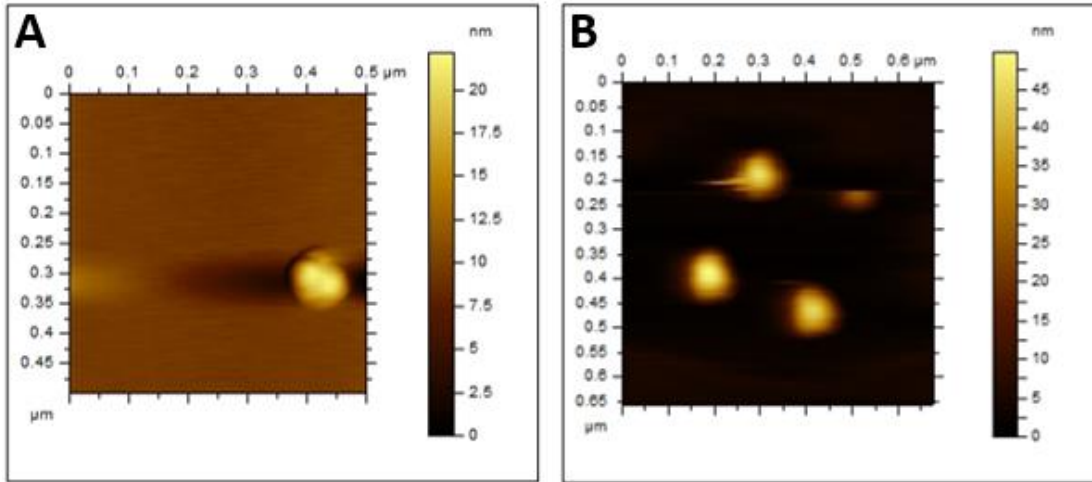
MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, v. 1–2, p. 55–63. 1983.

PubChem database. Ferulic Acid. **U.S. National Library of Medicine**. Available in <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>>, accessed at December 2019.

RAJENDRAN, P. Antioxidantes and human diseases. **Clinica Chimica Acta**. V. 436, p. 332-347. 2014.

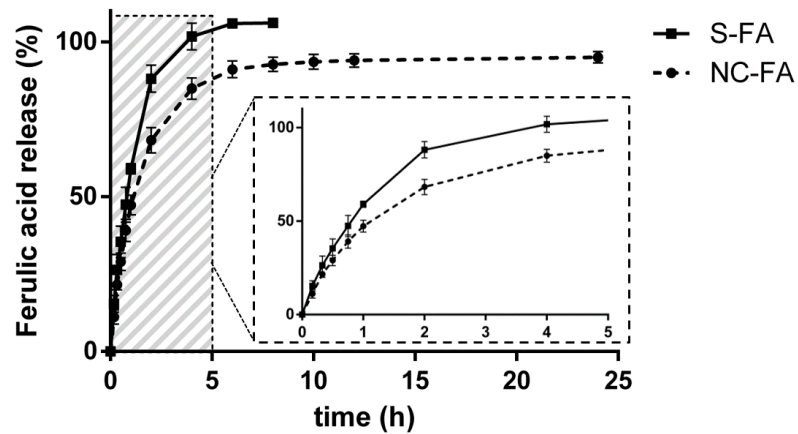
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- SAGRILLO, M. R. et al. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741–748, 2015.
- SAVIAN, A. L. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering: C**. v. 46, p. 69-76. 2015.
- STREUBEL, A. Gastroretentive drugs delivery systems. **Expert Opin. Drug Deliv.** v. 3, p. 217-233. 2006.
- SIMONAZZI, et al. Nanotechnology applications in drug controlled release. In: **Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems**. William Andrew Publishing, 2018. p. 81-116.
- TAKEUCHI, H. et al. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 57, p. 1583-1594. 2005.
- TROMBINO, S. et al. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 273-279, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Ethyl oleate-containing nanostructured lipid carries improve oral bioavailability of trans-ferulic acid as compared with conventional solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 57-64. 2016.
- ZHAO, Z. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **Nutrient Metabolism**. v. 134, p. 3083-3088. 2004.
- ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intakes and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, 109 (691-702), 2008.

Figure 1 – Morphological analysis of nanocapsule suspensions



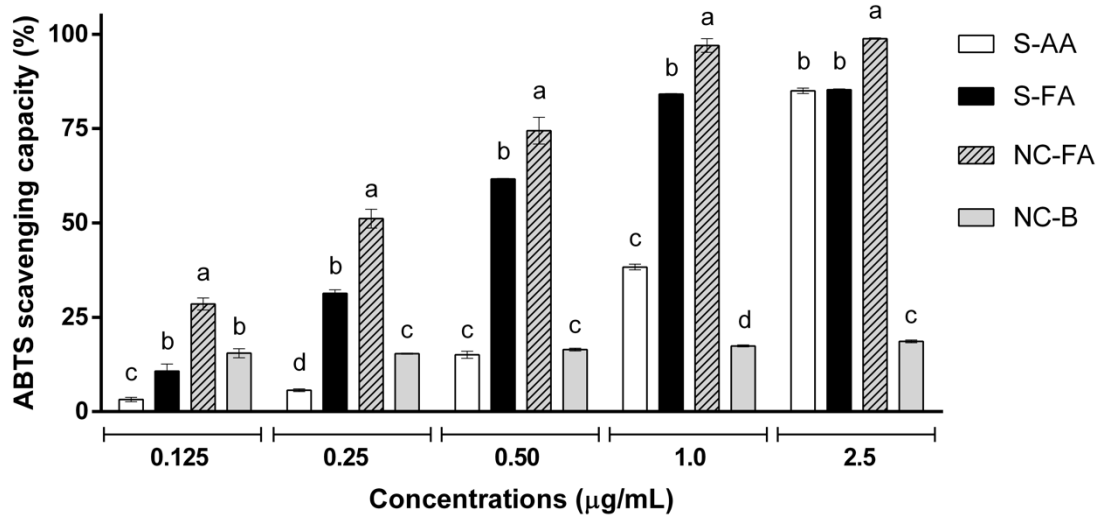
A) Ferulic acid-loaded nanocapsules; B) Nanocapsules without ferulic acid

Figure 2 - In vitro release profile of ferulic acid-loaded nanocapsule suspensions



S-FA: Ferulic acid hydroalcoholic solution; NC-FA: ferulic acid-loaded nanocapsule suspension. The hatched area in the chart highlights the first points.

Figure 3 - Inhibition of ABTS radical in ferulic acid-loaded nanocapsules.



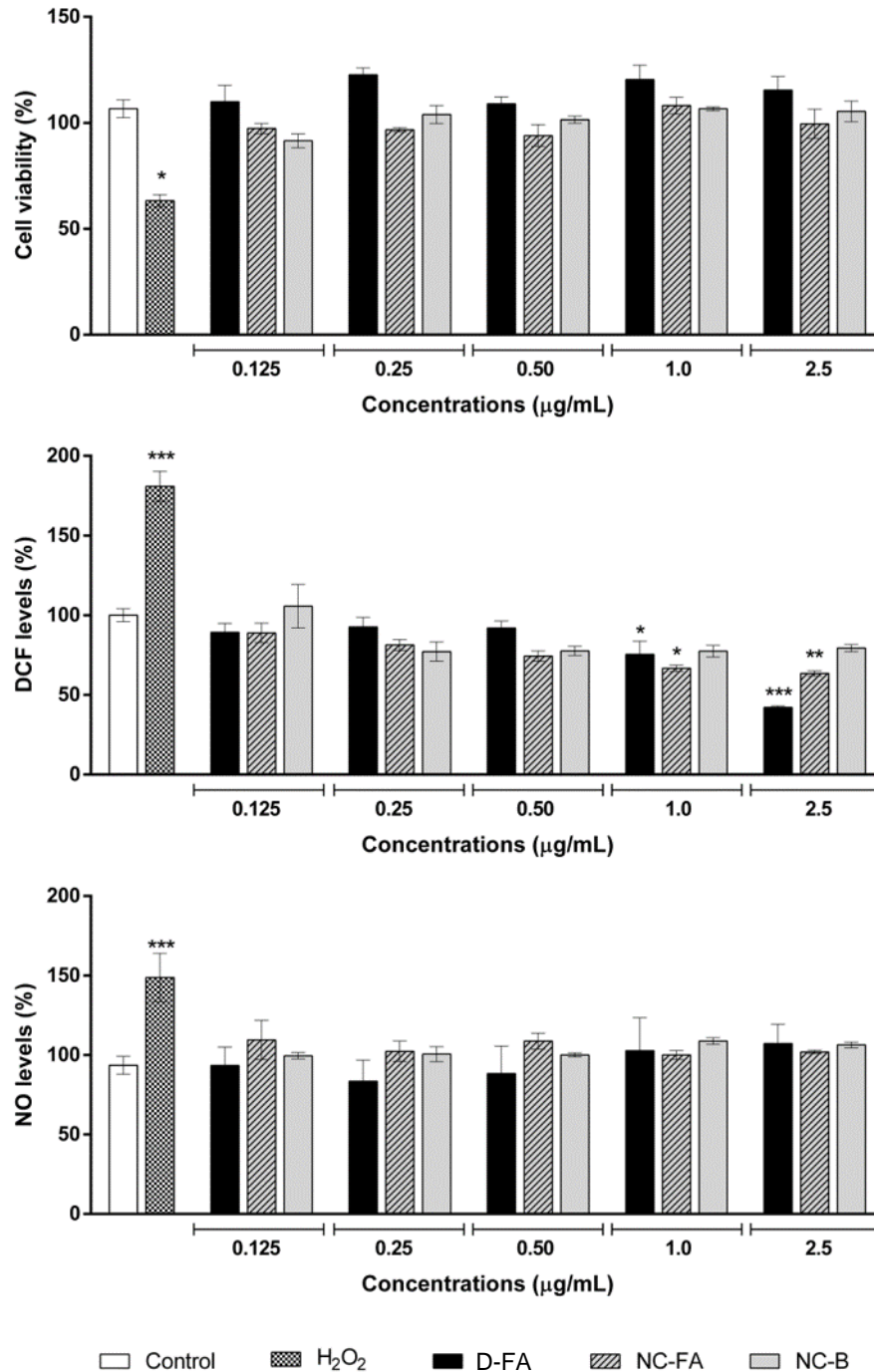
NC-FA: ferulic acid-loaded nanocapsules; S-FA: ferulic acid solution; NC-B: nanocapsules without ferulic acid; S-AA: ascorbic acid solution. Results with different letters at the same concentration are statistically different (one-way ANOVA, SNK *post hoc*; $p < 0.05$).

Table 1 – Scores and classification of HET-CAM irritation evaluation

Samples	Score ¹	Classification ²
Saline	0.0	none irritant
NaOH 1.0 M	20.7 ± 0.8	strong irritant
SLS 1%	15.3 ± 0.8	strong irritant
NC-FA	3.7 ± 2.9	moderate irritant
NC-B	1.3 ± 2.1	moderate irritant
S-FA	9.8 ± 2.8	strong irritant
Ethanol 20%	0.0	none irritant
EDTA solution	0.0	none irritant

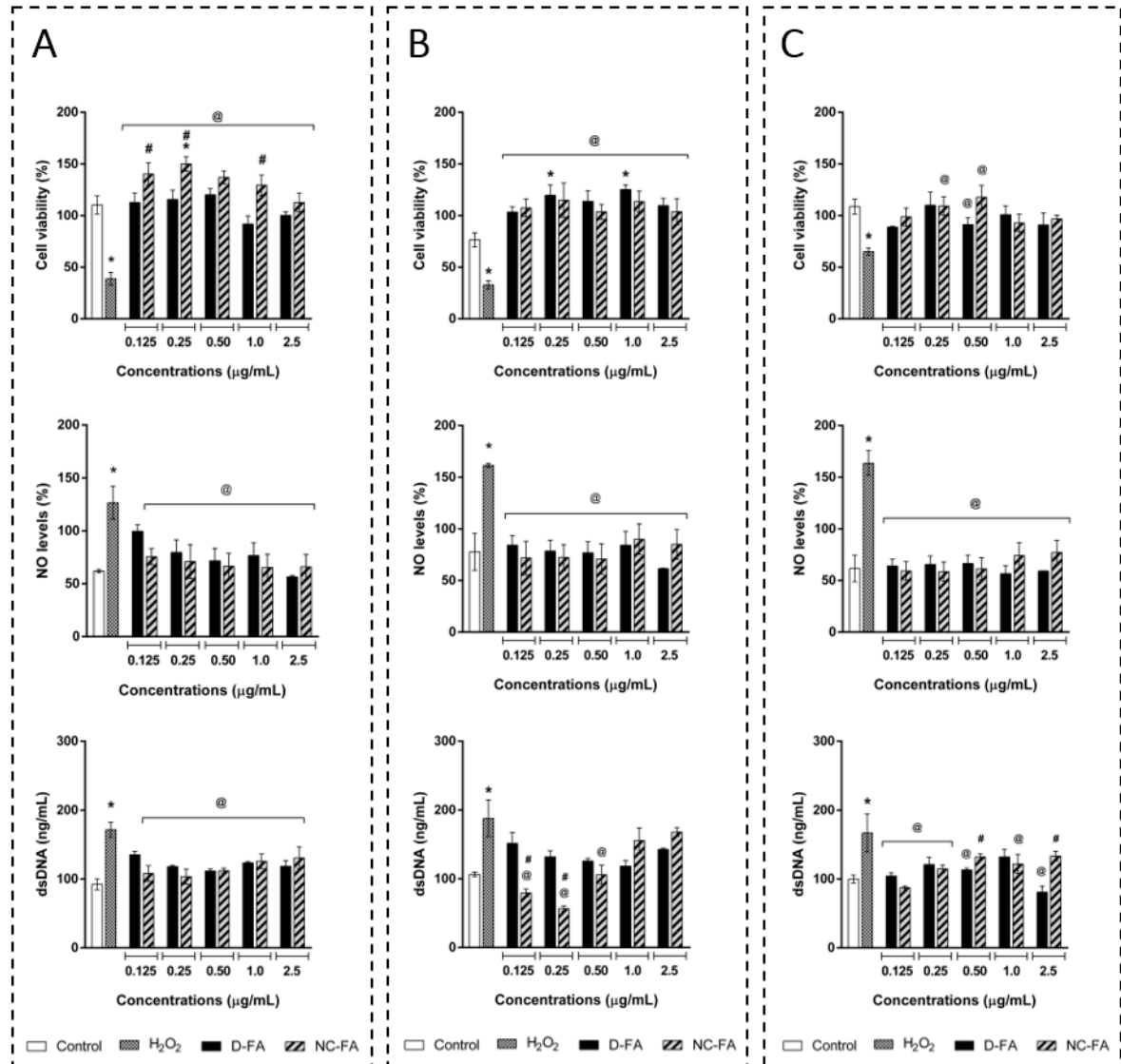
¹ ICCVAM (2010); ² Luepke e Kemper (1986)

Figure 4 - Evaluation of cytotoxicity in human mononuclear cells exposed to ferulic acid- loaded nanocapsules.



NC-FA: ferulic acid-loaded nanocapsules; NC-B: nanocapsules without ferulic acid; D-FA: ferulic acid dispersion. The results were expressed by mean \pm SEM and compared with the negative control through one-way ANOVA with Dunnett *post hoc*, where the statistical difference was described by *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

Figure 5 - Evaluation of cytoprotection of ferulic acid-loaded nanocapsules.



NC-FA: ferulic acid-loaded nanocapsules; D-FA: ferulic acid dispersion. A) prevention assay; B) treatments assay; C) reversion assay. Each column represents the mean \pm SEM and compared with the negative control (*) and hydrogen peroxide (@) through one-way ANOVA followed by Dunnet test ($p < 0.05$). # statistic differences between the NC-FA and D-FA ($p < 0.05$; t-test).

5 DISCUSSÃO

A nanotecnologia e a nanociência, nos últimos anos, têm atraído de forma crescente a atenção de pesquisadores e de indústrias farmacêuticas. Os sistemas nanoestruturados têm sido explorados na liberação controlada de substâncias ativas e/ou na vetorização destas a sítios específicos de ação. Além disso, esses carreadores são capazes de aumentar a biodisponibilidade de fármacos no organismo, melhorar a sua eficácia terapêutica, reduzir efeitos adversos, além de promover uma maior permeação do fármaco pelas barreiras fisiológicas, como a barreira sangue-cérebro e a mucosa gastrointestinal (MEI et. al., 2013; SCHAFFAZICK, 2003; SIMONIAZZI, 2018).

Devido às limitações relacionadas à biodisponibilidade e possíveis efeitos indesejados, o AF foi eleito para esse estudo (AMBOTHY; PRASAD; BALUPILLAI, 2015; MAURYA E DEVASAGAYAM, 2010; ZHAO e MOGHADASIAN, 2008), bem como em função da sua pronunciada atividade antioxidante, conferindo uma ampla aplicação terapêutica, desde desordens cutâneas, processos inflamatórios, propriedades antitumoral e anticarcinogênica e síndromes metabólicas, como dislipidemias e diabetes (GHOSH et al., 2017). Além disso, tem sido explorado em aplicações no sistema nervoso central, como neuroproteção, melhora de processos cognitivos, neurodegeneração em doenças como Parkinson e Alzheimer, além de condições psicossomáticas como a ansiedade e depressão (CHEN et al, 2015; LIU et al, 2017ab; NAGARAJAN et al., 2015; SGARBOSSA, 2012; SGARBOSSA; GIACOMAZZA; DI CARLO, 2015; YU et al., 2006; ZENI et al., 2012ab). As supracitadas aplicações do AF são de extrema importância para o desenvolvimento de bases terapêuticas primárias e adjuvantes para a profilaxia e tratamento dessas condições, melhorando os prognósticos terapêuticos, conferindo qualidade de vida aos pacientes, além de contribuir com a evolução da longevidade humana.

Outra tendência no desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas é a utilização de óleos vegetais como núcleo oleoso, pois muitos óleos possuem propriedades de interesse farmacológico e/ou técnico. Dentre esses, o óleo de coco (*Cocos nucifera L*) tem se destacado por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (AGARWAL; LAL; PRUTHI., 2010; DeBMANDAL e MANDAL, 2011; MARINA; MAN; AMIN, 2009; OGBOLU et. al., 2007). Nanocápsulas poliméricas contendo clotrimazol e óleo de coco como núcleo foram desenvolvidas por Santos e colaboradores (2014), sendo possível observar a capacidade desse sistema em proteger o fármaco da fotodegradação e promover a sua liberação controlada, além de potencializar sua eficácia antifúngica. Ainda, Lorenzoni

(2015) observou uma melhora na capacidade antioxidante da crisina em inibir o radical DPPH a partir de nanocápsulas de etilcelulose e óleo de coco, em relação a mesma partícula contendo TCM como núcleo oleoso. Esse sistema, ainda, não demonstrou citotoxicidade *in vitro* em linhagem de fibroblasto humano. A partir destas observações, este item apresenta alguns testes realizados e resultados que direcionaram a elaboração deste trabalho e o delineamento do mesmo.

O presente estudo iniciou com a preparação de nanocápsulas de etilcelulose e a utilização de TCM (NC-TCM-AF) e óleo de coco (NC-OC-AF) para a formação do núcleo oleoso. O óleo de coco foi obtido comercialmente (óleo de coco virgem orgânico Dr. Orgânico importado das Filipinas por Fignelli importações, lote v17098) e foi empregado em função de suas potencialidades terapêuticos, conforme descrito anteriormente. Em um primeiro momento, as nanocápsulas foram desenvolvidas com uma concentração de 3% de óleo, as quais apresentam características físico-químicas adequadas para sistemas coloidais de aplicação farmacêutica (tamanho de partículas abaixo de 200 nm, índice de polidispersão <0,2 e teor de AF próximo ao teórico, com uma eficiência de encapsulamento próxima a 60%).

Tabela 2 - Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas com 3% de óleo.

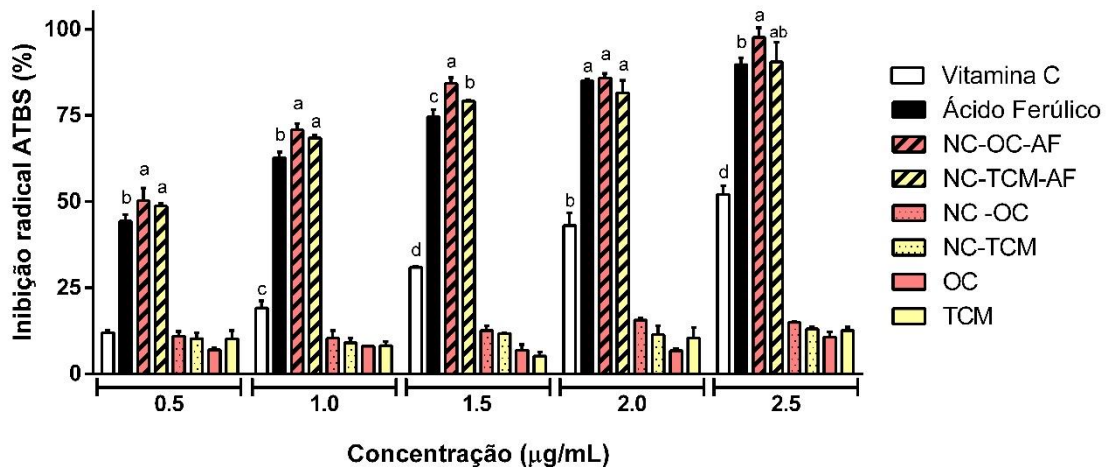
Formulação	Diâmetro médio de partícula (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Teor AF (%)	EE (%)	pH
NC-OC-AF	171 ± 4	0,102 ± 0,011	- 8,2 ± 0,3	98,3 ± 1,8	57,4	4,16 ± 0,04
NC-TCM-AF	137 ± 1	0,105 ± 0,025	-9,7 ± 0,8	100,3 ± 4,6	60,7	4,20 ± 0,02

Além disso, foi avaliada a capacidade de inibição do radical ABTS de ambas formulações nas concentrações de 0,5 a 2,5 µg/mL, sendo possível observar que o AF em solução possui uma capacidade de inibição maior que a apresentada pela vitamina C (ácido ascórbico). Ainda, a sua nanoencapsulação favoreceu a inibição do radical em concentrações mais baixas (0,5 a 1,5 µg/mL). No entanto, a contribuição do óleo de coco não foi expressiva, sendo observada uma diferença em relação à suspensão de nanocápsulas com TCM apenas na concentração de 1,5 µg/mL (figura 3). Apesar de outros autores observarem a importância do óleo de coco para a veiculação de antioxidantes em teste *in vitro* de inibição de radical, não foi

possível evidenciar isso de forma constante nas condições testadas (LORENZONI, 2015). Isso pode estar relacionado ao uso de solvente orgânico no teste de inibição do radical DPPH, o qual pode alterar as nanoestruturas e sendo os óleos em geral apolares, o solvente pode favorecer que componentes antioxidantes do óleo entrem em contato com o radical, inibindo-o. Ainda, a utilização do radical DPPH se faz necessária em meio orgânico, sendo uma característica da técnica, e reflete a contribuição do sistema como um todo, não necessariamente mantendo sua integridade, porém, é uma abordagem válida para integrar estudos de eficácia *in vitro* de nanoestruturas, conforme a literatura (GEHRCKE et al., 2017; KUMAR et al., 2015; MARCHIORI et al., 2017; MATIAZZI et al., 2019).

Em contrapartida, a técnica de avaliação da inibição do radical ABTS é realizada em meio aquoso, favorecendo a integridade do sistema e por esse motivo utilizada nesse trabalho. Dessa forma, provavelmente, devido às características apolares dos óleos, não foi possível observar diferenças significativas em relação à composição do núcleo das nanopartículas. Ainda, as suspensões sem AF e a dispersão dos óleos apresentaram baixa capacidade de inibição do radical nas concentrações testadas, não sendo observadas diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Observa-se, ainda, que a descoloração do radical ABTS é praticamente instantânea e levando em consideração o tempo em que a amostra é deixada em contato com o radical, o efeito de inibição é decorrente principalmente da parcela não encapsuladas do AF.

Figura 3 - Avaliação do efeito scavenger frente ao radical ABTS das suspensões de nanocápsulas com 3% de TCM ou OC carreadoras de AF.



Resultados denotados por letras diferentes, na mesma concentração, diferem estatisticamente ($p < 0,05$; ANOVA uma via, *post hoc* SNK).

Adicionalmente, o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de coco comercial foi avaliado por cromatografia gasosa, em colaboração com o Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análise Laboratorial (NIDAL), da UFSM (Profa. Dra. Tatiana Emanuelli). A determinação da composição de matérias primas de origem vegetal se faz especialmente necessária, devido à necessidade de certificação e controle de qualidade, além da possível variação em sua composição principalmente devido às condições de cultivo e manejo. Essa diferença na composição lipídica pode impactar no desenvolvimento farmacotécnico e na performance biológica, sendo de importante determinação.

A partir dos resultados (tabela 3) foi possível evidenciar a autenticidade do óleo devido à semelhança no perfil de ácidos graxos descritos na literatura e em consonância com monografias oficiais (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; LAURELES et al., 2012; USP, 2016).

Tabela 3 - Percentual relativo aos ácidos graxos identificados na amostra comercial de óleo de coco.

Ácidos graxos		Teor relativo
Ácido hexanóico	C6:0	0,4 %
Ácido cáprílico	C8:0	6,9 %
Ácido cáprico	C10:0	6,4 %
Ácido láurico	C12:0	50,6 %
Ácido mirístico	C14:0	18,8 %
Ácido palmítico	C16:0	8,3 %
Ácido esteárico	C18:0	3,1 %
Ácido oléico	c18:1n9c	4,7 %
Ácido linoléico	C18:2n6c	0,7 %

Contudo, as nanocápsulas com 3% de óleo mostraram-se inviáveis para prosseguirem no trabalho, uma vez que apresentavam sinais de instabilidade físico-química após três dias de preparação. Dessa forma, as nanocápsulas foram preparadas com uma concentração de 1,5% de TCM, sendo essa formulação caracterizada e apresentada no artigo. Porém, ao tentar utilizar o óleo de coco nessa concentração, evidenciou-se a precipitação da formulação ainda durante a preparação e, desta forma, os estudos seguiram somente com as nanocápsulas preparadas com TCM.

Ainda, o teor de AF nas nanocápsulas foi o aspecto mais desafiador do desenvolvimento farmacotécnico dos nanocarreadores propostos neste trabalho, sendo testada também a adição de um antioxidante técnico à fase orgânica da formulação (BHT), não sendo observadas melhoras em relação ao teor do AF e alterações das características organolépticas da formulação. Contudo, o uso de EDTA à fase final da formulação, permitiu a manutenção das características sem diferenças significativas (*t-test*; $p > 0,05$) por um período de sete dias. Cabe salientar que nos testes de degradação forçada para o desenvolvimento analítico, só foi possível observar degradação do AF em condições ácidas (HCl 1,0 M) e fotolíticas (UVA). Contudo, sabe-se que suspensões de nanocápsulas possuem limitada estabilidade físico-química e microbiológica, devido ao meio aquoso em que estão suspensas (ABDELWAHED et al. 2006).

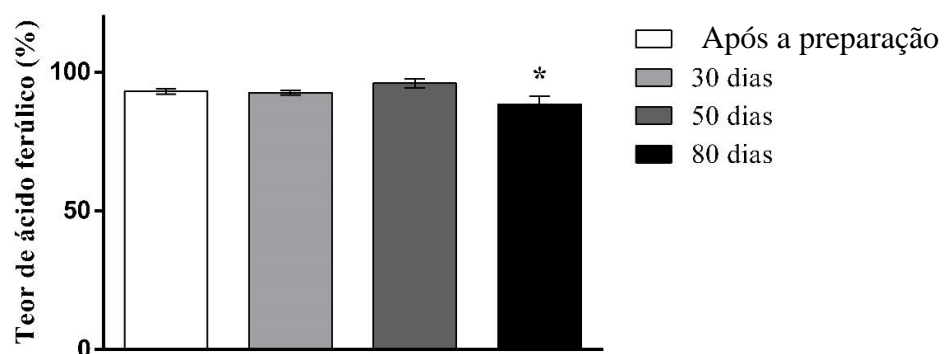
Nesse sentido, as nanocápsulas (NC-AF e NC-B) foram liofilizadas, utilizando trealose à 10% como crioprotetor, congelamento de 48 h e posterior secagem de 48 h. Conforme observado na tabela 4, os liofilizados apresentaram diâmetro médio de partículas na faixa de 120 nm, próximo ao encontrado para as suspensões de origem, o que é denotado pelo índice de ressuspensão próximo a 1,0, indicando que as nanopartículas não sofreram danos durante o processo de liofilização, sem alteração de tamanho e ausência de agregados (CHACÓN et al., 1999). Ainda, os produtos secos apresentaram teor superior a 90% e, principalmente, foram capazes de mantê-lo por até 50 dias sem diferenças significativas em relação ao liofilizado após a preparação. Apesar disso, o liofilizado apresentou teor próximo de $88,6 \pm 2,9$ % em 80 dias após seu preparo, resultado satisfatório tendo em vista a estabilidade limitada da suspensão de origem. Esse conjunto de resultados indica que a remoção da água da suspensão favoreceu a estabilidade do AF nanoencapsulado (figura 4), o que é esperado, uma vez que a água é meio reacional para a degradação de moléculas, além propiciar a proliferação microbiológica. Dessa forma, a remoção da água das suspensões de nanocápsulas é um processo amplamente utilizado para melhorar a estabilidade do sistema e das substâncias, visando à manutenção de sua integridade por um longo prazo, a conversão desse produto em outras formas farmacêuticas, e/ou viabilizar a sua aplicação pré-clínica e/ou clínica (ABDELWAHED, 2006; KUMAR; WINTER; FRIESS, 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Tabela 4 - Caracterização físico-química dos liofilizados de nanocápsulas poliméricas contendo AF, após a preparação.

Amostras	Diâmetro médio de partícula	Índice de ressuspensão ¹	Teor AF
L-NC-TCM-AF	122 ± 7 nm	1,09 ± 0,06	93,1 ± 1,0%
L-NC-TCM	120 ± 7 nm	1,12 ± 0,07	N/A

¹ relação entre o tamanho de partículas após e antes da liofilização

Figura 4 - Teor de AF nos liofilizados durante o estudo de estabilidade.



Determinação de AF por CLAE após a extração das amostras em metanol (agitação magnética por 5 minutos seguido de ultrassonificação por 20 minutos). Os resultados são expressos por média ± EP em que * indica diferença estatística em relação ao teor de ácido ferúlico após a preparação (ANOVA uma-*via* Dunnet *post hoc*; $p < 0,05$)

Dando continuidade aos estudos de desenvolvimento, avaliou-se o efeito da nanoencapsulação na liberação do AF em comparação com uma solução do mesmo. Foi possível observar a capacidade da suspensão de nanocápsulas de prolongar a liberação do AF (NC-AF) em tampão clorídrico pH 2,0, especialmente após 60 minutos, mesmo com a encapsulação parcial do bioativo. Resultado semelhante foi observado por Carbone e colaboradores (2014), os quais demonstraram que nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo AF parcialmente encapsulado foram capazes de controlar a sua liberação em fluido gástrico simulado. No presente trabalho, o polímero utilizado foi a etilcelulose, que também já é aplicada para a obtenção de nanocápsulas, sendo utilizada no delineamento de formas farmacêuticas de liberação controlada usuais, como comprimidos e *pellets*, bem como em micro e nanopartículas (CHASSOT et al., 2015; LOKHAND et al., 2013ab; MARCHIORI et al., 2017; MATIAZZI et al. 2019).

Cabe salientar que o AF é principalmente absorvido pelo estômago na forma não dissociada. ZHANG Y. e colaboradores (2016) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AF que foram capazes de distribuir e reter o

bioativo no trato gastrointestinal, ampliando a área de absorção do AF, além de promover uma liberação controlada, duplicando sua meia vida plasmática e a concentração plasmática máxima, melhorando a sua biodisponibilidade. Nesse sentido, além da NC-AF ser capaz de controlar a liberação do AF, foi também capaz de interagir com a mucina do tipo II, que é a principal glicoproteína de revestimento de mucosas, demonstrando a potencialidade do sistema proposto em melhorar a biodisponibilidade do AF, se aproximando da sua aplicação terapêutica. Além disso, a etilcelulose é descrita por possuir propriedades mucoadesivas, apesar de ser um polímero não iônico, o tamanho de partícula nanométrica facilita seu deslocamento através do muco e interação com membranas biológicas (ADELEKE, 2019; BALZUS et al, 2017).

Ainda, a administração por um longo prazo de ácido fracos e/ou fármacos com propriedades anti-inflamatórias pode causar irritação na mucosa gástrica como efeito indesejado. As nanocápsulas poliméricas são utilizadas também para contornar efeitos indesejados de substâncias, em geral mediada pelo controle da liberação (EL-HABASHY et al, 2016; SAVIAN et al., 2015). Neste sentido, foi avaliado o potencial de irritação do AF empregando a membrana corioalantóide do ovo de galinha que é aplicado para a determinação da irritação ocular, porém, devido à sensibilidade do método, sua aplicação pode ser ampliada para irritação em mucosas. As nanocápsulas demonstraram potencial de reduzir a irritação na membrana em comparação com o AF em solução, se assemelhando às nanoestruturas sem o bioativo. Essa propriedade pode ser explicada pela taxa de associação e pelo controle de liberação do AF a partir das nanopartículas, além desses sistemas serem modificadores das propriedades físico-químicas iniciais dos compostos, sendo em termos de melhora da estabilidade físico-química, diminuição dos efeitos indesejados ou conferindo propriedades funcionais (SIMONIAZZI, 2018; SAVIAN et al., 2015). O material necessário para a realização desse experimento foi obtido através de doação da Cooperativa Languiru (Teutônia, RS, Brasil), no mês de abril de 2019.

Além disso, as suspensões de nanocápsulas contendo ou não o AF (NC-FA e NC-B) não reduziram a viabilidade celular em células mononucleadas humanas, além de não causar danos às mesmas, uma vez que foram capazes de manter os níveis de óxido nítrico e reduzir os níveis de espécies reativas totais. Ainda, resultados semelhantes foram descritos na literatura para as suspensões de nanocápsulas de etilcelulose sem princípio ativo, utilizando como núcleo oleoso TCM ou óleos vegetais como o de coco, romã ou amêndoas em cultura celular (CHASSOT, et al., 2014; LORENZONI, 2015; MARCHIORI et al., 2017). Isso confirma que a associação entre os excipientes utilizados na preparação das nanocápsulas não apresentam citotoxicidade. Além disso, as nanocápsulas contendo AF a sua respectiva dispersão não apresentaram

toxicidade no modelo celular proposto, assim como outras nanopartículas carreadoras de substâncias antioxidantes, conforme descrito na literatura (CHASSOT, et al., 2014; 2015; FERREIRA et al., 2018; MARCHIORI et al., 2017).

Por fim, as suspensões de nanocápsulas contendo AF apresentaram atividade cito e genoprotetora em células mononucleadas humanas frente à indução de danos oxidativos por peróxido de hidrogênio, em concentrações mais baixas em relação ao composto disperso. Esse resultado é esperado, uma vez que o AF é descrito por sua eficácia antioxidante, possuindo diferentes grupos doadores de prótons e/ou elétrons e, ainda, com a formação de produtos com propriedades antioxidantes (SGARBOSSA; GIACOMAZZA; DI CARLO, 2015). Em um cenário geral, a encapsulação do AF favoreceu principalmente os modelos de prevenção e tratamento de estresse oxidativo, em especial na redução dos níveis de óxido nítrico e na genoproteção. Além disso, no modelo de reversão o AF nanoencapsulado melhorou a viabilidade celular e reduziu o marcador de dano oxidativo/nitrosativo. Entretanto, a redução dos níveis de DNA de fita dupla no sobrenadante celular não foi dose-dependente para as formulações testadas, porém não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (meio de cultivo e células). Esse conjunto de dados permite inferir que, nas doses testadas, a encapsulação do AF potencializou seus efeitos citoprotetores em relação à prevenção, tratamento e reversão de danos oxidativos, bem como demonstrou efeito genoprotetor para os modelos de prevenção e tratamento. Ressalta-se que esses experimentos, envolvendo cultivo celular, foram realizados em colaboração com a Profa. Michele Rorato Sagrillo, da Universidade Franciscana (Santa Maria, RS)

Além disso, a melhora da eficácia antioxidante e citoprotetora do AF associado a sistemas nanoestruturados já é descrita na literatura. Trombino e colaboradores (2013) observaram a inibição da peroxidação lipídica ao aplicar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AF em microssomas cerebrais murinos frente a três diferentes indutores, demonstrando o potencial desses sistemas em tratar o estresse oxidativo e nitrosativo. Além disso, Hassanzadeh e colaboradores (2018) demonstraram também que carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AF foram citoprotetores em linhagem de células neuronais *in vitro*, aplicando esses sistemas em modelo de neuro-oxidação causada por hipóxia em ratos, que mantiveram os efeitos neuroprotetivos observados *in vitro*.

Desta forma, o conjunto das avaliações realizadas, englobando a caracterização físico-química e testes de segurança e eficácia *in vitro*, demonstrou as potencialidades do nanocarreador proposto e sua futura aplicação em estudos pré-clínicos e no desenvolvimento

de novas formas farmacêuticas, voltadas à prevenção e/ou tratamento de condições relacionadas ao estresse oxidativo.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível desenvolver suspensões de nanocápsulas de etilcelulose contendo AF na concentração de 0,5 mg/mL, as quais foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As nanocápsulas apresentaram características físico-químicas adequadas, teor de AF próximo ao teórico e eficiência de encapsulamento parcial; entretanto, apresentaram redução do teor de AF após sete dias de armazenamento. A fim de contornar essa instabilidade as suspensões coloidais foram desidratadas por liofilização. Os produtos secos foram redispersíveis em água e apresentaram tamanho de partículas semelhante à suspensão de origem, além de manter o teor de AF por até 50 dias, possibilitando aumentar a estabilidade do mesmo.

As nanocápsulas foram capazes de controlar a liberação do AF a partir de uma hora de experimento. Além disso, foi observado um aumento da capacidade de inibição do radical ABTS do AF quando associado às nanocápsulas, em comparação com o bioativo livre, que por sua vez é mais eficaz que o ácido ascorbico. Ainda, demonstrou ser mucoadesiva, pela interação com a mucina, o que pode contribuir para o aumento de sua biodisponibilidade em futuras aplicações em modelos pré-clínicos.

Nos testes de segurança realizados, a nanoencapsulação possibilitou diminuir o potencial de irritação do AF em mucosas (de fortemente irritante, em solução, para levemente irritante), demonstrando o potencial de redução de possíveis efeitos indesejados decorrentes da administração contínua do AF.

Além disso, foi observada ausência de toxicidade para as nanocápsulas contendo ou não o AF frente às células mononucleadas humanas, em todas as concentrações avaliadas. As formulações foram capazes de prevenir, tratar e reverter a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio, mantendo a viabilidade celular e os níveis de óxido nítrico, demonstrando ser citoprotetoras. Ainda, em especial, foram genoprotetoras nos modelos de prevenção e tratamento do dano ao material genético induzido por mecanismos oxidativos.

Frente ao exposto, as nanocápsulas de etilcelulose contendo AF mostraram-se sistemas promissoras para futura aplicação do bioativo, viabilizando o seu uso em condições fisiopatológicas que envolvam processos oxidativos, como inflamação, mutagenicidade, doenças neurodegenerativas, síndromes metabólicas e outras doenças relacionadas ao envelhecimento, podendo ser empregado como uma opção terapêutica principal ou adjuvante, e, dessa forma, contribuir para a evolução de prognósticos e melhora da qualidade de vida dos pacientes, bem como para o avanço da longevidade humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.
- ADELEKE, O. A. Premium ethylcellulose polymer based architectures at work in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics: X**. v. 1, p. 1-15. 2019.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of plant oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 5, p. 447-451, 2010.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9a edição. São Paulo: Artmed, 2013.
- AMBOTHY, K.; PRASAD, N. R.; BALUPILLAI, A. Ferulic acid inhibits UVB-radiation induced photocarcinogenesis through modulating inflammatory and apoptotic signaling in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 72-78. 2015.
- BALZUS, B. Formulation and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin the corneal epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 115, p. 122-130. 2017.
- BARONE, E.; CALABRESE, V.; MANCUSO, C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, v. 10, p. 97-108, 2009.
- BOULTADAKIS, A.; LIAKOS, P.; PITSIKAS, N. The nitric oxide-releasing derivative of ferulic acid NCX 2057 antagonized delay-dependent and scopolamine-induced performance deficits in a recognition memory task in the rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 5-9, 2010.
- CARBONE, C. et al. FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. **European in Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 12-20. 2014.
- CHACÓN, M. et. al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 8, p. 99-107, 1999
- CHASSOT, J. M. et. al. Beclomethasone dipropionate-loaded polymeric nanocapsules: development, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* evaluation of acute lung injury. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 1-10, 2015
- CHEN, J. Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 1, p. 129-136, 2015.
- CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 2093-2110, 2013.
- CHOWDHURY, et al. Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 187-198, 2016.

DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Conconu (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.

D'MELLO, S.R.; DAS, S. K.; DAS, N.G.; Polymeric Nanoparticles for Small-Molecule Drugs: Biodegradation of Polymers and Fabrication of Nanoparticles, in: **Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization**, by: PATHAK, Y.; THASSU, D. New York: Informa Helthcare, 2009.

EL-HABASHY, S. E; ALLAM, A. N.; EL-KAMEL, A. H. Ethyl cellulose nanoparticles as a platform to decrease ulcerogenic potential of piroxicam: formulation and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**. v. 11, p. 2369-2380. 2016.

FAMUREWA, A. C. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of virgin coconut oil supplementation abrogate acute chemotherapy oxidative nephrotoxicity induced by anticancer drug methotrexate in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 905–911. 2017.

FERREIRA, L. M. et al. Diphenyl diselenide loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 91, p. 1, 2018.

FESSI, H. et al. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 74, p. 279-286, 2017.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signaling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v. 19, p. 1807-1819, 2007.

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.

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

GRANATA, G. et al. Hydroxycinnamic acids loaded in lipid-core nanocapsules. **Food Chemistry**, v. 245, p. 551-556, 2018.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. Em: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. Ed. 12. Artmed Editora. 2012.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206-213, 2007.

- GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. Atheneu, Cap. 17, p. 247-264, 2007.
- HASSANZADEH, P. et al. Ferulic acid-loaded nanostructured lipid carriers: A promising nanoformulation against the ischemic neural injuries. **Life Science**, v. 193, p. 64-76, 2018.
- HARWANSI, 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.
- HIRATA, L. L. et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n° 3, p. 418-24, 2004.
- KANDOLA, K.; BOWMAN, A.; BIRCH-MACHIN, M. A. Oxidative stress – a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 1-8, 2015.
- 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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 273-281, 2002.
- KUMAR, J. C.; WINTER, G.; FRIESS, W. Recent advances and further challenges in lyophilization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 162-169, 2013.
- KUMAR, S. P. et al. Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. *International journal of biological macromolecules*, v. 78, p. 87-95, 2015.
- LAURELES, L. R. et al. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids and their parentals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1581-1586, 2002.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revised. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, p. 336-374, 2010.
- LIU, Ya-Min et al. Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. **Physiology & behavior**, v. 169, p. 184-188, 2017a
- LIU, Y-M. et al. Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **International immunopharmacology**, v. 45, p. 128-134, 2017b.
- LOKHANDE, A. B. et al. Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and in vitro release study of drug loaded nanoparticles. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 414-420, 2013a.

- LOKHANDE, A. B. et al. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 5, p. 421–426, 2013b.
- LORENZONI, A. S. **Desenvolvimento de nanocápsulas para a liberação controlada de crisina: avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade in vitro**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and chemical toxicology**, v. 65, p. 185-195. 2014.
- 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, p. 3369-3373. 2010.
- MARCHIORI, M. C. L et al. Nanoencapsulation improves scavenging capacity and decreases cytotoxicity of silibinin and pomegranate oil association. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3236-3246, 2017.
- MARINA, A. M.; MAN, Y. B. C.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 481-487, 2009.
- MATTIAZZI, Juliane et al. Incorporation of 3, 3'-Diindolylmethane into Nanocapsules Improves Its Photostability, Radical Scavenging Capacity, and Cytotoxicity Against Glioma Cells. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 49, 2019.
- MEI, L. et. al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 880-890, 2013.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.
- MERLIN, J.P.J.; PRASAD, N. R.; SHIBLI, S.M.A; SEBEELA, M.; Ferulic acid loaded Poly-D, L-lactide-co-glycolide nanoparticles: systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer in non-small cell lung carcinoma cell line *in vitro*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 2, p. 69-76. 2012.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.
- NAGARAJAN, Sangeetha et al. Ferulic acid pretreatment mitigates MPTP-induced motor impairment and histopathological alterations in C57BL/6 mice. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1591-1601, 2015.
- OGBOLU, D. O. et al. In Vitro Antimicrobial Properties of Coconut Oil on Candida Species in Ibadan, Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 2, p. 384–387. 2007.

OHSAKI, Y. 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. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2825-2830, 2008.

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

PATHAK, Y. Recent Developments in Nanoparticulate Drug Delivery Systems. in: PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization**. New York: Informa Helthcare, 2009.

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.

POHLMANN, A. R. et al. Polymeric nanocapsules: development approaches and relevance to drug delivery. In: BALZARETTI, N. M. **Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia**. Porto Alegre: UFRGS editora, 2014.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.

PubChem database. Ferulic Acid. **U.S. National Library of Medicine**. Available in <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>>, accessed at December 2019.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**. V. 436, p. 332-347. 2014.

RAWLE, Alan. Basic of principles of particle-size analysis. **Surface coatings international. Part A, Coatings journal**, v. 86, n. 2, p. 58-65, 2003.

RIBEIRO, R. F. et al. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 875-884, 2016.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Ed 6. Pharmaceutical Press. London: 2009

SANTOS, S. S. et. al. Clotrimazole-loaded Eudragit®RS 100 nanocapsules: preparation, characterization and *in vitro* evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33 p. 1389-1394, 2013.

SAVIAN, A. L. et al. Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the *in vitro* irritation potential of this drug. **Materials Science and Engineering: C**. v. 46, p. 69-76. 2015.

SGARBOSSA, A. Natural biomolecules and protein aggregation: emerging strategies against amyloidogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 17121-17137, 2012.

SGARBOSSA, A.; GIACOMAZZA, D.; DI CARLO, M. Ferulic acid: a hope for Alzheimer's disease therapy from plants. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5764-5782, 2015.

SIGMA-ALDRICH. **Trans-Ferulic acid \geq 99%** (w518301). Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w518301>>; Acesso em: 27/12/2019.

SIMONAZZI, et al. Nanotechnology applications in drug controlled release. In: **Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems**. William Andrew Publishing. p. 81-116. 2018.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SONG, Y. et al. Cytoprotective mechanism of ferulic acid against high glucose-induced oxidative stress in cardiomyocytes and hepatocytes. **Food & nutrition research**, v. 60, n. 1, p. 30323, 2016.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 40, p. 92-100. 2007.

TROMBINO, S. et al. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 273-279, 2013.

USP (UNITED STATES PHARMACOPOEIA). Coconut oil – monographs. USP39 NF34. In: **The USP Convention. Rockville**. p 7252. 2016.

WANG, H. et al. Ferulic acid attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats via regulation of PTP1B and insulin signaling pathway. **Physiology & behavior**, v. 182, p. 93-100, 2017.

YU, L. et al. Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 170-177, 2006.

ZENI, A. L. B. et al. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. **European journal of pharmacology**, v. 679, n. 1-3, p. 68-74, 2012a.

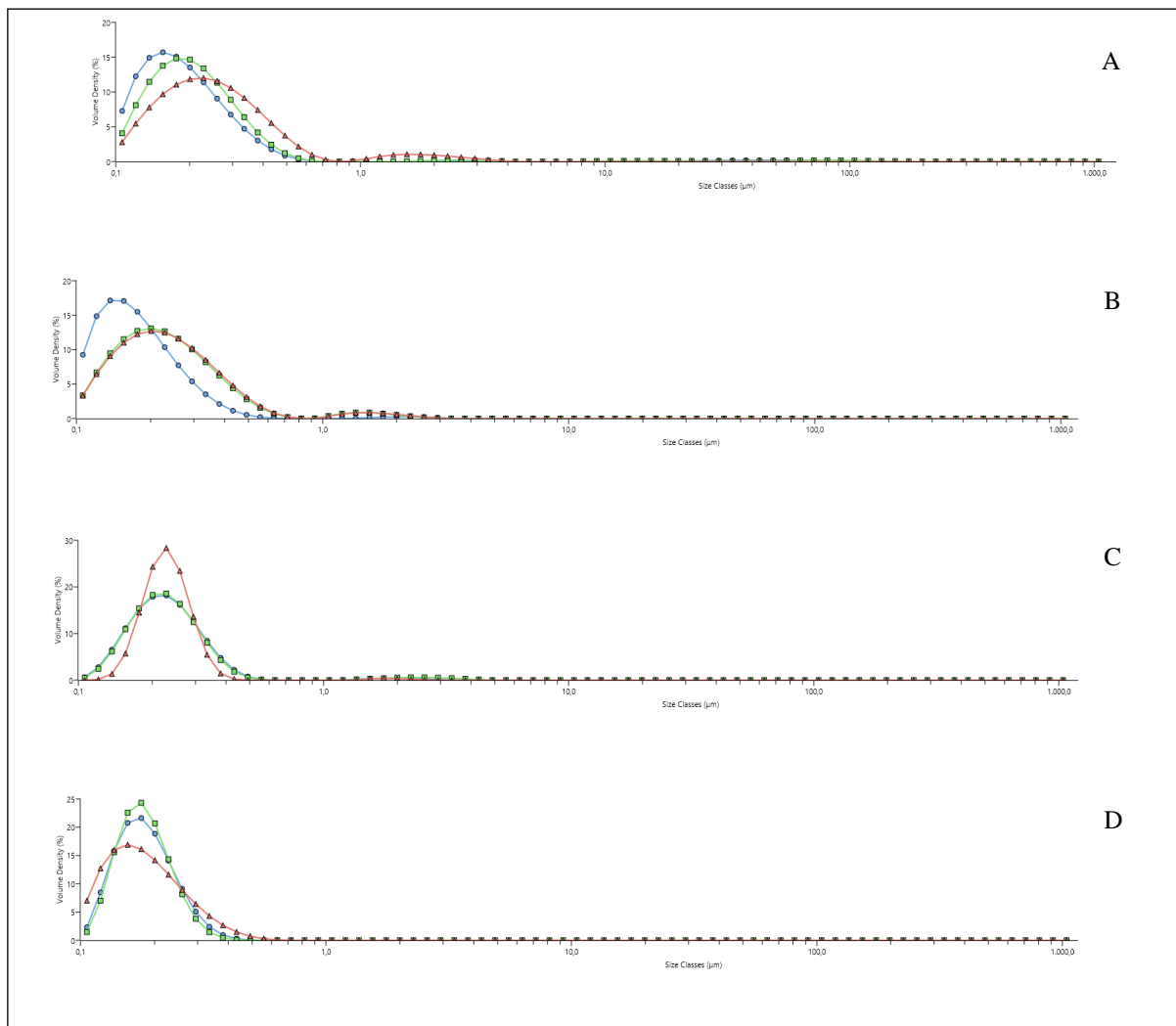
ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 181-186, 2012b.

ZHANG, Y. et al. Ethyl oleate-containing nanostructured lipid carries improve oral bioavailability of trans-ferulic acid as compared with conventional solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 57-64. 2016.

ZHANG, X. et al. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. **Oncology reports**, v. 36, n. 1, p. 271-278, 2016.

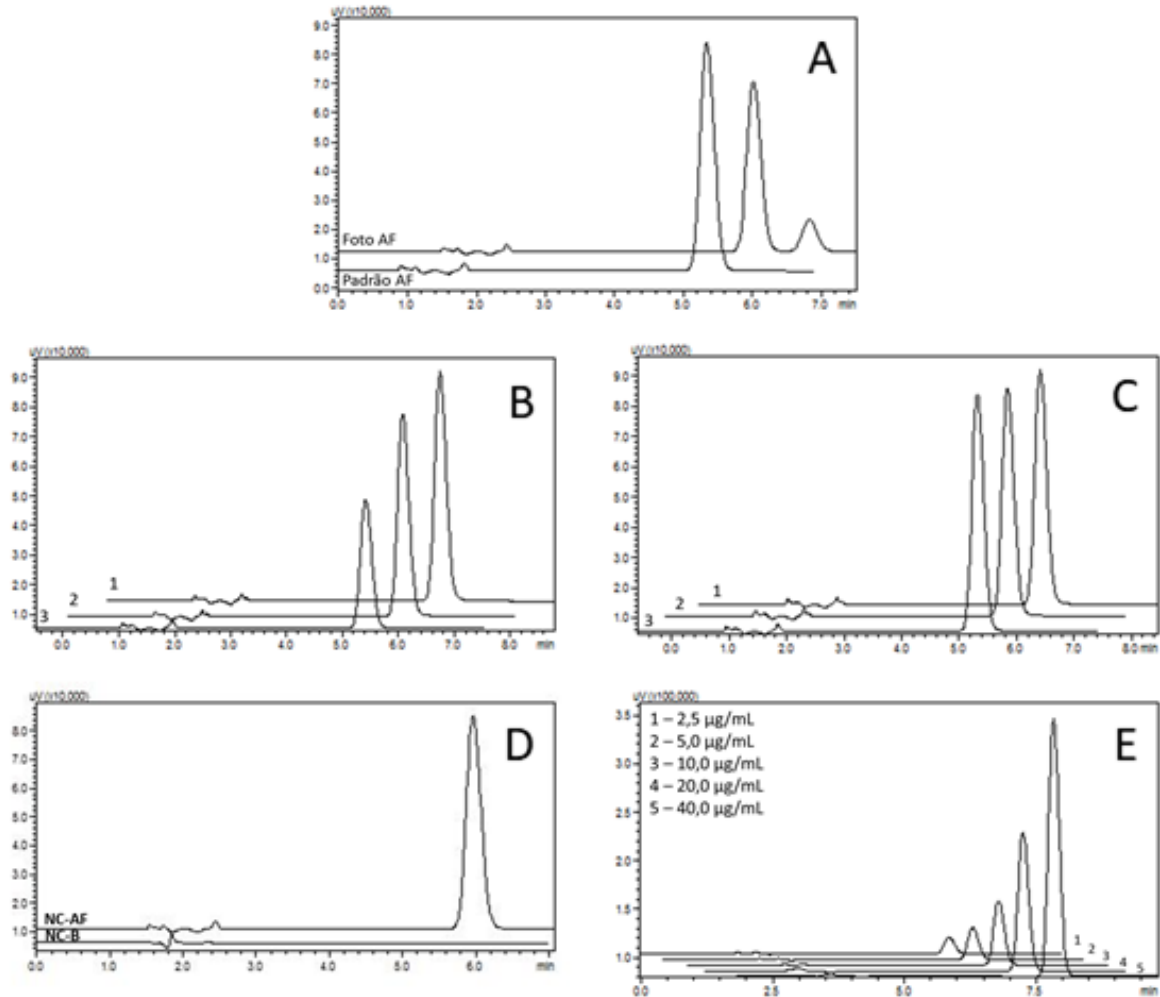
ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intakes and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, 109 (691-702), 2008.

APÊNDICE A – PERFIL GRANULOMÉTRICO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS



Perfil granulométrico, em triplicata, das suspensões de nanocápsulas [densidade de volume (%) x tamanho (µm)].
A) NC-FA; B) NC-B; C) NC-TCM-AF; D) NC-OC-AF

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA O ÁCIDO FERÚLICO



Cromatogramas relativos ao desenvolvimento e validação do método analítico para a determinação do ácido ferúlico por cromatografia à líquido de alta eficiência. A) Cromatograma do ensaio de degradação forçada em condição fotolítica, em que é possível observar a separação do produto de degradação do ácido ferúlico; B) Cromatogramas do ensaio de degradação forçada em condição de hidrólise ácida (1 – padrão do ácido ferúlico; 2 – AF após um dia; 3 – AF após seis dias); C) Cromatogramas do ensaio de degradação forçada em condição de hidrólise alcalina (1 – padrão do ácido ferúlico; 2 – AF após um dia; 3 – AF após seis dias); D) Especificidade do método analítico (validação); E) Linearidade do método analítico (validação).