

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DIEGO PINTO DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIARTRÍTICO DO ÁCIDO *TRANS*-  
ACONÍTICO: INCORPORAÇÃO EM MICROESFERAS MUCOADESIVAS E  
SÍNTESE DE ÉSTERES**

**Belo Horizonte – MG  
2017**

**DIEGO PINTO DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIARTRÍTICO DO ÁCIDO *TRANS*-  
ACONÍTICO: INCORPORAÇÃO EM MICROESFERAS MUCOADESIVAS E  
SÍNTESE DE ÉSTERES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG.

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua, FAFAR, UFMG.

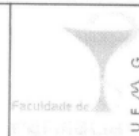
Colaboradores: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, FAFAR, UFMG.

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, ICB, UFMG.

**Belo Horizonte – MG  
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



## FOLHA DE APROVAÇÃO

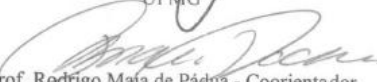
**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIARTRÍTICO DO ÁCIDO  
TRANS-ACONÍTICO: INCORPORAÇÃO EM MICROESFERAS MUCOADESIVAS E  
SÍNTESE DE ÉSTERES**

**DIEGO PINTO DE OLIVEIRA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 24 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

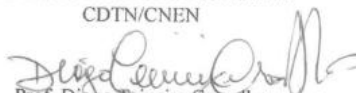
  
Prof. Fernão Castro Braga - Orientador  
UFMG

  
Prof. Rodrigo Mata de Pádua - Coorientador  
UFMG

  
Profa. Danielle da Glória de Souza  
UFMG

  
Profa. Valquiria Linck Bassani  
UFRGS

  
Dr. Antero Silva Ribeiro de Andrade  
CDTN/CNEN

  
Prof. Diego Teixeira Carvalho  
UNIFAL

Belo Horizonte, 24 de novembro de 2017.

**DEDICO**

*Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional;*

*Aos amigos e familiares pelo companheirismo;*

*Aos professores Fernão e Rodrigo pelo exemplo e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernão Castro Braga, pela orientação, paciência, apoio e incentivo durante o desenvolvimento de todo do trabalho. Sua integridade, competência e ética profissional são exemplos que contribuíram ativamente para minha formação pessoal e profissional. Obrigado pela oportunidade.

Ao Professor Rodrigo Maia de Pádua, pela disponibilidade, entusiasmo e alegria. Obrigado por sempre acreditar na minha capacidade.

A professora Mônica Cristina de Oliveira por toda assistência e orientação quanto ao desenvolvimento e caracterização das formulações. Obrigado pelas contribuições.

Aos professores Mauro Martins Teixeira e Flávio Almeida Amaral e as amigas Nathália, Vívian e Daiane do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG pela colaboração e auxílio no desenvolvimento dos estudos *in vivo* deste trabalho.

Ao professor Ricardo José Alves pela consolidação da minha formação e colaboração com as análises de IV.

Ao professor José Dias de Souza Filho pela colaboração com as análises espectrais de RMN.

A professora Maria Irene Yoshida pela colaboração com as análises termogravimétricas.

Aos funcionários da Fafar Batista e Adelaide pelo auxílio com os animais.

Aos professores Alaíde, Rachel, Izabella, Christian, Landa, André Faraco, André Branco, Celinho, Steyner, Christiane, Inayara, Marcos e Marcelo Ap. pelos ensinamentos e auxílios.

Aos alunos de IC Gabriela e Thales pelo companheirismo e amizade.

A Raquel, José Hugo, Mari Assíria e Luana Farah, amigos que levarei a vida toda. Obrigado pelas risadas, apoio e happy hours, vocês fizeram essa caminhada se tornar mais prazerosa.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica, Ana Bárbara, Kamillinha, Douglas, Elisângela, Tati, Juliana Amorim, Juliana Alves, Juliana Oliveira, Rafael, Juma, Maria Fernanda, Deyse, Marina Rocha, Alisson, Lu, Paula, Bárbara, Felipe, Letícia, Renata, Luisa e Stefano pela amizade, ajuda e boa convivência que tornava o trabalho mais leve.

Aos amigos sempre presentes, Moacir, Tiago Guimarães, Welinton, Sumaia, Mariana, Fábio, Paty, Tiago Marques, Núbia, Matheus, Luana Ribeiro, Jean, Ueslei e Larissa.

Ao Vinícius pelo carinho, companheirismo, compreensão e amor, o que torna minha trajetória mais completa.

Aos meus familiares próximos em especial a tia Rai, tio Pedro, o tio Elismar e a Andreza pela amizade e pelos familiares distantes que sempre incetivaram.

Aos meus amados pais Joaquim e Antonia (Zimor), ao meu irmão Cleiton e a minha afilhada e sobrinha Marcela por todo amor que me transmitem e me fazem sentir.

A Deus e a espiritualidade maior pelo amparo e luz.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Alismataceae), espécie popularmente conhecida como chapéu-de-couro, é utilizada tradicionalmente no tratamento de diferentes doenças inflamatórias, incluindo artrites. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de diferentes extratos, frações e constituintes da espécie, incluindo o ácido *trans*-aconítico (ATA), em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O presente estudo teve como objetivo aprimorar as propriedades biofarmacêuticas do ATA, visando explorar seu potencial antiartrítico, utilizando duas estratégias: (i) obtenção de formulações de microesferas mucoadesivas de ATA (ME-ATA); (ii) síntese de ésteres de ATA. No caso da primeira, foram produzidas sete formulações distintas de ME-ATA, utilizando diferentes proporções de polímeros. As formulações foram avaliadas quanto à taxa de encapsulação, tamanho médio de partículas e índice de polidispersão. O teor de ATA nas formulações foi determinado por um método de CLAE desenvolvido e validado para este propósito. A formulação F3c (composta por proporções iguais de massa de HPMC, carbopol e ATA) apresentou a maior taxa de encapsulação e foi caracterizada quanto à morfologia (MO e MEV), características físico-químicas e térmicas por espectroscopia FT-IV, DSC, TG e potencial zeta. Os dados obtidos indicaram estabilidade da formulação e pouca interação entre a matriz e o ATA. Os ésteres de ATA foram obtidos por reação de esterificação de Fisher com três alcoóis distintos (etanol, *n*-butanol e *n*-octanol) na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,7% v/v) a 75°C por 2 horas. O estudo da cinética das reações possibilitou otimizar as condições reacionais, tendo sido obtidos rendimentos globais (somatória de mono, di e triésteres) de 85,4%, 37,7% e 71,3% nas reações com etanol, *n*-butanol e *n*-octanol, respectivamente. Foram obtidas misturas de monoésteres e diésteres, as quais foram caracterizadas por técnicas cromatográficas (CCD, CLAE-DAD e ULPC-ESI-MS) e espectroscópicas (UV, IV e MS). As misturas de diésteres e os triésteres foram caracterizados por técnicas mono e bidimensionais de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. A formulação e os ésteres obtidos foram avaliados em modelo de artrite aguda induzida por LPS na cavidade fêmur-tibial de camundongos. A formulação F3c prolongou a redução do acúmulo neutrofílico por até 30 horas de pré-tratamento em comparação ao ATA livre administrado em dose equivalente. Todos os ésteres obtidos reduziram os parâmetros inflamatórios avaliados de forma igual ou superior

ao ATA, sendo os diésteres os compostos mais ativos. Os diésteres apresentaram atividade superior ao ATA no intervalo de doses de 1,73 a 17,3  $\mu\text{mol/Kg}$ , promovendo diminuição no acúmulo celular, em especial de neutrófilos, e redução de MPO e CXCL-1. A mistura de diésteres octílicos foi avaliada em modelo agudo e crônico de artrite induzida por antígeno, promovendo redução dos parâmetros inflamatórios avaliados de forma igual ou superior ao ATA. Em conclusão, os resultados obtidos indicam estabilidade da formulação F3c e prolongada atividade anti-inflamatória em comparação ao ATA livre, bem como promissora atividade anti-inflamatória para os diferentes ésteres obtidos, em especial para a mistura de diésteres octílicos, ativa em modelos de artrite aguda e crônica em doses inferiores ao ATA.

Palavras-chaves: ácido *trans*-aconítico, atividade antiartrítica, esterificação, microesferas, mucoadesão, polímeros.



## ABSTRACT

*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli (Alismataceae), popularly known as “chapéu-de-couro”, is traditionally used to treat different inflammatory diseases, including arthritis. Previously, our research group has demonstrated the anti-inflammatory and antinociceptive activity of different extracts, fractions and constituents from the species, including *trans*-aconitic acid (ATA), using *in vitro* and *in vivo* models. The present study aimed to improve the biopharmaceutical properties of ATA in order to explore its potential anti-arthritic activity based on two strategies: (i) production of mucoadhesive microspheres loaded with ATA (ATA-ME); and (ii) synthesis of esters from ATA. In the first case, seven batches of ME-ATA formulations were prepared employing different ratios of polymers and ATA. The preparations were characterized by their encapsulation rate, average particle size, and polydispersity index. The ATA content in the formulations was determined by a HPLC method developed and validated for this purpose. F3c formulation (composed by equal amounts (w/w) of HPMC, carbopol, and ATA) exhibited the highest encapsulation rate and was fully characterized by morphological (OM and SEM), physicochemical (FT-IR spectroscopy and zeta potential and thermal (DSC-TG,) analyses. The obtained data indicated stability of the formulation and little interaction between the matrix and ATA. The esters were synthesized by Fischer esterification reaction between ATA and three alcohols (ethanol, *n*-butanol and *n*-octanol) in the presence of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.7 % v/v) at 75 ° C for 2 hours. Kinetic studies enabled the optimization of the reaction conditions. The overall yields (sum of mono-, di- and triesters) of the reactions with ethanol, *n*-butanol and *n*-octanol were found to be 85.4%, 37.7% and 71.3%, respectively. Monoesters and diesters were obtained as isomeric mixtures and were characterized by chromatographic (TLC, HPLC-DAD, and ULPC-ESI-MS) and spectroscopic (UV, IR and MS) techniques. The diesters mixture and the triesters were characterized by mono- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and NMR analyses. F3c formulation and the obtained esters were evaluated in a model of LPS-induced acute arthritis. F3c formulation induced a prolonged anti-inflammatory response by reducing neutrophilic accumulation in the joint cavity up to 30 hours of pretreatment, in comparison to free TAA. All esters showed similar or higher anti-inflammatory activity than TAA. The diesters were the most active derivatives, exhibiting higher potency than ATA in the tested dose range (1.73 to 17.3

$\mu\text{mol/Kg}$ ), promoting a decrease of cellular accumulation, in particular of neutrophils, and reduction of MPO and CXCL-1. The *n*-octyl diesters were evaluated on acute and chronic AIA models, inducing similar or higher reduction of inflammatory parameters than TAA. In conclusion, the obtained results indicate that F3c formulation is stable and induces a prolonged anti-inflammatory response than free ATA. In addition, the obtained data highlighted the promising anti-inflammatory activity for TAA esters, especially the dioctyl-esters, which were shown to be active in acute and chronic arthritis models at lower doses than ATA.

Keywords: *trans*-aconitic acid, *Echinodorus grandiflorus*, antiarthritic activity, esterification, microspheres, mucoadhesion, polymers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eventos celulares associados ao desencadeamento da resposta inflamatória .....	31
Figura 2 - Fisiopatologia da artrite reumatoide .....	34
Figura 3 - Cascata de ativação e efeitos do TNF- $\alpha$ na AR .....	35
Figura 4 - Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas .....	48
Figura 5 - Mecanismo de mucosadesão (adaptado de Figueras, Carvalho & Veuga 2007) .....	51
Figura 6 - Formula estrutural da HPMC .....	54
Figura 7 - Monômero de ácido acrílico .....	55
Figura 8 - Esquema da metodologia empregada na obtenção da formulação F3 .....	66
Figura 9 - Esquema de reação para obtenção dos ésteres do ácido <i>trans</i> -aconítico .....	70
Figura 10 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para a análise de solução de referência de ATA utilizando o perfil exploratório (a), método A (b) e método B (c), e respectivos espectros no UV registrados no DAD. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.4.2.2 .....	83
Figura 11 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para a formulação F3c (A) e a formulação branca (B) utilizando o método B e respectivos espectros no UV registrados no DAD. Picos - 1, ATA; 2, DMA. Condições cromatográficas - vide parte experimental, item 4.4.2.2 .....	84
Figura 12 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para dimetilacetamida (DMA) e respectivo espectro no UV registrado no DAD. Condições cromatográficas - vide parte experimental, item 4.4.2 .....	85
Figura 13 - Sobreposição de espectros de UV extraídos em cinco regiões	

distintas do pico referente ao ATA na formulação ME-ATA .....	86
Figura 14 - Curvas analíticas obtidas para o ATA em dias distintos .....	87
Figura 15 - Imagens obtidas por microscopia ótica para o branco da formulação de microesferas mucoadesivas, com aumento de 100× (a) e 200× (b) .....	96
Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia ótica para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ácido <i>trans</i> -aconítico (lote F3a), com aumento de 100× (a), 200× (b) .....	97
Figura 17 - Imagens obtidas por MEV para formulação de microesferas mucoadesivas sem ATA (branco), com ampliação de 2000× (A) e 800× (B) .....	98
Figura 18 - Imagens obtidas por MEV para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (F3c), com aumento de 2700× (A) e 2000× (B) .....	99
Figura 19 - Espectros na região do IV obtidos para a formulação de contendo ATA (F3a), branco da formulação, mistura física dos constituintes da formulação, e constituintes isolados, (ATA), carbopol e HMPC.....	100
Figura 20 - Espectros obtidos na região do IV para o branco da formulação de microesferas mucoadesivas e para as formulações contendo ácido <i>trans</i> -aconíticos (ME-ATA, três lotes distintos de F3) .....	101
Figura 21 - Curvas de DSC obtidas para os componentes da formulação HMPC, carbopol e ácido <i>trans</i> -aconítico (ATA) (A), formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) e seu respectivo branco (ME, lote FB3c) (B), mistura física dos componentes contendo ATA e mistura física dos componentes sem o ATA (branco) (C) .....	103
Figura 22 - Curvas de TG e DTG obtidos para o ATA (a), formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) (b) e respectivo branco (ME, lote FB3c) (c) .....	106

<b>Figura 23 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a reação de esterificação do ATA com EtOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por 24 horas). Condições cromatográficas - vide parte experimental (perfil exploratório, item 4.4.2.2) .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 24 - Equação química geral das reações de esterificação de Fischer entre ácidos carboxílicos e álcoois em meio ácido .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 25 - Cromatoplasas obtidas por CCD de sílica gel para a avaliação da cinética das reações de esterificação do ATA com EtOH (A), BuOH (B) e OcOH (C) .....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 26 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com EtOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas - vide parte experimental (método B, item 4.4.2.2) .....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 27 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com ButOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas - vide parte experimental (método B, item 4.4.2.2) .....</b>	<b>114</b>
<b>Figura 28 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com OctOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas - vide parte experimental (método B, item 4.4.2.2) .....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 29 - Cinética da reação de esterificação do ATA com EtOH .....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 30 - Cinética da reação de esterificação do ATA com ButOH .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 31 - Cinética da reação de esterificação do ATA com OctOH .....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 32 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para os produtos da esterificação do ATA com EtOH (1), BuOH (2) e OcOH (3) em diferentes</b>	

temperaturas, no tempo de 120 minutos .....	122
Figura 33 - Cromatogramas obtidos para o fracionamento dos produtos de reação do ATA com etanol (1), <i>n</i> -butanol (2) e <i>n</i> -octanol (3) em coluna de sílica gel. Condições cromatográficas - vide parte experimental (item 4.7.5) .....	126
Figura 34 - Estruturas químicas dos ésteres etílicos, <i>n</i> -butílicos e <i>n</i> -octílicos do ATA. Em destaque (cor vermelha), o cromóforo responsável pela absorção das substâncias no UV .....	127
Figura 35 - Espectros no ultravioleta registrados <i>on line</i> pelo detector DAD para o ATA e os ésteres etílicos obtidos .....	127
Figura 36 - Espectros obtidos no IV-FTIR para o ATA e seus ésteres etílicos (A), <i>n</i> -butílicos (B) e <i>n</i> -octílicos (C) .....	128
Figura 37 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com OcOH. (a) Detecção no DAD em 210 nm; (b) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI <sup>-</sup> ) e (c) positivo (ESI <sup>+</sup> ) de ionização. Condições de análise - vide parte experimental (item 4.7.6.1) .....	131
Figura 38 - Perfil de fragmentação do triéster octílico do ATA no modo positivo de ionização, em diferentes voltagens avaliadas .....	132
Figura 39 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com OcOH. (DAD) Detecção no DAD em 210 nm; (1) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI <sup>-</sup> ) e (2) positivo (ESI <sup>+</sup> ) de ionização. Cromatogramas obtidos com diferentes voltagens de capilar - A - 4 Kv; B - 3,5 Kv; C - 3 Kv e no DAD. Condições de análise - vide parte experimental (item 4.7.6.1) .....	133
Figura 40 - Perfil de fragmentação do triéster octílico do ATA no modo positivo de ionização, nas voltagens de cone de 3 (A), 3,5 (B) e 4 kV (C) ...	134
Figura 41 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH. (a) Detecção no DAD em 210 nm; (b)	

total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI <sup>-</sup> ) e (c) positivo (ESI <sup>+</sup> ) de ionização. Condições de análise - vide parte experimental (item 4.7.6.1) .....	135
Figura 42 - Perfis de fragmentação das análises de varredura para os produtos de esterificação do ATA com EtOH - monoésteres (1, TR - 1,54 min.), diésteres (2, TR - 3,47 min.) e triéster (3, TR - 5,29 min.) etílicos em modo negativo (A) e positivo (B) de ionização nas condições otimizadas .	135
Figura 43 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS em experimentos de MS/MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH - 1 - monoésteres, 2 - diésteres, 3 - triéster. (DAD) Detecção no DAD em 210 nm; (a) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI <sup>-</sup> ) e (b) positivo (ESI <sup>+</sup> ) de ionização. Condições de análise - vide parte experimental (item 4.7.6.1) .....	137
Figura 44 - Perfis de fragmentação das análises de MS/MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH - monoésteres (1), diésteres (2) e triéster (3) etílicos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, nas condições otimizadas .....	139
Figura 45 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) e expansões (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	143
Figura 46 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) e expansões (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	144
Figura 47 - Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) ( <sup>1</sup> H, 400 MHz; <sup>13</sup> C, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	145
Figura 48 - Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) ( <sup>1</sup> H, 400 MHz; <sup>13</sup> C, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	145
Figura 49 - Correlações entre <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (representado pelas setas) observadas no mapa de contornos HMBC referente ao constituinte majoritário (19) na mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA .....	146

<b>Figura 50 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do aconitato de trietila (22) e expansões (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>151</b>
<b>Figura 51 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) obtido para o aconitato de trietila (22) .....</b>	<b>152</b>
<b>Figura 52 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do aconitato de trietila (22) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>153</b>
<b>Figura 53 - Subespectro DEPT-135 obtido para o aconitato de trietila (22) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>153</b>
<b>Figura 54 - Mapa de contornos HMQC do aconitato de trietila (22) (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>154</b>
<b>Figura 55 - Mapa de contornos HSQC do do aconitato de trietila (22) (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>155</b>
<b>Figura 56 - Mapa de contornos HMBC do aconitato de trietila (22) (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>156</b>
<b>Figura 57 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA em modelo de artrite aguda induzida por LPS .....</b>	<b>157</b>
<b>Figura 58 - Avaliação da interferência dos veículos salina e CMC sobre a atividade anti-inflamatória do ATA em modelo de artrite aguda induzida por LPS .....</b>	<b>158</b>
<b>Figura 59 - Perfil dose-resposta da atividade antiartrítica dos diésteres em modelo de artrite aguda induzida por LPS .....</b>	<b>165</b>
<b>Figura 60 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA (30 mg/kg) em modelo de artrite aguda induzida por LPS em sistema de pré-tratamento no intervalo de 1 a 48 horas .....</b>	<b>166</b>
<b>Figura 61 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da formulação F3c (30 mg/kg de ATA) em modelo de artrite aguda induzida por LPS em sistema de pré-tratamento no intervalo de 1 a 48 horas .....</b>	<b>168</b>
<b>Figura 62 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado</b>	



(p.o.) em animais sem jejum no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda) .....	175
Figura 63 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado (p.o.) em animais com jejum prévio ao tratamento de 4 horas no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda) .....	176
Figura 64 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado (p.o.) em animais com jejum prévio ao tratamento de 4 horas no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda) .....	177
Figura 65 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA (17,2 µmol/kg) e do perfil dose/resposta dos diésteres octílicos no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda) .....	180
Figura 66: Avaliação da atividade antiartrítica do ATA (172 µmol/kg) e do perfil dos diésteres octílicos (17,2 e 1,72 µmol/kg) no modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA crônica) .....	182
Figura 67: Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial (aumento de 40 e 400 vezes) de animais tratados com veículo (CMC) desafiados com PBS (controle negativo; C) e desafiados com antígeno (controle positivo; D), tratados com dexametasona (10 mg/kg; DX), com ácido <i>trans</i> -aconítico (172 µmol/kg; ATA) e com os diésteres octílicos (17,2 µmol/kg; DiO) no modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA crônica) .....	184
Figura 68: Avaliação da Score de artrite determinado histologicamente para o veículo (CMC), dexametasona (10 mg/kg), ATA (172 µmol/kg) e para os diésteres octílicos (17,2 µmol/kg) .....	186

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de fármacos encapsulados em microesferas disponíveis no mercado .....	49
Tabela 2 - Condições cromatográficas do perfil exploratório e dos métodos A e B avaliadas durante o desenvolvimento de método para quantificação de ácido <i>trans</i> -aconítico nas diferentes formulações de ME-ATA .....	62
Tabela 3 - Volumes de injeção da solução de ATA (10 µg/mL) e respectivas massas, utilizadas na construção da curva analítica .....	63
Tabela 4 - Proporção de ATA e dos polímeros (HPMC e carbopol 934) empregados no preparo dos diferentes lotes de microesferas contendo ATA (F1 a 5) e respectivos brancos (FB1 a 5) .....	65
Tabela 5 - Série eluotrópica utilizada para separação das diferentes classes de ésteres sintetizados em coluna aberta de sílica gel .....	72
Tabela 6 - Massas injetadas, áreas de pico e DPR das áreas, empregados para construção das curvas analíticas do ATA em dois dias de análise .....	86
Tabela 7 - Dados de regressão linear para o ATA em dois dias consecutivos .....	87
Tabela 8 - Avaliação da precisão intradia e interdias do ATA pelo método de CLAE-DAD .....	88
Tabela 9 - Avaliação da exatidão do método de CLAE-DAD para doseamento de ATA .....	89
Tabela 10 - Concentrações de ATA (total, adsorvido na superfície e encapsulado) em diferentes formulações de microesferas mucoadesivas (ME-ATA) .....	90
Tabela 11 - Tamanho médio e índice de polidispersão das formulações contendo ATA (F1-5) e seus respectivos brancos (FB1-5) .....	93
Tabela 12 - Tamanho médio e índice de polidispersão das formulações ME-ATA (F1-5) e seus respectivos brancos (FB1-5) .....	95
Tabela 13 - Potencial Zeta das formulações de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lotes F3a, b e c) e respectivo branco (ME, lote FB3) .....	108

Tabela 14 - Tempos de retenção (TR) nas análises por CLAE-DAD dos derivados obtidos nas reações de esterificação do ATA com diferentes álcoois e respectivos valores de log P calculados. Condições cromatográficas: vide parte experimental (método B e gradiente exploratório, item 4.4.2.2) .....	116
Tabela 15 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com EtOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD .....	118
Tabela 16 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com ButOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD .....	119
Tabela 17 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com OctOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD .....	120
Tabela 18 - Frações recolhidas, respectivas massas e derivados obtidos, caracterizados com base nos valores de R <sub>f</sub> por CCD de sílica gel, e rendimento das classes de ésteres isoladas. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.7.5) .....	126
Tabela 19 - Íons das moléculas protonadas e desprotonadas identificados nas análises dos ésteres etílicos, <i>n</i> -butílicos e <i>n</i> -octílicos do ATA por UPLC-ESI-MS no modo de varredura TIC, utilizados como íon precursor nas análises de MS/MS .....	137
Tabela 20 - Relação entre a razão <i>m/z</i> dos íons das moléculas protonadas ou desprotonadas identificados nas análises dos ésteres etílicos, <i>n</i> -butílicos e <i>n</i> -octílicos do ATA em modo de varredura (MS1) e os fragmentos gerados por estes nas análises de MS/MS por UPLC-ESI-MS nos modos positivo e negativo .....	140
Tabela 21 - Correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C observadas no mapa de contornos HMBC para o constituinte majoritário em cada mistura de diésteres ( <sup>1</sup> H, 400 MHz; <sup>13</sup> C, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	147

Tabela 22 - Atribuições dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ para os triésteres sintetizados (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	149
Tabela 23 - Atribuições dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ para os triésteres sintetizados (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	150
Tabela 24 - Principais correlações heteronucleares $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC, obtidos para o do aconitato de trietila (22) (Figuras 54 e 55) .....	155
Tabela 25 - Relação das doses administradas <i>per os</i> nos animais em milimolalidade ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) e $\text{mg}/\text{kg}$ para as diferentes classes de ésteres do ATA sintetizados .....	160
Tabela 26 - Atividade anti-inflamatória do ácido <i>trans</i> -aconítico (ATA) e dos ésteres em modelo de atrite aguda induzida por LPS na dose de $172,3 \mu\text{mol}/\text{kg}$ .....	161
Tabela 27 - Relação das doses administradas <i>per os</i> nos animais em $\mu\text{mol}/\text{kg}$ e $\text{mg}/\text{kg}$ para os ensaios de avaliação doses-resposta dos diésteres sintetizados .....	163

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Ácido <i>cis</i> -aconítico
AIA	Atrite induzida por antígeno
AR	Artrite reumatóide
ATA	Ácido <i>trans</i> -aconítico
BSA	Albumina bovina sérica
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFA	Complexo adjuvante de Freund
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos.
CMC	Carboximetilcelulose
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL1	Quimiocina C-X-C motif. Ligante 1
CXCLR-1	Receptor da quimiocina C-X-C motif. Ligante 1
D	Diésteres
DMA	Dimetilacetamida
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EtOH	Etanol
FT-IV	Infravermelho com transformada de Furrier
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICAM-1	Molécula de adesão celular-1
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS,	Óxido nítrico sintase induzida
LD	Limite de detecção
Log P	Coeficiente de partição óleo/água

LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação
M	Monoésteres
mBSA	Albumina bovina metilada sérica
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
ME-ATA	Microesferas contendo ATA
ME-B	Microesferas brancas
MEV	Microscopia eletrônica
MO	Microscopia ótica
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio
NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
OcOH	Octanol
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão salino fosfato
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1
PN	Produtos naturais
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro fetal bovino
T	Triésteres
TG	Termogravimetria
THP-1	Células de leucemia monocítica humana aguda
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tempo de retenção
UMA	Unidade de massa atômica

UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Proteína vascular de adesão molecular-1
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda máximo

## LISTA DE ESTRUTURAS MOLECULARES

1. Kirenol
2. Andrografolídeo
3. Fitol
4. Ácido hardwíckico
5. Isoorientina
6. Isovitexina
7. Ácido caftárico
8. Ácido *cis*-aconítico
9. Ácido *trans*-aconítico
10. *Trans*-desidrocrotonina
11. Cajucarinolídeo
12. Isocajucarinolídeo
13. *E*-isolinaridial
14. *E*-isolinaridial metilcetônico
15. Teucrina A
16. 19-Acetilgnafalina
17. Eriocefalina
18. Dimetilacetamida
19. Aconitato de 1,6 dietila
20. Aconitato de 5,6 dietila
21. Aconitato de 1,5 dietila
22. Aconitato de trietila
23. Aconitato de tri-*n*-butila
24. Aconitato de tri-*n*-octila



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Doenças Inflamatórias .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1 Artrite Reumatoide .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Produtos Naturais com Atividade Antiartrítica .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.1 <i>Echinodorus grandiflorus</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1.1 Composição química .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1.2 Atividade anti-inflamatória .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Estratégias utilizadas para incrementar propriedades farmacocinéticas de fármacos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.1 Reações de esterificação .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.2 Aprimoramento das propriedades farmacocinéticas com emprego de sistemas de liberação controlada de fármacos .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.2.1 Microencapsulação .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.2.2 Microesferas mucoadesivas .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.2.3 Métodos e materiais empregados na preparação de microesferas .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.2.4 Hidroxipropilmetilcelulose .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.2.5 Carbopol .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3.2.6 Emprego do HPMC e do carbopol em formulações com sistema de liberação controlada .....</b>	<b>56</b>

<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1 Equipamentos</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2 Solventes, Reagentes e Material de Consumo</b> .....	<b>58</b>
<b>4.3 Vidrarias e Materiais Diversos</b> .....	<b>60</b>
<b>4.4 Desenvolvimento e Validação do Método de CLAE-DAD para o Doseamento do Ácido <i>Trans</i>-Aconítico</b> .....	<b>60</b>
<b>4.4.1 Sistema cromatográfico</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4.2 Desenvolvimento do método analítico</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4.2.1 Preparo das amostras</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4.2.2 Desenvolvimento da condição cromatográfica</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4.2.3 Condição cromatográfica estabelecida</b> .....	<b>62</b>
<b>4.4.3 Validação do método analítico</b> .....	<b>62</b>
<b>4.4.4 Seletividade</b> .....	<b>63</b>
<b>4.4.5 Linearidade</b> .....	<b>63</b>
<b>4.4.6 Precisão intradia e interdias</b> .....	<b>64</b>
<b>4.4.7 Exatidão</b> .....	<b>64</b>
<b>4.4.8 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</b> .....	<b>64</b>
<b>4.5 Preparo das Microesferas Mucoadesivas</b> .....	<b>64</b>
<b>4.5.1 Primeira etapa: Preparo da dispersão dos polímeros (HPMC e Carbopol 934) e do ATA</b> .....	<b>65</b>
<b>4.5.2 Segunda etapa: emulsificação seguida de evaporação de solvente</b> .....	<b>65</b>
<b>4.6 Caracterização Química, Físico-Química, Térmica e Morfológica das Microesferas Mucoadesivas</b> .....	<b>66</b>
<b>4.6.1 Avaliação da taxa de encapsulação do ATA nas ME-ATA</b> .....	<b>66</b>

4.6.1.1 Teor ATA adsorvido na superfície das ME-ATA .....	66
4.6.1.2 Teor total de ATA nas ME-ATA .....	67
4.6.2 Caracterização morfológica .....	67
4.6.2.1 Avaliação granulométrica e determinação do índice de polidispersão .	67
4.6.2.2 Microscopia óptica de luz .....	68
4.6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	68
4.6.3 Caracterização térmica e físico-química das ME-ATA .....	68
4.6.3.1 Caracterização por espectrometria na região infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	69
4.6.3.2 Caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	69
4.6.3.3 Caracterização por análise termogravimétrica (TG) .....	69
4.6.3.4 Avaliação do potencial zeta .....	70
4.7 Síntese e Caracterização dos Ésteres Derivados do Ácido <i>Trans</i> -Aconítico .....	70
4.7.1 Esterificação do ácido <i>trans</i> -aconítico (ATA) .....	70
4.7.2 Avaliação da cinética das reações de esterificação .....	71
4.7.3 Determinação <i>in silico</i> do LogP .....	71
4.7.4 Avaliação do efeito da temperatura sobre as reações de esterificação ...	71
4.7.5 Purificação das compostos sintetizados .....	72
4.7.6 Caracterização dos ésteres sintetizados .....	73
4.7.6.1 Caracterização dos ésteres por UPLC-ESI-MS .....	73
4.7.6.2 Análises por RMN .....	74
4.8 Avaliação da Atividade Antiartrítica <i>In Vivo</i> .....	76
4.8.1 Animais .....	76

4.8.2 Modelo experimental de artrite induzida por LPS .....	77
4.8.3 Modelo experimental de artrite aguda induzida por antígeno (AIA) .....	78
4.8.4 Modelo experimental de artrite crônica induzida por antígeno (AIA) .....	78
4.8.5 Contagem total e diferencial de células .....	79
4.8.6 Análise Histopatológica .....	80
4.8.7 Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA .....	80
4.8.8 Protocolo de ELISA para ensaios <i>in vivo</i> .....	81
4.8.9 Determinação da atividade de mieloperoxidase .....	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
5.1 Validação Do Método Analítico para Quantificação de ATA por CLAE-DAD	82
5.1.1 Desenvolvimento do método analítico .....	82
5.1.2 Seletividade .....	84
5.1.3 Linearidade .....	86
5.1.4 Precisão intradia e interdias .....	87
5.1.5 Exatidão .....	88
5.1.6 Determinação do LD e LQ .....	89
5.2 Avaliação do teor de ATA encapsulado e adsorvido nas formulações .....	90
5.3 Análise morfológica das formulações .....	92
5.3.1 Análise granulométrica e avaliação do índice de polidispersão .....	93
5.3.2 Microscopia ótica .....	96
5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	98
5.3.4 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	100

<b>5.3.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....</b>	<b>102</b>
<b>5.3.6 Análise termogravimétrica (TG) .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3.7 Avaliação do potencial Zeta .....</b>	<b>108</b>
<b>5.4 Reações De Esterificação Do Ácido <i>Trans</i>-Aconítico (ATA) .....</b>	<b>110</b>
<b>5.4.1 Avaliação da cinética das reações de esterificação .....</b>	<b>111</b>
<b>5.4.2 Avaliação do efeito da temperatura nas reações de esterificação .....</b>	<b>122</b>
<b>5.4.3 Purificação dos ésteres sintetizados .....</b>	<b>125</b>
<b>5.4.4 Caracterização dos ésteres sintetizados .....</b>	<b>127</b>
<b>5.4.4.1 Espectroscopia no ultravioleta (UV) .....</b>	<b>127</b>
<b>5.4.4.2 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho .....</b>	<b>128</b>
<b>5.4.4.3 Caracterização dos ésteres do ATA por UPLC-ESI-MS .....</b>	<b>130</b>
<b>5.4.4.4 Caracterização das misturas de diésteres por RMN .....</b>	<b>142</b>
<b>5.4.4.5 Caracterização dos triésteres isolados por RMN .....</b>	<b>147</b>
<b>5.5 Ensaio de Atividade Biológica .....</b>	<b>156</b>
<b>5.5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA, dos ésteres de ATA e da formulação em modelo de artrite aguda induzida por LPS .....</b>	<b>156</b>
<b>5.5.2 Avaliação da atividade antiartrítica do ATA e dos diésteres octílicos em modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA) .....</b>	<b>171</b>
<b>5.5.3 Avaliação da atividade antiartrítica do ATA em modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA) .....</b>	<b>181</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>188</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>189</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A farmacoterapia moderna desenvolveu-se a partir do uso empírico de plantas, selecionadas ao longo da evolução humana. Apesar das diversas abordagens modernas disponíveis para a obtenção de novas entidades químicas com vistas ao desenvolvimento de fármacos, metabólitos secundários de plantas ainda representam uma das principais estratégias para inovação farmacêutica (DUTRA et al., 2016; CRAGG & NEWMAN, 2013).

Das 1.328 novas entidades químicas introduzidas na terapêutica no mercado americano, no período de 1981 a 2014, 686 (51,6%) possuem alguma relação com produtos naturais (PN), sejam como fitofármacos (54), fitoterápicos, nutracêuticos e cosméticos (4), derivados de PN (268), produtos sintéticos que mimetizam PN (149), produtos sintéticos com grupo farmacofórico baseado em PN (55) ou produtos sintéticos que mimetizam a ação de PN (156). Portanto, é incontestável a contribuição e importância dos produtos naturais para a terapêutica moderna (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Diversas plantas medicinais apresentam potencial para o desenvolvimento de fármacos, seja como fonte de fitofármacos ou protótipos para o desenvolvimento de derivados ou, ainda, pela padronização de frações ou extratos para a produção de fitoterápicos. Dentre as espécies de interesse no país destaca-se *Echinodorus grandiflorus*, conhecida popularmente como chapéu-de-couro, e amplamente utilizada na medicina tradicional com diferentes finalidades terapêuticas (LORENZI & MATOS, 2002; SCHNITZLER et al., 2007). Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com a espécie há alguns anos e demonstrou sua potencial atividade anti-inflamatória em modelos *in vitro* e *in vivo* (GARCIA et al., 2010; GARCIA, 2011; GARCIA et al., 2016a; GARCIA et al., 2016b).

Dentre os compostos obtidos da espécie destaca-se o ácido *trans*-aconítico, encontrado em altas concentrações em extratos etanólicos e aquoso de folhas de *E. grandiflorus* (GARCIA et al., 2016a). O ácido *trans*-aconítico apresentou atividade anti-inflamatória significativa em modelo murino de artrite, reduzindo o acúmulo leucocitário e a expressão de mediadores pró-inflamatórios (GARCIA et al., 2016b). O presente trabalho visa dar continuidade ao estudo do potencial antiartrítico do ácido *trans*-aconítico, a partir da obtenção de derivados semissintéticos e do desenvolvimento de formulações poliméricas mucoadesivas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antiartrítica de derivados semissintéticos e de formulações mucoadesivas contendo ácido *trans*-aconítico (ATA).

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver e realizar a caracterização físico-química e morfológica de formulações de microesferas mucoadesivas para encapsulação do ácido *trans*-aconítico, visando sua administração oral.
2. Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar o ATA nas formulações supracitadas.
3. Realizar transformações químicas com o ATA, visando obter produtos mono, di e tri-esterificados com etanol, *n*-butanol e *n*-octanol.
4. Realizar a caracterização estrutural dos ésteres obtidos por métodos espectroscópicos usuais.
5. Avaliar a atividade anti-inflamatória dos produtos obtidos pelas reações de esterificação e da formulação com maior percentual de encapsulação em modelo de artrite aguda induzida por LPS em camundongos.
6. Selecionar o derivado mais ativo no modelo murino de artrite aguda induzida por LPS e avaliá-lo em modelo murino de artrite aguda e crônica induzida por antígeno.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

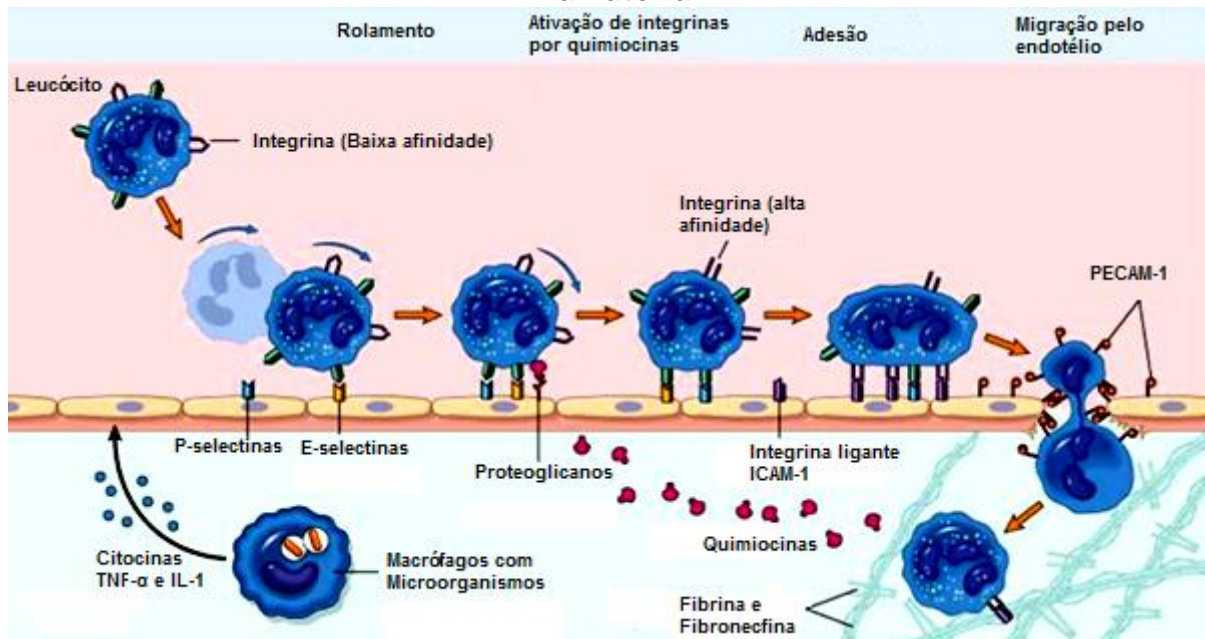
#### 3.1 Doenças inflamatórias

As injúrias sofridas pelo corpo, sejam de origem física (traumas, queimaduras, radiações), biológica (infecções microbianas ou reações auto-imunes) ou química (substâncias agressivas e irritantes), estimulam componentes da imunidade inata e adquirida, ativando uma rede de fatores que iniciam a resposta inflamatória. Esta resposta visa restaurar a homeostase do corpo, eliminando o agente nocivo responsável pela lesão celular e restaurar a integridade do tecido lesionado, constituindo o processo fisiológico inflamatório. Porém, quando esta resposta inicial não é suficiente para resolução e eliminação do agente agressor, ocorre uma intensificação do processo inflamatório, acompanhado pela maior proliferação de citocinas, quimiocinas e elementos celulares, característicos da inflamação sub-crônica. Esta, por sua vez, pode levar à perda de função do tecido injuriado que origina doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide e a aterosclerose (MISHARIN et al., 2012; ISOBE, KATO & ARITA, 2012; BRADFORD et al., 2015).

A fase inicial supracitada é característica da inflamação aguda e visa à remoção do agente etiológico da lesão e, conseqüentemente, à diminuição da extensão dos danos que este possa vir a provocar. A presença do agente agressor no local da lesão ativa receptores na membrana dos leucócitos residentes, que através de diferentes vias de sinalização levam à liberação de quimiocinas, como a quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1), responsáveis por desencadear a interação entre neutrófilos e o endotélio vascular por quimiotaxia, iniciando o recrutamento celular. Os neutrófilos rolam sobre o epitélio vascular por intermédio das selectinas; em seguida, sofrem ativação pelas citocinas e integrinas, se aderindo ao endotélio. A adesão efetiva se dá pela interação entre o neutrófilo e a integrina ligante denominada molécula celular de adesão 1 (ICAM-1). Na sequência, ocorrem modificações no citoesqueleto permitindo a transmigração dos neutrófilos por entre as junções celulares, um processo mediado pela integrina denominada molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1), com conseqüente alcance do interstício, onde podem exercer sua função protetora através da fagocitose do agente etiológico, seguida de sua destruição (YOON & BAEK, 2005; ABBAS et al., 2008) (FIGURA 1).



**FIGURA 1 - Eventos celulares associados ao desencadeamento da resposta inflamatória.**



Desencadeamento dos eventos celulares associados à resposta inflamatória. Liberação de citocinas por macrófagos ativados pela fagocitose de microrganismos, responsáveis pela translocação de leucócitos para o sítio injuriado através da alteração de permeabilidade do endotélio vascular.

**Fonte: Adaptado de ABBAS et al., 2008.**

Em função desta resposta, observa-se a prevalência de quatro dos cinco sinais cardinais da inflamação: dor, tumor ou edema, rubor e calor. A dor se expressa em função da maior sensibilidade dos noceptores associados ao tecido e compressão do local pelo edema. O edema, calor e rubor são consequências da alteração da permeabilidade vascular, com o extravasamento de água, sais, proteínas e migração de leucócitos para o interstício. Estes fatores são acompanhados da ativação de macrófagos tissulares, plaquetas, sistema do complemento, da cascata de coagulação, liberação de enzimas, citocinas, quimiocinas, eicosanóides e moléculas de adesão, responsáveis por regular a resposta inflamatória, caracterizando a cascata da inflamação (SERHON, WARD & GILROY, 2010).

A resposta inflamatória é influenciada pela presença de citocinas e quimiocinas. As quimiocinas são citocinas especializadas de menor massa molecular (7 a 15 kDa), que desempenham papel essencial na inflamação aguda, uma vez que são dotadas da capacidade de recrutar subpopulações de leucócitos para o sítio lesionado. No geral, elas apresentam estruturas homólogas divididas em quatro

subfamílias de acordo com a distribuição dos resíduos de cisteína: CC, CXC, CX3C e XC, onde C representa a cisteína e X outro aminoácido. A subfamília CXC apresenta quimiotaxia para neutrófilos uma vez que estas células possuem receptores CXCR1 e CXCR2, capazes de se ligarem a CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8. Os neutrófilos que migram para o sítio lesionado liberam mais mediadores quimiotáticos (CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10), responsáveis por recrutar outros leucócitos para o tecido afetado, intensificando o processo inflamatório (PALOMINO & MARTI, 2015; GUERREIRO, SANTOS-COSTA, AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

Outras citocinas importantes presentes na inflamação aguda são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL) IL-1 $\beta$  e IL-6, produzidas principalmente pela ativação de leucócitos como macrófagos e mastócitos, bem como por proteínas hepáticas de fase aguda, principalmente haptoglobina, plasmina, proteína amilóide A sérica e proteína C reativa, que apresentam concentrações elevadas em processos inflamatórios, principalmente em quadros infecciosos, atuando como marcadores do processo inflamatório (CECILIANI et al., 2012).

Esta acentuação da inflamação decorrente da presença dos elementos celulares e moleculares intensifica de forma direta a lesão tecidual podendo levar à perda de função do órgão afetado. O mau funcionamento de um tecido em função da resposta inflamatória caracteriza a fase subaguda da inflamação. Esta, por sua vez, pode sofrer influência do metabolismo e de co-morbidades, provocando alterações em componentes do sistema imunológico, favorecendo o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011).

A inflamação crônica caracteriza-se pela persistência do quadro inflamatório em níveis vasculares, celulares e moleculares em decorrência da não resolução da inflamação. Observa-se ativação do sistema imunológico para intensificar a inflamação, resultando na destruição do tecido associado. Este tipo de inflamação pode durar semanas, meses e até a vida toda. Enquanto na inflamação aguda há um maior recrutamento de neutrófilos, na inflamação crônica se observa acentuada migração de monócitos, macrófagos e linfócitos, o que reflete em maior proliferação de citocinas, integrinas e quimiocinas características deste tipo de inflamação, tais como ICAM-1, VCAM-1 e a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1). Por sua vez, essas interagem com citocinas como TNF- $\alpha$ , interferon gama (INF- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-

12 e IL-8, provocando alterações morfológicas e funcionais no tecido, incluindo granuloma, necrose e fibrose. Estas características são comumente observadas em doenças inflamatórias crônicas como aterosclerose e artrite reumatoide (NATHAN & DING, 2010; MONTEIRO & AZEVEDO, 2010).

### **3.1.1 Artrite reumatoide**

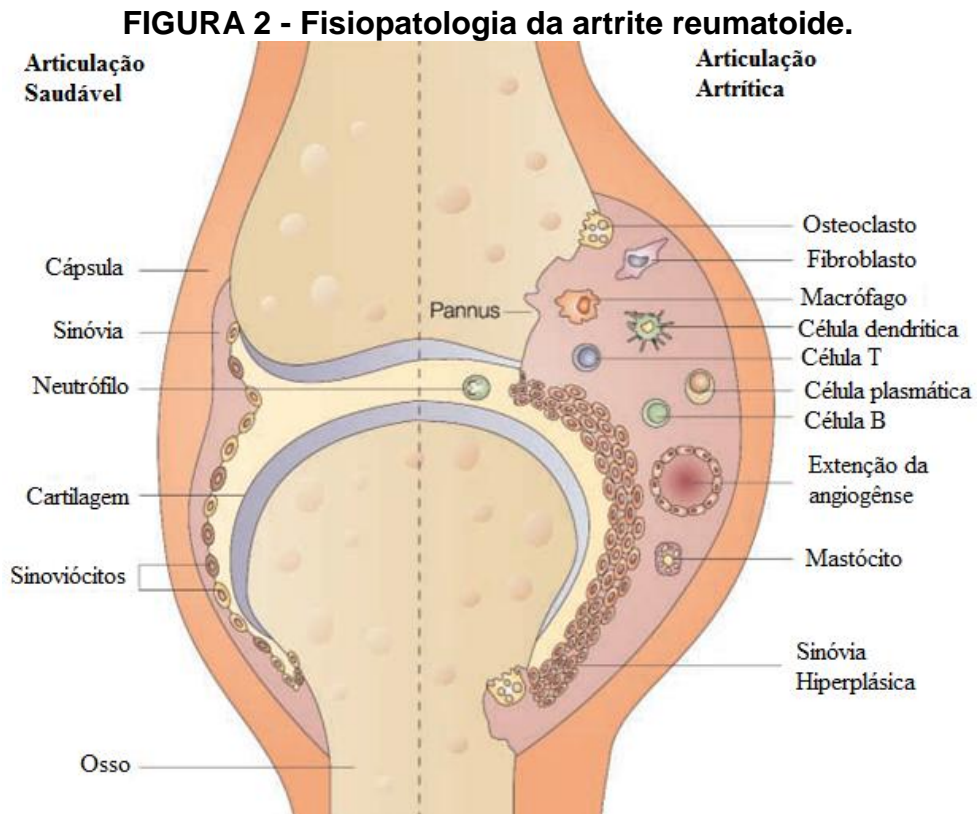
A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, de etiologia desconhecida, que leva à destruição das articulações e deformidades por erosão do osso e cartilagem. Afeta mulheres três vezes mais do que homens, e sua incidência aumenta com a idade. Em geral, a AR acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem incapacidade para realizar atividades da vida diária e profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade. Em função dos efeitos patológicos, observa-se significativa diminuição da expectativa de vida, entre cinco a dez anos (XAVIER et al. 2012).

AR se caracteriza pela inflamação da sinóvia, uma fina membrana localizada entre as articulações. A inflamação ocorre quando há infiltração das células do sistema imune, tornando o tecido hiperplásico e levando à deterioração da cartilagem articular e do osso, sendo esse processo mediado por citocinas, quimiocinas, e enzimas degeneradoras de matriz, tendo o TNF- $\alpha$  um papel de destaque na doença (FROMMER et al. 2010; CHANG, GU & BRENNER 2010).

A figura 2 apresenta as principais diferenças observadas em uma articulação saudável e uma articulação artrítica. A articulação artrítica apresenta sinóvia hiperplásica em função do acúmulo leucocitário, angiogênese e alteração da permeabilidade vascular decorrente do processo inflamatório instaurado, formando o pannus. Estes fenômenos são acompanhados por degradação óssea e da cartilagem da articulação mediada por osteoclastos, que se encontram ativados na artrite devido a ativação do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) ligantes (RANKL) por citocinas pró-inflamatórias, em especial o TNF- $\alpha$ . O RANKL encontra-se presente na superfície dos osteoclastos e atua na sua ativação e diferenciação; seu efeito é contrabalanceado pela osteoprotegerina (OPG). O balanço entre essas duas proteínas é responsável pela homeostase óssea em indivíduos saudáveis; porém, em

um quadro de artrite há maior expressão de RANKL e, como consequência, maior extensão do processo de degeneração e erosão óssea (TRACEY et al., 2008).

Observa-se, concomitante a estes eventos, uma hiperplasia do revestimento sinovial, caracterizada pela maior produção de sinoviócitos, células estruturais da sinóvia (SMOLEN & STEINER, 2003).



Observa-se na articulação artrítica (à direita) a hiperplasia sinovial e formação do pannus em decorrência do acúmulo leucocitário, extensão de angiogênese e alteração da permeabilidade vascular local. Verificam-se a degradação da cartilagem e do osso da articulação por osteoclastos, presentes em maior número na articulação artrítica quando comparada a articulação saudável (à esquerda).

**Fonte: Adaptado de SMOLEN & STEINER, 2003.**

Devido ao número elevado de leucócitos presentes na articulação artrítica, e o papel destes na ativação e/ou produção de mediadores químicos, observa-se exacerbação nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e metaloproteases. Na artrite reumatoide há uma maior expressão destas citocinas porque os sinoviócitos, por apresentarem atividade fagocítica, são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SAKAGUCHI & SAKAGUCHI, 2005).

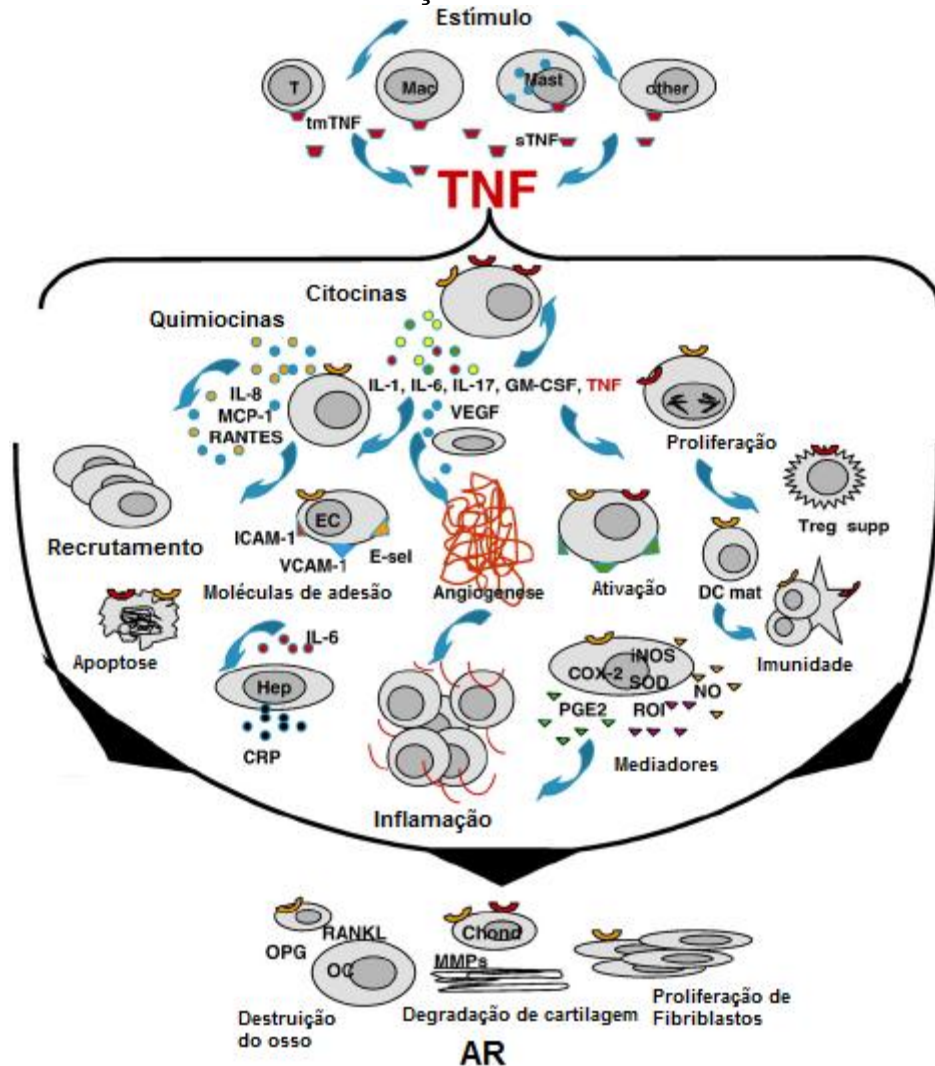
Ao ser estimulado, o TNFR1 inicia uma cascata de ativação de genes responsáveis pela produção de TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B, o que caracteriza esta citocina

como iniciadora e mantenedora do processo inflamatório (VALENCIA et al., 2006; PAUL, GOHIL & BHUTANI, 2006).

O TNF- $\alpha$  tem papel crucial na AR, uma vez que este é produzido e/ou tem sua produção estimulada por diferentes células presentes na artrite, tais como mastócitos, macrófagos, células T e sinoviócitos. Desta forma, o TNF- $\alpha$  inicia uma cascata de eventos que vai desde o recrutamento celular até a ativação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, ICAM, e VCAM, entre outras, responsáveis pelo quadro patológico da doença (CROFT, BENEDICT & WARE, 2013).

A ativação do TNF- $\alpha$  é mediada por uma cascata complexa de eventos interdependentes, que envolve uma série de citocinas e quimiocinas, como apresentado na figura 3 (TRACEY et al., 2008).

**FIGURA 3 - Cascata de ativação e efeitos do TNF- $\alpha$  na AR.**



Participação da citocina TNF na ativação de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias e diferenciação de osteoclastos e metaloproteinases, responsáveis pela degradação óssea.

**Fonte: Adaptado de TRACEY et al., 2008.**

Tendo em vista o papel fundamental do TNF- $\alpha$  na etiologia e manutenção da AR, e de outras doenças inflamatórias crônicas, várias pesquisas vêm sendo conduzidas visando obter inibidores desta citocina. Atualmente estão comercialmente disponíveis anticorpos monoclonais antagonistas de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ , os quais estão entre as alternativas terapêuticas mais bem-sucedidas na redução das doenças inflamatórias autoimunes (AHMED et al.; 2006; BURNS & WORTMANN, 2011).

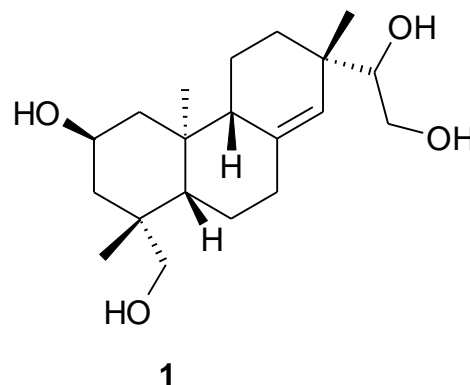
Os tratamentos farmacológicos são a principal terapia para os pacientes com AR ativa e objetivam induzir a remissão clínica e inibir a progressão de danos articulares, estruturais e funcionais. Cinco classes de fármacos são utilizadas com esse propósito: analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides, fármacos modificadores do curso da doença reumática (metotrexato, sulfasalazina, ciclosporina, hidroxicloroquina, cloroquina e leflunomida), e terapia alvo com agentes biológicos (VENSON, 2011; SINGH et al., 2016).

Dentre os agentes biológicos indicados para o tratamento de adultos com AR ativa de intensidade moderada a grave, com resposta anterior inadequada à terapia com fármacos antirreumáticos modificadores da doença, ou concomitante com esses agentes, estão o abatacepte e o tocilizumabe, indicados também em caso de resposta inadequada aos agentes anti-TNF adalimumabe, certolizumabe pegol, etanercepte, golimumabe e infliximabe. O rituximabe é indicado somente em combinação com metotrexato para o tratamento de pacientes adultos com artrite reumatoide ativa, que tiveram resposta inadequada ou intolerância a uma ou mais terapias anti-TNF (FELDMANN, 2002). Essa terapia apresenta boa efetividade, porém custo bastante elevado. Os últimos dados do Ministério da Saúde relatam que os gastos com terapias anti-TNF podem atingir anualmente R\$52.000 por paciente. Além disso, as terapias baseadas em anticorpos monoclonais são de administração subcutânea ou intravenosa, o que diminui a adesão do paciente ao tratamento (BRASIL, 2012).

### **3.2 Produtos naturais com atividade antiartrítica**

Tendo em vista que o tratamento da artrite com fármacos biológicos é oneroso, faz-se necessário buscar alternativas terapêuticas eficazes com menor custo e com maior facilidade de produção. Uma dessas alternativas é o emprego de produtos naturais. Diversos estudos demonstram que substâncias isoladas de plantas apresentam atividade significativa em modelos pré-clínicos de artrite, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios e a infiltração de células de defesa nas articulações.

Uma dessas substâncias é o kirenol (**1**), um diterpeno com esqueleto clerodânico, constituinte majoritário de *Siegesbeckia orientalis*. O kirenol, administrado *per os* na dose de 2 mg/Kg a ratos Wistar, foi avaliado em modelo de artrite induzida por colágeno. Este diterpeno reduziu a expressão de células TCD4 e TCD25, bem como os níveis de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , quando comparado com o grupo controle e com o grupo tratado com o controle positivo prednisolona (2 mg/kg) (LU et al. 2012).

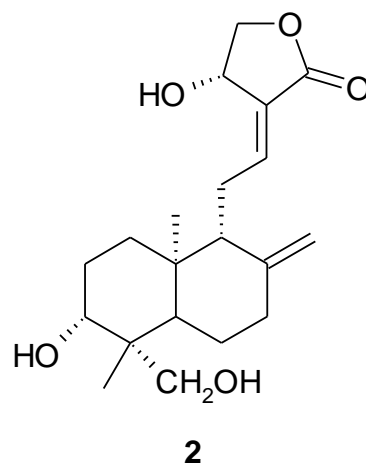


Wang et al. (2011) avaliaram a atividade antiartrítica do kirenol em ratos com artrite induzida pela aplicação de colágeno tipo II. Os autores verificaram que o kirenol apresentou atividade anti-inflamatória dose-dependente, e que a dose de 4 mg/kg foi efetiva em comparação com o controle negativo. Os autores sugeriram que o kirenol apresenta mecanismo de ação anti-inflamatória semelhante ao da prednisolona, porém o diterpeno não inibiu a expressão de receptores  $\alpha$  de glicocorticoides e corticotropina adrenal e, portanto, não apresenta as mesmas limitações do tratamento com glicocorticoides.

Um estudo clínico foi realizado com um extrato padronizado de *Tripterygium wilfordii*, administrado na dose de 60 mg/paciente três vezes ao dia, durante 24 semanas, em voluntários com artrite reumatoide. Como controle positivo foi empregado sulfassalazina (1 g/paciente), administrada duas vezes ao dia. O extrato

padronizado apresentou menor eficácia que a sulfassalazina, porém exibiu atividade antiartrítica relevante mostrando melhora dos parâmetros bioquímicos e de marcadores inflamatórios como níveis de IL-6 e fator reumatoide, bem como regressão do quadro de artrite reumatoide, avaliado através de testes radiológicos (MANSK et al. 2009).

Outro composto que vem sendo estudado quanto sua potencial atividade antiartrítica é o andrografolídeo (**2**), um diterpeno labdânico encontrado na espécie *Andrographis paniculata* (YAN et al. 2011).



Yan et al. (2011) investigaram os efeitos do andrografolídeo em sinoviócitos fibroblásticos isolados de pacientes humanos com artrite reumatoide nas concentrações de 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ . Os autores verificaram que o composto foi capaz de inibir a proliferação de sinoviócitos fibroblásticos de forma concentração-dependente. Eles sugeriram que essa inibição ocorreu por mecanismo pró-apoptótico, interrompendo o ciclo de replicação celular da fase G0 para a fase G1.

Hidalgo et al. (2013) administraram um extrato padronizado de *Andrographis paniculata* (Paractin<sup>®</sup>) contendo 30 mg de andrografolídeo, três vezes ao dia, a pacientes com artrite reumatoide. Os autores relataram uma redução na produção de mediadores pró-inflamatórios, como iNOS, COX-2 e citocinas, nos pacientes tratados com andrografolídeo. Segundo os autores, o mecanismo da atividade antiartrítica do andrografolídeo estaria relacionado com a redução da ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT3 e NFAT, com inibição das vias de sinalização intracelular, interferindo diretamente na proliferação celular.

### 3.2.1 *Echinodorus grandiflorus*



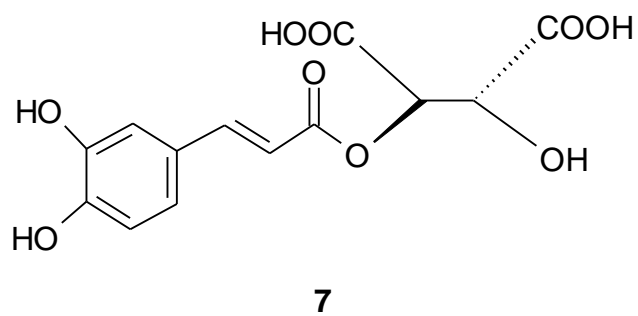
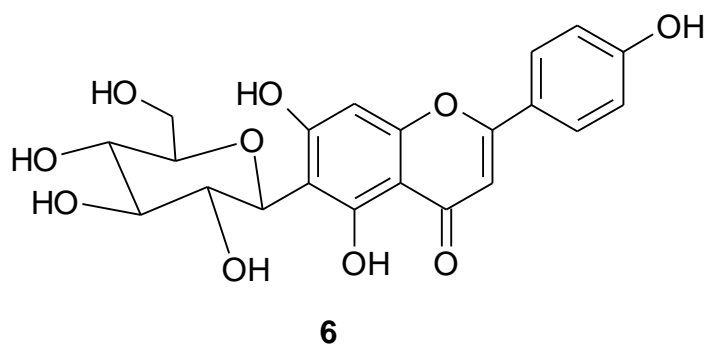
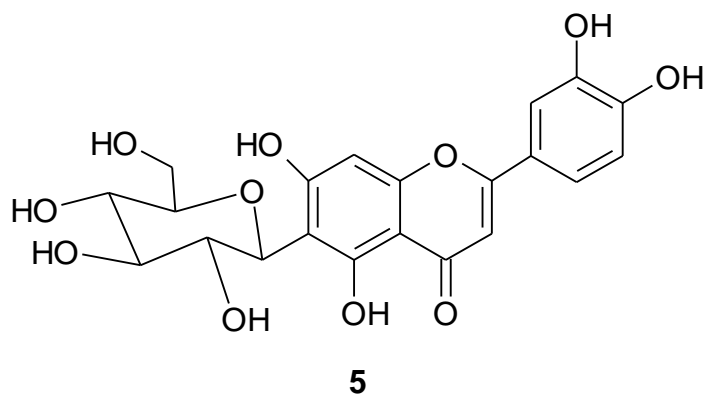
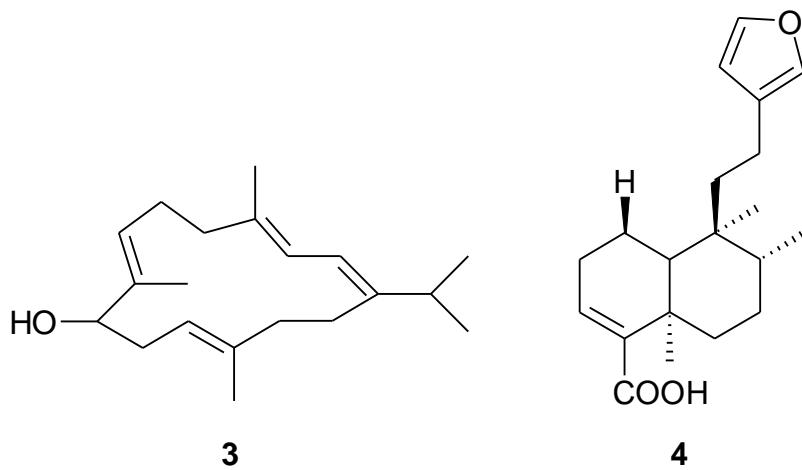
*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl.) Micheli. (Alismataceae), conhecida popularmente como chapéu-de-couro, é uma planta aquática enraizada, ocorrente em solos com alta umidade, como regiões pantanosas e margens de rios. A espécie é amplamente distribuída em todo território nacional (CORREA, 1931; LORENZI 2000).

*E. grandiflorus* possui usos etnomédicos variados; as folhas são empregadas como diurético, depurativo, tônico, antirreumático, antiartrítico e para tratar afecções orais, renais, hepáticas e dermatológicas, bem como em casos de hiperuricemia e aterosclerose (CORREA, 1931; CRUZ, 1965; CRUZ, 1985; PANIZZA, 1997; CORRÊA et al., 1998; MARTINS et al., 1998; LOW et al., 1999; LORENZI & MATOS, 2002, GARCIA et al., 2010).

A literatura científica relata as atividades diurética, antinoceptiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica, hipocolesterolêmica e anti-hipertensiva para a espécie (SOUZA et al., 2004; DUARTE et al., 2002; WRIGHT et al., 2007; CARDOSO PEREIRA & LAINETTI, 2003; PIMENTA, 2002; MATOS et al., 2000; LESSA et al., 2008; SILVA, BASTOS, TAKAHASHI, 2010; TIBIRIÇA et al., 2007).

### 3.2.1.1 Composição química

A composição química de *E. grandiflorus* já foi investigada e compreende diterpenos com esqueletos do tipo cembrano, como o fitol **(3)** (MANN & HARTMANN, 1993), e clerodânico, como o ácido hardwíckico **(4)** (TANAKA, 2000), além de C-glicosídeos flavônicos como a isorientina **(5)** e isovitexina **(6)**, bem como ésteres do ácido tartárico, como o ácido caftárico **(7)**. Das folhas da espécie foram isolados os isômeros do ácido aconítico: ácido *cis*-aconítico **(8)** e ácido *trans*-aconítico **(9)**, sendo este último caracterizado como componente majoritário da espécie, com teores de 0,51-0,98% m/m (SCHNITZLER, 2005).





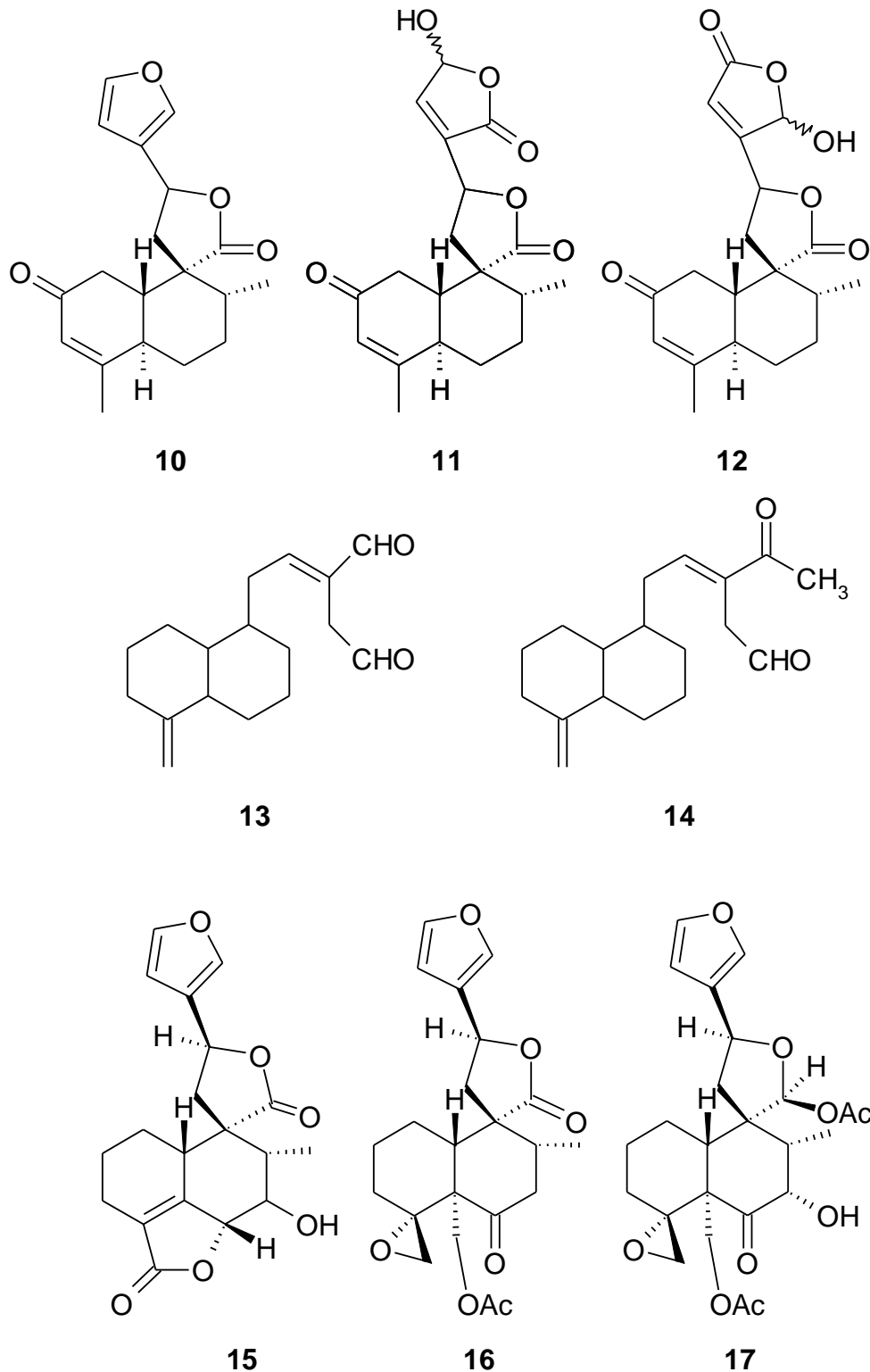
### 3.2.1.2 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória de *E. grandiflorus* já foi investigada em diversos modelos. Extratos hexânico, metanólico e aquoso de folhas da espécie foram avaliados no modelo de edema de pata de camundongo induzido por *p*-metóxi-N-metilfenetilamina, serotonina e histamina. Os três extratos reduziram o edema de pata induzido por *p*-metóxi-N-metilfenetilamina e pela serotonina; todavia, apenas o extrato aquoso reduziu o edema de pata provocado por histamina (PIMENTA, 2002). Nesse mesmo estudo, a fração solúvel em metanol do extrato aquoso liofilizado apresentou, na dose de 100 mg/kg, por via oral, inibição do edema em pata de camundongo induzido por *p*-metóxi-N-metilfenetilamina cerca de 87% superior ao anti-inflamatório dexametasona (PIMENTA, 2002).

O diterpeno fitol (**4**), isolado de *E. grandiflorus*, apresentou atividade anti-inflamatória no ensaio de inibição de edema em pata de rato induzido por carragenina e por histamina (SHIMIZU & TOMOO, 1994). A atividade anti-inflamatória de diterpenos com esqueletos estruturais diversos encontra-se relatada na literatura, incluindo diterpenos clerodânicos de *Croton cajucara* (MACIEL et al., 2000). A *trans*-desidrocrotonina (**10**) inibiu o edema em pata de rato induzido por carragenina (CARVALHO et al. 1996), enquanto o cajucarinolídeo (**11**) e o isocajucarinolídeo (**12**) inibiram *in vitro* a fosfolipase A2 (ICHIHARA et al. 1992), enzima essencial para a geração do ácido araquidônico e de fosfolipídeos de membrana.

Outros exemplos de compostos dessa classe com atividade anti-inflamatória são os diterpenos *neo*-clerodânicos *E*-isolinaridial (**13**) e seu derivado metil-cetônico (**14**), isolados de *Linaria saxatilis* var. glutinosa. Esses compostos inibiram a fosfolipase A2 de forma concentração-dependente, com valores de  $CI_{50}$  de 0,20 e 0,49  $\mu$ M, respectivamente (BENREZZOUK et al. 1999). Além disso, os diterpenos clerodânicos teucrina A (**15**), 19-acetilgnafalina (**16**) e eriocefalina (**17**), isolados de espécies de *Teucrium*, inibiram a 5-lipoxigenase com  $CI_{50} \leq 10 \mu$ M, com

consequente redução da formação de leucotrieno LTC<sub>4</sub>, mas não se mostraram efetivos em inibir as enzimas COX-1 e COX-2 (HERAS et al. 2001).



Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa foi demonstrada a atividade anti-edematogênica dos extratos etanólicos a 50% e a 70% de folhas de *E. grandiflorus*, avaliados na dose de 1000 mg/kg, p.o., em modelo de edema em pata

de camundongo induzido por carragenina. No mesmo estudo, observou-se uma redução significativa do edema para as frações enriquecidas em diterpenos (70–420 mg/kg, p.o.) e em flavonoides (7,2–36 mg/kg, p.o.). Adicionalmente foi observado que o ácido *trans*-aconítico inibiu o edema (51,6%) 2 horas após a injeção da carragenina, na dose de 270 mg/kg. Já o ácido *cis*-aconítico (ACA) inibiu o edema de forma significativa apenas 1 hora após a injeção da carragenina, na dose de 270 mg/kg (68,2% de inibição) (GARCIA et al., 2010).

Extratos e frações padronizadas de *E. grandiflorus* demonstraram potente atividade antiartrítica em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) e capacidade de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  em células THP-1 estimuladas com LPS. Observou-se que ambas as atividades estavam relacionadas com os teores de ácido *trans*-aconítico e de flavonoides presentes nos diferentes derivados da droga vegetal (GARCIA et al., 2016a; GARCIA et al., 2016b)

Em relação à atividade dos isômeros do ácido aconítico, nosso grupo de pesquisa demonstrou sua potencial atividade antiartrítica em modelo de AIA em camundongos (GARCIA, 2011). O ácido *trans*-aconítico (ATA) reduziu de forma significativa o número total de células na cavidade articular na dose de 30 mg/kg, efeito este observado para o ácido *cis*-aconítico (ACA) somente na maior dose avaliada (90 mg/kg). A migração de neutrófilos para a cavidade articular foi reduzida pela administração de ATA nas doses de 10 e 30 mg/kg, não havendo diferença estatística entre estas; já o isômero *cis* promoveu tal efeito na maior dose (90 mg/kg). ATA não reduziu a migração de neutrófilos para o tecido periarticular em nenhuma das doses avaliadas, enquanto o tratamento com ACA resultou em diminuição significativa do número de neutrófilos para o tecido periarticular nas três doses avaliadas, sendo estas estatisticamente equivalentes.

Quanto à avaliação toxicológica, Misra et al. (1989) descrevem ausência de toxicidade aguda para camundongos BALB c tratados com ATA na dose de 2 g/kg por via intraperitoneal. Andersen & Jensen (1984) avaliaram o potencial mutagênico de ácido aconítico por teste de AMES na faixa de concentração de 32 a 20.000  $\mu$ g por placa. Os autores não constataram potencial mutagênico da substância nas concentrações avaliadas; porém, os mesmos não descrevem qual isômero foi testado, apenas que o fator motivante do estudo foi o fato do composto ser usado como flavorizante em produtos alimentícios como doces, sorvetes e bebidas.

### 3.3 Estratégias utilizadas para incrementar propriedades farmacocinéticas de fármacos

De forma sumária, o desenvolvimento de um novo fármaco segue uma série de etapas pré-estabelecidas, como identificação e caracterização de um alvo molecular, seleção e otimização de candidatos, avaliação de atividade biológica em modelos *in vitro* e *in vivo*, e ensaios pré-clínicos e clínicos, o que gera um custo bastante elevado, configurando um investimento de risco (BOECK et al., 2005; SILVA, 2013).

Poucos candidatos a fármacos chegam à fase clínica, sendo o fator atribuído a diferentes razões. Estima-se que o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco dure cerca de 12 anos com pequenas taxas de sucesso, pois a cada 30.000 candidatos a fármaco, apenas 66,7% entram na fase de estudos pré-clínicos, destes apenas 200 (0,67%) chegarão a fase I de estudos clínicos, e um percentual ainda menor na fase II (0,13%) e fase III (0,04%). Ao fim do processo apenas 0,027% destas moléculas são aprovadas por órgãos regulatórios; porém, nem todas chegam a ser empregadas na terapêutica por razões de ordem técnica, econômica e/ou toxicológica (NUNES, 2015).

Panchagnula & Thomas (2000) avaliaram 198 candidatos a fármacos que não chegaram à fase clínica e identificaram as razões do insucesso: 8% por questões de inviabilidade econômica, como mercado desfavorável ou ausência de inovação, 21% por toxicidade, 30% por ausência de eficácia terapêutica e a maioria, 40%, devido a propriedades farmacocinéticas insatisfatórias. A inadequação das propriedades farmacocinéticas pode estar relacionada à absorção, distribuição, metabolismo e/ou excreção (DAVIS & RILEY, 2004; CALIXTO & SIQUEIRA JUNIOR, 2008; NUNES, 2015)

Uma forma de aprimorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas é realizar transformações químicas no candidato a fármaco, incrementando suas propriedades biofarmacêuticas, como, por exemplo, através de reações de esterificação para diminuir a polaridade de substâncias altamente polares, reduzindo a taxa de excreção das mesmas. Outra estratégia, com a mesma finalidade, é a encapsulação do fármaco em formulações que controlem sua liberação, como o emprego de microesferas mucoadesivas que permitem a liberação gradativa do fármaco, bem como sua maior permanência no organismo (FIGUEIRAS, CARVALHO & VEUGA, 2007).

### 3.3.1 Reações de esterificação

As modificações químicas em protótipos moleculares são amplamente empregadas no intuito de obter análogos com características químicas melhoradas, que resultem em incremento da atividade biológica, alterando parâmetros farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos. Essas modificações químicas podem alterar características da substância como pH, lipofilia, capacidade de formação de ligações de hidrogênio, entre outras. Diversas reações são utilizadas para este propósito, incluindo a esterificação (VIEGAS et al. 2006).

Classicamente, a esterificação de Fisher é realizada a partir da reação entre a substância de interesse, usualmente um ácido carboxílico, e um álcool, geralmente metanol ou etanol, em meio ácido forte (ácido sulfúrico ou fosfórico), em condições variáveis de temperatura. Porém, essa reação apresenta fatores limitantes, devido ao pH ou à temperatura empregada. Com o avanço da química sintética, reações mais sensíveis e com maior rendimento foram desenvolvidas, utilizando diferentes catalisadores, propiciando a obtenção dos produtos sem degradar a substância de partida (MCNUTLY et al. 2005; MORCILLO et al. 2011).

Piang-Siong et al. (2012) avaliaram o emprego de diferentes condições catalíticas para a síntese de ésteres de aconitato. Os autores avaliaram a produção de ésteres por três métodos catalíticos diferentes: catálise homogênea, catálise heterogênea e sistema catalítico líquido iônico; álcool isoamílico foi empregado como solvente em todas as condições. Na catálise homogênea, ácido sulfúrico foi usado como catalisador; na heterogênea, empregou-se resina Amberlyst<sup>®</sup> 15 H<sup>+</sup>, e na catálise por líquido iônico, 1-metilimidazol/ácido sulfúrico (Basionics<sup>®</sup> AC 39). A catálise homogênea apresentou o maior rendimento em triéster, a catálise heterogênea em monoésteres e a catálise com líquido iônico favoreceu a produção de diésteres.

Cao et al. (2011) sintetizaram um poliéster a partir de reações de esterificação do ácido *trans*-aconítico com dietilenoglicol. Os autores usaram como catalisador o ácido sulfúrico concentrado e como solvente o tetrahidrofurano. Com emprego dessas condições, foram realizadas sucessivas esterificações, obtendo como produto final um poliéster de elevada massa molecular.

Kolah et al. (2007) descreveram diferentes condições reacionais para obtenção de mono, di e triésteres do ácido cítrico. Os autores avaliaram o efeito da temperatura no rendimento da reação, na faixa de 78 a 120°C. Foram empregadas

concentrações molares de etanol/citrato variando de 5:1 a 15:1, e concentrações de até 5% da resina Amberlyst® 15 H<sup>+</sup>, empregada como catalisador. Os autores verificaram que o aumento da temperatura resultou em maior produção de diésteres. Este método configura uma alternativa para a esterificação de moléculas sensíveis a variações de pH, uma vez que não é necessário o emprego de ácidos fortes como catalisador.

### **3.3.2 Aprimoramento das propriedades farmacocinéticas com emprego de sistemas de liberação controlada de fármacos**

A administração de fármacos por via oral é extensamente utilizada na terapêutica, tendo em vista que esta propicia flexibilidade de doses, segurança, capacidade de explorar todo trato gastrointestinal (TGI) como nicho de absorção, e por apresentar maior adesão terapêutica por parte do paciente, em comparação com outras vias (PINTO, 2010). Porém, as formas farmacêuticas sólidas apresentam rápida liberação do fármaco e, devido à variabilidade fisiológica, esta liberação não ocorre de forma uniforme, o que influi diretamente na variação da resposta terapêutica (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007). Outro fator que afeta diretamente a atividade biológica de uma substância é seu tempo de permanência no organismo. Substâncias de elevada polaridade tendem a ser eliminadas rapidamente, resultando em resposta biológica de curta duração (FIGUEIRAS, CARVALHO & VEUGA, 2007).

Neste aspecto, as tecnologias aplicadas a sistemas de liberação de fármacos são amplamente utilizadas com diferentes finalidades, incluindo uniformização da resposta terapêutica, minimização de efeitos colaterais e extensão do tempo de liberação do fármaco, aumentando sua biodisponibilidade e diminuindo a variabilidade da resposta farmacológica (ANSEL, POPOVIC & ALLEN, 2000). Sistemas multiparticulados apresentam vantagens em relação às formas monolíticas, incluindo maior uniformidade de distribuição do fármaco na superfície do TGI e redução do risco de irritação da mucosa por acúmulo do fármaco em um único ponto do tecido (SUAVE et al., 2006).

Uma das alternativas para prolongar a ação dessas substâncias é sua administração em sistemas matriciais de liberação controlada de fármacos, onde a molécula bioativa é encapsulada em uma matriz que propicia sua liberação de forma gradativa. O emprego de polímeros na formação desta matriz confere propriedades



adicionais ao sistema carreador devido às características intrínsecas destes, uma vez que estes podem ser biodegradáveis e/ou mucoadesivos. Estes fatores associados caracterizam a versatilidade do emprego da microencapsulação no carregamento e liberação controlada de fármacos (NEDOVIC et al., 2011).

### **3.3.2.1 Microencapsulação**

Os primeiros relatos sobre o emprego da microencapsulação datam da década de 1930; desde então, esta técnica é aplicada em diferentes áreas industriais, seja farmacêutica, química, agroquímica e alimentar. Na área farmacêutica, a microencapsulação visa obter sistemas que permitam a liberação do fármaco em um sítio específico, ou aprimorar suas propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas, bem como proteger o fármaco de condições ambientais ou biológicas adversas. Esta tecnologia tem propiciado a reinserção de entidades com potenciais farmacológico e alimentício, consideradas inviáveis no passado (FANG & BHANDARI, 2010).

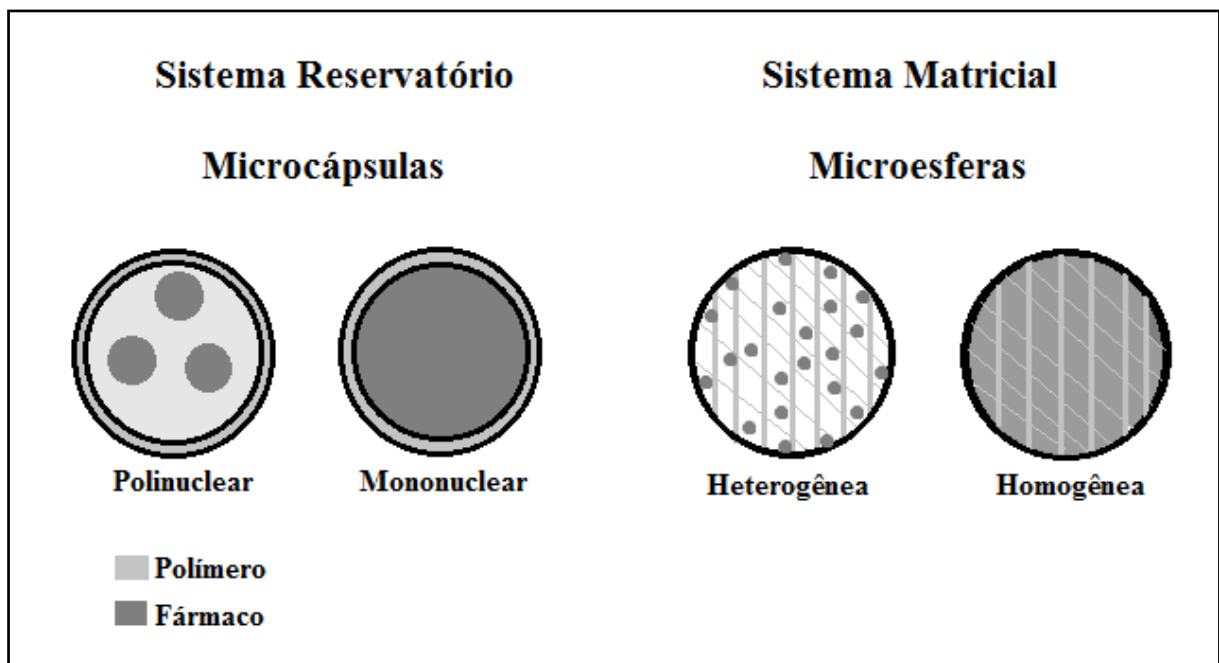
Pesquisas visando o desenvolvimento de sistemas matriciais e de materiais empregados com esta finalidade são crescentes, destacando-se as micropartículas poliméricas, devido à variedade de materiais e técnicas de obtenção de relativa simplicidade. Os sistemas multiparticulados são capazes de atuar na fase farmacocinética, alterando tanto a liberação quanto a absorção dos fármacos por constituírem sistemas de liberação modificada de fármacos, propiciando a manutenção de concentrações plasmáticas efetivas no intuito de minimizar os efeitos colaterais sistêmicos. As micropartículas apresentam tamanhos de 1 a 1.000  $\mu\text{m}$ ; este tamanho reduzido propicia que as microesferas apresentem comportamento semelhante a líquidos no trato gastrointestinal (TGI), não sofrendo influência significativa da presença de alimentos (PATIL & SAWANT, 2011).

Segundo Nedovic et al. (2011), as aplicações da microencapsulação de substâncias vão além da otimização farmacocinética e farmacodinâmica. A estratégia também é utilizada para melhorar propriedades do material encapsulado, tais como características organolépticas desagradáveis, proteção e estabilização do fármaco sob condições adversas do TGI (pH e enzimas), diminuição da toxicidade de substância bioativa e, como citado acima, proteção frente a agentes degradantes como luz, umidade, calor e oxigênio. Como consequência, o fármaco e os

componentes da formulação mantêm a estabilidade por maior tempo e apresentam maior vida de prateleira.

Estes sistemas são divididos em microcápsulas e microesferas. As microcápsulas atuam como reservatórios, com os fármacos localizados em seu núcleo. Elas podem ser mononucleares ou polinucleares e são revestidas por uma membrana responsável por controlar a taxa de liberação. Já as microesferas consistem em sistemas matriciais ou monolíticos, onde o fármaco se encontra disperso sobre a matriz, que geralmente é de origem polimérica. A Figura 4 apresenta estes diferentes sistemas microparticulados (SILVA et al., 2003).

**Figura 4 - Estrutura dos diferentes tipos de micropartículas**



Representação esquemática de sistemas microparticulados e suas variações: Sistemas reservatórios à esquerda constituídos de microcápsulas polinuclear e mononuclear e sistemas matriciais à direita representado por microesferas heterogêneas e homogêneas.

**Fonte: Adaptado de Silva et al., 2003.**

As microcápsulas podem ser desenvolvidas com finalidade de modular a liberação do fármaco. Para tanto, o material de revestimento da cápsula deve ser selecionado de forma a liberar o material microencapsulado em alvos específicos do organismo. No caso de um agente terapêutico administrado por via oral, o material de revestimento deve ser capaz de resistir às condições ácidas no estômago. Assim, confere-se ao fármaco a propriedade de atravessar o aparelho digestivo de maneira

intacta (CHAMPAGNE, 2011). Já as microesferas são partículas constituídas por polímeros que têm como objetivo controlar a liberação do fármaco. No mercado estão disponíveis vários dispositivos para liberação controlada de diferentes fármacos, sumariados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Relação de fármacos encapsulados em microesferas disponíveis no mercado**

<b>Fármaco</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Classe</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tecnologia</b>
Risperidona	Risperdal® Consta®	Antipsicótico	Janssen Alkermes	Dupla emulsão (óleo em água)
Naltrexona	Vivitrol® Alkermes	Antagonista opióide	Vivitrol Alkermes	Dupla emulsão (óleo em água)
Leuprolida	Lupron Depot® Enantone Depot® Trenantone® EnantoneGyn	Antineoplásico hormonal sintético	TAP Takeda Takeda Takeda	Dupla emulsão (óleo em água)
Octreotida	Sandostatin® LAR	Antineoplásico hormonal sintético	Novartis	Separação de fases AlkermesProLease
Somatropina	Nutropin® Depot <sup>a</sup>	Hormônio do crescimento biossintético	Genentech/Alkermes	Criogenia e spray drying
Triptorelina	Trelstar™ depot Decapeptyl® SR	Antineoplásico hormonal	Pfizer Ferring	Separação de fases
Buserelina	Suprecur® MP	Anticoncepcional	Sanofi-Aventis	Não relatado
Lanreotida	Somatuline® LA	Tratamento de acromegalia	Ipsen-Beafour	Separação de fases
Bromocriptina	Parlodel Lar™	Agonista de dopamina	Novartis	Spray drying
Minociclina	Arestin®	Antibiótico	Orapharma	Não relatado

**Fonte: Adaptado de Midha, Nagpal & Arora (2015).**

Além disso, estão depositadas diversas patentes que utilizam esta tecnologia para a encapsulação de fármacos como cetoprofeno (CN 201110142359), paclitaxel

(CN 201110313846), 5-flouracila (CN 201210025085), ganciclovir (US08455091), cimetidina (EP19980924438), risperidona (EP20070808011), ciclosporina (CA 2217462), irinotecano (CA 2579533), levonogestre (DE1999609777) e doxorubicina (DE1994632867) (MIDHA, NAGPAL & ARORA, 2015).

### **3.3.2.2 Microesferas mucoadesivas**

As microesferas mucoadesivas são sistemas multiparticulados de liberação controlada, que utilizam sistemas matriciais como carreadores de fármacos. Apresentam vantagens em relação às formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos como versatilidade, eficácia e baixo custo de produção. A mucoadesão é conferida às microesferas quando estas são envolvidas com polímeros mucoadesivos capazes de interagir com a mucina da mucosa gástrica. Neste caso, além de conduzir e controlar a liberação do fármaco, as microesferas interagem com a mucina se aderindo a esta, liberando o fármaco de acordo com a degradação do sistema matricial, aumentando o tempo de contato e a permanência entre a forma farmacêutica e o local de ação (KOCKISCH et al., 2005; SMART, 2005).

Várias vias podem ser empregadas para a administração de fármacos em formulações mucoadesivas tais como ocular, nasal, bucal, gengival, oral, vaginal e retal. Os sistemas mucoadesivos podem ser veiculados em diferentes formas farmacêuticas, incluindo comprimidos, pastilhas, géis, micro e nanopartículas, incorporados a excipientes poliméricos. Alguns desses polímeros podem não só aumentar a permanência do fármaco no local de absorção, bem como aumentar a permeabilidade deste através do epitélio celular (KHUTORYANSKIY, 2011).

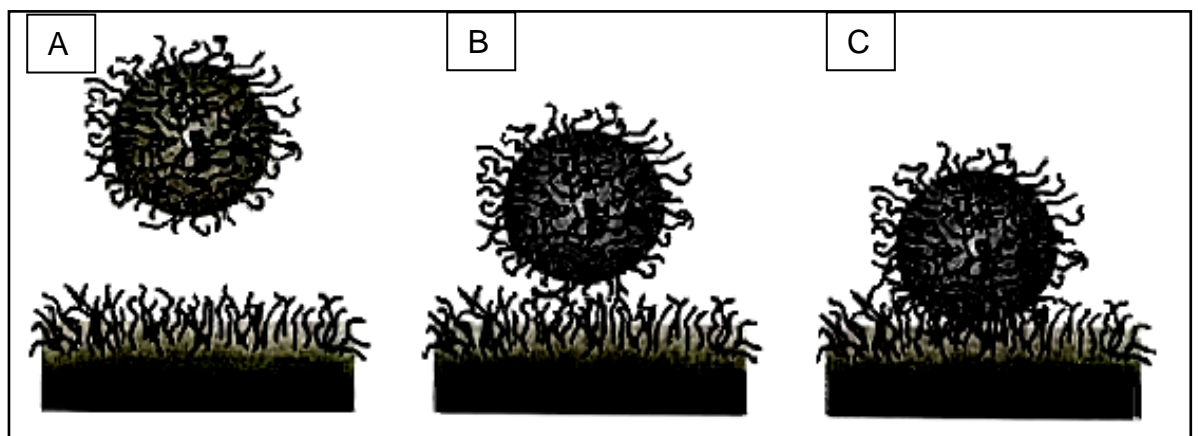
Durante a liberação do fármaco da matriz, estão envolvidos processos físicos e químicos, que ocorrem por mecanismos isolados ou por uma combinação de mecanismos. Os principais processos envolvidos são a difusão do meio para o interior da matriz, a dissolução do fármaco, o intumescimento e/ou a erosão do polímero e a difusão do fármaco. Estes sistemas podem ser caracterizados pela bioadesão e interação entre matriz polimérica das microesferas e a superfície gástrica (LYRA et al., 2007).

Nos sistemas biológicos existem quatro tipos de sistemas de bioadesão: adesão de uma célula saudável a outra célula saudável, adesão de uma célula saudável a uma substância estranha, adesão de uma célula saudável a uma célula patológica, e adesão de um material adesivo a um substrato biológico, sendo este

último designado de bioadesão relacionada a fármacos. Já a mucoadesão é definida como a interação que ocorre entre a superfície da mucina e um polímero sintético ou natural, sendo uma estratégia para prolongar o contato da forma farmacêutica com o local de adesão (MIDHA, NAGPAL & ARORA, 2015).

A mucoadesão é uma estratégia para contornar problemas relacionados à administração de fármacos, permitindo sua ligação em uma região específica, com consequente melhoria da biodisponibilidade. Adicionalmente, a mucoadesão possibilita o estabelecimento de uma forte interação entre o polímero e o muco que reveste o tecido, melhorando o tempo de contato entre o material bioadesivo e o substrato biológico, além de inibir a metabolização enzimática do fármaco numa área específica, como ilustrado na figura 5 (BRUSCHI & FREITAS, 2005).

**Figura 5 - Mecanismo de mucoadesão.**



**A:** Intumescimento da microesfera e aproximação da mucina gástrica; **B:** Contato entre a rede polimérica da microesfera e a rede de glicoproteínas que constituem a mucina gástrica; **C:** Interpenetração e interação entre a rede polimérica da microesfera e a rede de glicoproteínas que constituem a mucina gástrica.

**Fonte: adaptado de Figueras, Carvalho & Veuga 2007.**

Um dos polímeros frequentemente empregado em sistemas de mucoadesão é a quitosana, na formação de microesferas. Um extrato de *Ilex paraguariensis* incorporado em microesferas de quitosana teve sua atividade antioxidante avaliada *in vitro*, em ensaio de redução de íons  $Fe^{3+}$ . A atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos na formulação foram equivalentes àqueles do extrato não incorporado; por outro lado, a formulação apresentou maior estabilidade que o extrato ao final de 2 meses (HARRIS et al. 2011).

KIM et al. (2010) avaliaram a encapsulação do ácido rosmarínico em microesferas de policaprolactona, visando solucionar problemas de hidrossolubilidade para seu emprego em cosméticos. A formulação desenvolvida apresentou estabilidade satisfatória, e emulsões contendo as microesferas apresentaram maior estabilidade térmica do que as emulsões contendo somente o ácido rosmarínico, indicando que este pode ser um sistema para veiculação da substância.

### **3.3.2.3 Métodos e materiais empregados na preparação de microesferas**

Existem diversos métodos propostos para a obtenção de micropartículas, tais como emulsificação seguida de evaporação de solvente, coacervação, geleificação ionotrópica, polimerização, spray-drying e atomização em fluidos supercríticos, dentre outros (JOSÉ, et al., 2000; SILVA et al., 2013). Observa-se que o surgimento de novos materiais encapsulantes é proporcional à elaboração de novos métodos e aplicações de microencapsulação, pois esta tecnologia permite utilizar fármacos que não apresentam características farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas adequadas, possibilitando a reinserção destes fármacos no mercado (SUAVE et al., 2006).

Dentre os métodos citados destaca-se a emulsificação seguida da evaporação de solvente, que consiste na formação de emulsões aquosas e/ou oleosas, seguida da retirada do solvente de maior volatilidade ao final do processo. O polímero e o fármaco são solubilizados na fase apropriada de acordo com sua natureza e emulsificados em uma fase contínua (aquosa ou oleosa). Este método apresenta vantagens como controle da cinética de liberação e do tamanho de partícula (produzindo amostras monodispersas), o uso de polímeros e fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, bem como capacidade de transposição tecnológica para escala industrial, uma vez que essa técnica já é utilizada na indústria farmacêutica. (RAMAZANI et al., 2016; LIU et al., 2005).

Diversos polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos estão disponíveis para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (COIMBRA, 2010). A escolha do material encapsulante é estabelecida de acordo com as propriedades físicas e químicas do fármaco, do tipo de aplicação pretendida e do método a ser empregado na obtenção das microesferas. Estas variáveis influenciam diretamente a estabilidade do material a ser encapsulado (SUAVE et al.,

2006). Os polímeros utilizados apresentam propriedades biodegradáveis, mucoadesivas ou ambas.

Os polímeros biodegradáveis têm sido priorizados nos últimos anos em relação aos polímeros não degradáveis, uma vez que são metabolizados no organismo produzindo dióxido de carbono e água. Desta forma não produzem resíduos poluentes e/ou tóxicos ao organismo. O desafio desta aplicação está na resistência mecânica limitada destes polímeros e no alto custo associado ao baixo volume de produção (PANYAM, LABHASETWAR, 2003).

Atualmente, existe uma diversidade de polímeros sintéticos (derivados de celulose, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e polidroxietil metilacrilato) e naturais (alginato de sódio, goma de guar, gelatina, quitosano, goma gelana e amido) conhecidos e utilizados por suas propriedades mucoadesivas, capazes de aderir ao tecido da mucosa e promover interações químicas fracas e de baixa energia (WOERTZ et al., 2013). Cabe ressaltar que ligações fortes, do tipo covalente, podem prejudicar o caráter de adesão transitório que estes produtos necessariamente devem possuir (LYRA et al., 2007).

A grande variedade de estruturas permite que esses polímeros sejam modificados quimicamente e/ou fisicamente, conferindo novas propriedades que podem ser moduladas de acordo com as necessidades específicas (CARBINATTO et al., 2012; PREZOTTI, CURY & EVANGELISTA, 2014).

Villanova, Oréfica & Cunha (2010) relatam que derivados sintéticos da celulose são polímeros muito frequentes em formulações que modulam a liberação de fármacos, enquanto os derivados do ácido acrílico (carbômeros) têm finalidade de promover viscosidade, incrementando sistemas mucoadesivos. A seguir serão abordados aspectos técnicos e aplicações da hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e do carbopol, utilizados na obtenção das formulações desenvolvidas no presente estudo.

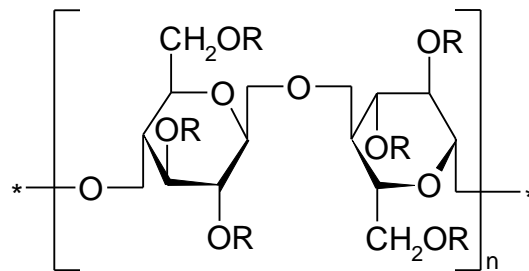
#### **3.3.2.4 Hidroxipropilmetilcelulose**

A utilização de derivados da celulose encontra-se em constante expansão devido sua versatilidade, hidrossolubilidade e biodegradação. Dentro desta classe de polímeros destaca-se a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), amplamente utilizada desde a década de 60, com diferentes finalidades, considerada o polímero hidrossolúvel de maior relevância no carreamento de fármacos em sistemas de

liberação controlada (SIEPMANN & PEPPAS, 2001; AKHTAR et al., 2012; REKHI et al., 1999).

HPMC é um pó branco, inodoro e sem sabor, com relativa elasticidade, resistência mecânica e fotoestabilidade. Este polímero recebe outros nomes como hipromellose, tylopur, methocel. Quimicamente é o éter hidroxipropil-metilico da celulose, com massa molecular na faixa de  $1 \times 10^4$  a  $1,5 \times 10^6$  unidades de massa atômica (U.M.A.). A variabilidade da massa molecular ocorre em função das diferentes substituições na estrutura do monômero, uma vez que cada monômero possui 6 sítios radiculares diferentes, onde cada um destes apresenta 3 opções diferentes de substituições (figura 6). A polimerização das diferentes unidades monoméricas é que irá gerar os polímeros de diferentes massas moleculares (USP 38 ed. 2015; ROWE, SHESKEY & WELLER, 2009).

**FIGURA 6 - Formula estrutural da HPMC.**



Onde R é H, CH<sub>3</sub> ou CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>

HPMC tem capacidade de incorporar altas taxas de substâncias ativas, apresenta compatibilidade com excipientes e corantes, é atóxico e não iônico. Estas características fazem com que este polímero seja aprovado para uso como adjuvante em produtos alimentícios pela *Food and Drug Administration* (FDA) (21 CFR 172.875) e pela *European Union* (CE 1995) (BURDOCK 2007).

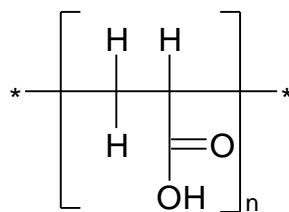
Funcionalmente, a HPMC atua como agente doador de viscosidade, suspensor, estabilizante, formador de filme, agente de revestimento e como agente controlador da taxa de liberação de fármacos. As formas farmacêuticas que apresentam HPMC em sua composição são administradas por via oral, oftálmica e tópica. Por via oral destacam-se as aplicações em filmes de revestimentos e matrizes para extensão da liberação de fármacos (DAHL et al., 1990; LIU et al., 2005).



### 3.3.2.5 Carbopol

Carbopol ou carbômero são termos utilizados para designar uma classe de polímeros carboxivinílicos sintéticos de alta massa molecular ( $7 \times 10^5$  a  $4 \times 10^9$  U.M.A.), produzidos por reações de *crosslink* do ácido acrílico com alil-éter de sacarose ou pentaeritritol, contendo de 56% a 68% de grupos ácido carboxílico livres (-COOH). Devido à variabilidade estrutural destes carbômeros, o monômero desta classe de polímeros é representado pela estrutura do ácido acrílico (Figura 7). A extensa faixa de massa molecular se dá em função das diversificadas unidades capazes de realizarem reações de reticulação com o monômero (SINGLA CHAWLA, SINGH, 2000; USP 39 ed. 2015).

**FIGURA 7 - Monômero de ácido acrílico.**



O carbopol é um pó branco, macio, higroscópico, de odor característico. Este polímero é classificado como bioadesivo, agente emulsificante, suspensor, de revestimento, doador de viscosidade e agente controlador de liberação de fármacos. Na área farmacêutica, é utilizado com maior frequência em formulações sólidas e semissólidas para via de administração tópica, oftálmica e retal, devido suas ações geleificantes (ROWE, SHESKEY & WELLER, 2009).

Alguns carbômeros apresentam características específicas referentes ao teor residual de agentes tóxicos: o carbopol 971 P e 974 P não apresentam resíduos de acetato de etila; já o 934 P não apresenta benzeno residual sendo, portanto, o mais indicado para preparações de uso oral (WADE & WELLER, 1994; USP 39 ed. 2015).

O carbopol é utilizado extensivamente em produtos para administração não parenteral, principalmente em formulações líquidas e semissólidas. Estes polímeros são considerados não tóxicos e não irritantes, e não foram relatadas reações de hipersensibilidade em humanos. Clinicamente, são usados como laxativo formador de volume, em doses orais de 1 a 3 gramas, uma vez que ao entrar em contato com a água, eles intumescem e aumentam volume na luz do intestino, o que estimula o peristaltismo intestinal, com conseqüente efeito laxativo indireto (LEWIS, 2004).

### **3.3.2.6 Emprego de HPMC e carbopol em formulações com sistema de liberação controlada**

A utilização dos polímeros HPMC e carbopol em formulações mucoadesivas encontra-se extensivamente descrita na literatura científica. Há relatos do emprego dos polímeros separadamente e em conjunto nas formulações, onde as taxas de encapsulação e rendimento variam de acordo com o método e as técnicas empregadas, bem como com a natureza do fármaco e dos adjuvantes das formulações.

Hirata & Bruschi (2010) avaliaram o emprego de formulações poliméricas com extrato de própolis a 4% para uso oral. O estudo visou avaliar a aplicabilidade da formulação desenvolvida para incorporar extratos de própolis para administração por via oral. Os autores concluíram que as formulações apresentaram estabilidade, características de pH, reologia e temperatura de congelamento satisfatórias para aplicação destas substâncias para interação com a mucosa oral.

Garud & Garud (2012) prepararam microesferas mucoadesivas de metformina empregando carbopol 934 P, HPMC, etilcelulose e quitosana separadamente pela técnica de evaporação de solvente não aquoso (acetona). Os autores avaliaram diferentes proporções entre os polímeros e o fármaco, e diferentes velocidades de agitação mecânica. Eles observaram uma relação direta entre o aumento da velocidade de agitação e a diminuição do tamanho das partículas, que resultou em melhora no perfil de liberação do fármaco pela formulação. A formulação com proporção de fármaco/polímero (1:2) apresentou o melhor perfil de liberação do fármaco, enquanto as microesferas a base de carbopol e derivados de celulose apresentaram liberação mais rápida quando comparadas às microesferas a base de quitosana, indicando maior interação entre o polímero e o fármaco.

O emprego conjunto de HPMC e carbopol para obtenção de microesferas mucoadesivas é frequente, uma vez que estes são polímeros biocompatíveis, atóxicos, não são absorvidos pelo organismo, são economicamente viáveis e exibem forte adesão não covalente. Esta combinação de polímeros é descrita para encapsulação de antibióticos como amoxicilina (NALLASAMY & RAMANATHAN, 2012) e ciprofloxacino (HARDENIA et al., 2011), bem como para outras classes de fármacos como famotidina (MARINA et al.; 2012), flurbiprofeno (RANJHA, KHAN & NASEEM, 2010) e repaglinida (PARMAR, MISHRA & PATHAK, 2015).

Pelo exposto, formulações de microesferas ou micropartículas mucoadesivas contendo HPMC e carbopol apresentam vantagens por exibirem propriedades proeminentes de cada polímero separadamente, configurando uma alternativa promissora para a encapsulação de fármacos a fim de modular a liberação destes em compartimentos biológicos.

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Equipamentos**

- Analisador de tamanho de partículas LS Particle Size Analyse, modelo LS 13 320 Beckman Coulter.
- Agitador magnético com aquecimento IKA, C-MAG modelo HS 7.
- Agitador mecânico IKA Eurostar digital.
- Aparelho de calorimetria exploratória diferencial TA Instruments, modelo DSC 2910 Modulated.
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Banho-maria Fanem, modelo 120/4.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Capela de fluxo laminar, Veco modelo Bioprotector 09.
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Centrífuga citológica Fanem, modelo 248.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz.
- Espectrômetro de infravermelho FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum one.
- Estufa de CO<sub>2</sub>, INCO 2 memmert.
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Lâmpada de ultravioleta (UV) para cromatografia Spectroline, modelo 977 C (254 e 365 nm).
- Leitora de microplacas com monocromador Tecan, modelo Infinite, com software iControl para processamento de dados.

- Microscópio ótico Olympus.
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM – 840A.
- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters 2695, constituído por injetor automático, detector de arranjos de diodos PDA 2996, bomba quaternária L-6200<sup>a</sup> com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa Empower, Waters.
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC<sup>TM</sup>, Waters, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 e detector de espectrometria de massas ACQUITY TQ (Water), equipado com fonte de ionização por electrospray Z-spray (ESI) e software Mass Lynx<sup>TM</sup> (versão 4.1, Waters).
- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Termobalança Shimadzu modelo TGA50H.
- Vortex Mixer, Vixar.
- Zetasizer 3000Hs, Malven Instruments.

#### **4.2 Solventes, reagentes e material de consumo**

- Adjuvante completo e incompleto de Freund, Sigma-Aldrich.
- Ácido cítrico, Sigma-Aldrich.
- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico, Merck.
- Ácido *trans*-aconítico, Sigma-Aldrich e Extrasynthése.
- Albumina bovina sérica (BSA), Sigma-Aldrich.
- Albumina bovina sérica metilada (mBSA), Sigma-Aldrich.
- Antibióticos: penicilina G e gentamicina, Sigma-Aldrich.
- Carbopol 934, BF Goodrich.
- Carboximetilcelulose, Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Cloreto de sódio, Sigma-Aldrich.
- Coluna para CLAE LiChrospher100, RP-18, com partículas de 5 µm, 125 × 4,6 mm d.i., Merck.

- Coluna para UPLC, Waters BEHC18 (50 x 2,1 mm d.i., partículas de 1,7 µm).
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- Dimetilacetamida P.A., Sigma-Aldrich.
- EDTA dissódico, Sigma-Aldrich.
- Etanol comercial, Minálcool e Emfal.
- Etanol P.A., Sigma-Aldrich.
- Fosfato de sódio monobásico, Sigma-Aldrich.
- Fosfato dissódico de dexametasona, Sigma-Aldrich.
- Hidroxipropilmetilcelulose, P.A., Sigma-Aldrich.
- Kit ELISA IL-1β humano, DY201 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA TNF-α humano, DY210 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA TNF-α camundongo, DY410 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA CXCL1 camundongo, DY453 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA INF-γ camundongo, DY485 Duo Set, R&D systems.
- Líquido de Turk, Reny-lab.
- Lipopolissacarídeo, Sigma-Aldrich.
- Meio de cultura RPMI, Sigma-Aldrich.
- *n*-butanol P.A., Sigma-Aldrich.
- *n*-octanol P.A., Sigma-Aldrich.
- *o*-Fenilenodiamina (OPD), Sigma-Aldrich.
- Paraformaldeído, Sigma-Aldrich.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, TPP.
- Placa de 96 poços para cultivo celular, Corning.
- Placa de 96 poços para imunoensaio, Nunc.
- Polietilenoglicol 300 (PEG<sub>300</sub>) P.A., Sigma-Aldrich.
- Solventes grau CLAE: metanol e acetonitrila, Tedia Brasil.
- Ração para roedores, Nuvilab.
- Sílica gel 60 G, Merck.
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Sistema de filtração esterilizante, capacidade para 500 e 1000 mL, membrana de 0,22 µm, Corning.

- Solventes grau padrão analítico (P.A.): *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol, álcool etílico, Neon; éter de petróleo, Quimex.
- Soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich.
- Tampão fosfato salina (PBS), Sigma-Aldrich.
- Tween 20, Sigma-Aldrich
- Tween 80, Sigma-Aldrich.

#### 4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Balões volumétricos de 1, 10, 25 e 100 mL, Satelit, Normax e Blaubrand.
- Balões reacionais mono e tritubulados de 25, 50 e 100 mL.
- Béqueres, provetas e balões de fundo redondo de diferentes tamanhos.
- Borrifador de vidro.
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas.
- Condensador.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 ×10 cm e 10 ×10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Filtros de 0,22 e 0,4 µm, Corning.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Kit de coloração de lâminas panótico.
- Laminas para análise diferencial de leucócitos, análises histopatológicas e câmara de Neubauer.
- Microtubo plástico de 2 mL, 1,5 mL e 0,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Papel de filtro e papel manteiga.
- Pipeta Pasteur de vidro.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Termômetro químico de vidro com escala interna.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e UPLC-MS.

#### 4.4 Desenvolvimento e validação do método de CLAE–DAD para o doseamento do ácido *trans*-aconítico (ATA)

#### **4.4.1 Sistema cromatográfico**

As análises foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters), equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) 2996, bomba L-6200A, integrador C-R4A e programa Empower para processamento de dados.

#### **4.4.2 Desenvolvimento do método analítico**

##### **4.4.2.1 Preparo das amostras**

Pesou-se, exatamente, 1 mg de ATA em microtubos plásticos tipo *safe-lock* com capacidade para 1,5 mL; adicionou-se 1 mL de metanol grau CLAE e procedeu-se a solubilização por 10 minutos em banho de ultrassom. Na sequência, transferiu-se o conteúdo do microtubo para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume do balão com metanol grau CLAE obtendo assim a solução estoque. Retirou-se 1 mL desta solução, transferindo-a para vial, seguido da injeção de 10 µL desta no cromatógrafo.

Pesaram-se cerca de 5 mg das formulações e respectivos brancos em microtubos plásticos tipo *safe-lock* com capacidade para 1,5 mL; adicionou-se 1 mL de metanol grau CLAE e procedeu-se a solubilização por 30 minutos em banho de ultrassom seguido de centrifugação a 8.400 g por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para vial seguido da injeção de 10 µL deste no cromatógrafo.

##### **4.4.2.2 Desenvolvimento da condição cromatográfica**

A partir da condição empregada no perfil exploratório, foram desenvolvidos os métodos A e B, introduzindo modificações no tempo de eluição e temperatura da coluna visando melhorar resolução do pico do analito e diminuir o tempo de análise das formulações de microesferas contendo ATA (ME-ATA) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Condições cromatográficas do perfil exploratório e dos métodos A e B avaliadas durante o desenvolvimento de método para quantificação de ácido *trans*-aconítico nas diferentes formulações de microesferas contendo ATA.**

Tempo (min.)	Eluente %		Temp. (°C)	Tempo (min.)	Eluente %		Temp. °C
	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O			CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O	
Método A				Método B			
0	5	95	30	0	5	95	30
35	95	5		8	95	5	
40	95	5		10	95	5	
45	5	95		13	5	95	
Perfil exploratório							
0	5	95	40				
60	95	5					
65	95	5					
70	5	95					

**Nota:** Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. Empregou-se fluxo de 1,0 mL/min. Utilizou-se uma coluna para CLAE LiChrospher100, RP-18, com partículas de 5 µm, 125 × 4,6 mm d.i., Merck, gradiente linear e detecção no UV em 210 nm para todas as análises.

#### 4.4.2.3 Condição cromatográfica estabelecida

A condição cromatográfica estabelecida para a quantificação de ATA nos diferentes lotes de ME-ATA consistiu de:

- Coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 × 4 mm d.i., 5 µm).
- Pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i., 5 µm).
- Temperatura da coluna: 30 °C.
- Fase móvel: gradiente linear de água Milli-Q e acetonitrila grau CLAE, ambas contendo 0,1 % de ácido fosfórico, conforme descrito na Tabela 2 método B.
- Fluxo: 1,0 mL/min.
- Comprimento de onda de detecção: 210 nm
- Volume de injeção: 10 µL.

#### 4.4.3 Validação do método analítico

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 4.4.2) foi realizada segundo as normas da RE nº 899 da ANVISA, RDC 166/2017 e os guias do ICH (2005) e AOAC (2002). O lote da formulação F3c foi empregado nos ensaios de validação.



O programa Empower (Waters®) foi usado para aquisição dos dados e as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Microsoft Excel e GraphPad Prism® versão 5 (GraphPad Software, Inc.).

#### 4.4.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise da homogeneidade espectral do pico referente ao ATA em 210 nm ( $n = 6$ ) e pela comparação dos cromatogramas obtidos para o ATA livre, para a formulação branca FB3 e para os componentes individuais da matriz. Cada componente foi dissolvido em metanol na concentração de 50 µg/mL e o volume de injeção foi de 10 µL. A descrição dos componentes das formulações citadas (F3c e FB3) encontra-se na Tabela 4 do item 4.5.1.

#### 4.4.5 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de curvas analíticas com seis concentrações distintas de ATA, em dois dias consecutivos de análise. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas da solução de referência na faixa de 2,5 a 15 µL (Tabela 3).

Os dados obtidos para cada substância foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ( $p < 0,05$ ) com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.

**Tabela 3 - Volumes de injeção da solução de ATA (10 µg/mL) e respectivas massas, utilizadas na construção da curva analítica.**

Volume de injeção (µL)	Massa Injetada (ng)	Faixa de trabalho (%)
2,5	25	25
5	50	50
7,5	75	75
10	100	100
12,5	125	125
15	150	150

#### 4.4.6 Precisão intradia e interdias

Para a determinação da precisão intradia foram preparadas soluções metanólicas de ATA, em triplicata, a 10 µg/mL. Diferentes volumes dessa solução (2,5; 7,5 e 12,5 µL) foram injetados no sistema de CLAE-DAD, correspondendo às massas de 25 ng (concentração baixa), 75 ng (concentração média) e 125 ng (concentração alta). Para a determinação da precisão interdias foi reproduzido, em triplicata, o mesmo experimento descrito acima em dois dias diferentes.

#### 4.4.7 Exatidão

A exatidão foi determinada pela fortificação da formulação branca ME-B com o ATA. Para tanto, foram pesados 100 mg de formulação e 1 mg de ATA; ambos foram transferidos para gral de vidro e homogeneizados. Em seguida, pesou-se 1 mg da mistura resultante em microtubos plásticos do tipo *safe-lock* com capacidade para 1,5 mL, adicionou-se 1 mL de metanol grau CLAE, e procedeu-se à solubilização por 30 minutos em banho de ultrassom, seguido de centrifugação a 8400 g por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para vial seguido de injeção de 2,5; 7,5 e 12,5 µL da solução no cromatógrafo, correspondente às massas de 25 ng (concentração baixa), 75 ng (concentração média) e 125 ng (concentração alta).

#### 4.4.8 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ATA foram estimados a partir da curva analítica média obtida no ensaio de linearidade (item 5.1.3) por meio das equações estabelecidas pelo guia do ICH (2005), descritas a seguir:

$$LD = \frac{3DPa}{b} \qquad LQ = \frac{10DPa}{b}$$

Onde: LD = limite de detecção;

LQ = Limite de quantificação;

DPa = desvio padrão do intercepto médio das três curvas de linearidade;

b = coeficiente angular da curva média.

### 4.5 Preparo das microesferas mucoadesivas

As formulações foram preparadas pelo método de emulsificação seguida da evaporação do solvente, como descrito por Liu et al. (2005) com modificações, dividido em duas etapas, descritas a seguir.

#### 4.5.1 Primeira etapa: preparo da dispersão dos polímeros (HPMC e carbopol 934) e do ATA

Inicialmente foi preparada a solução para dispersão dos polímeros e do ATA. Para tanto, foram pesados 0,214 g de Tween 80 (m/v); em seguida adicionaram-se 2,4 mL de polietilenoglicol 300 (PEG 300), 1,6 mL de dimetilacetamida (DMA) e 16 mL de água ultrapura. À esta solução foram adicionados o ATA e os polímeros nas proporções citadas na Tabela 4. A mistura permaneceu em agitação magnética durante 24 horas.

**Tabela 4 - Proporção de ATA e dos polímeros (HPMC e carbopol 934) empregados no preparo dos diferentes lotes de microesferas contendo ATA (F1 a F5) e respectivos brancos (FB1 a FB5).**

Formulação	HPMC (mg)	Carbopol 934 (mg)	ATA (mg)
F1	600	-	50
FB1	600	-	-
F2	500	100	50
FB2	500	100	-
F3a	300	300	50
F3b	300	300	150
F3c	300	300	300
FB3	300	300	-
F4	100	500	50
FB4	100	500	-
F5	-	600	50
FB5	-	600	-

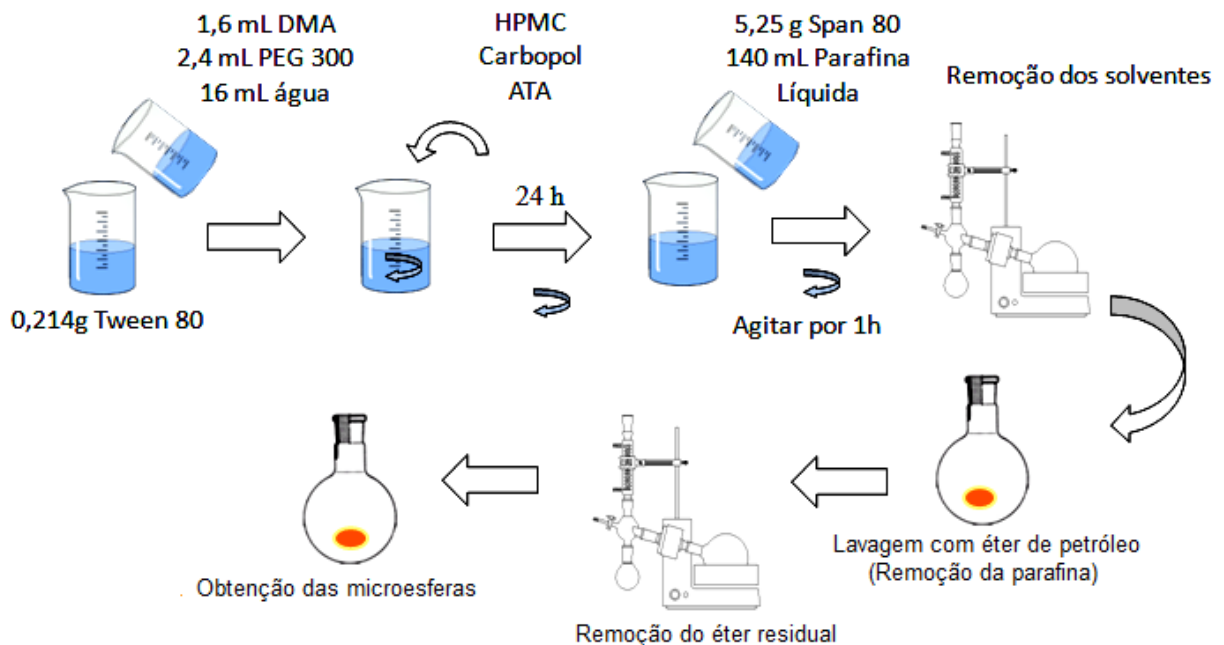
#### 4.5.2 Segunda etapa: emulsificação seguida de evaporação de solvente

140 mL de vaselina líquida foram adicionados a 5,25 g de span 80. A fase aquosa foi vertida na fase oleosa (item 4.5.1), sob agitação a 600 rpm em agitador Eurostar por 60 minutos. Em seguida, a emulsão formada foi mantida em evaporador rotatório sob pressão reduzida (70 mbar) à 80°C por 1 hora para eliminação dos solventes da fase aquosa. A mistura foi então lavada com éter de

petróleo e centrifugada a 10.000 g por 5 minutos para retirada da parafina e dos tensoativos residuais. O sólido resultante foi mantido em evaporador rotatório sob pressão reduzida (500 mbar) por 1 hora à temperatura ambiente, para retirada do éter residual, gerando um resíduo sólido amorfo, de coloração amarelada. O esquema de operações para obtenção das microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA) está sumariado na Figura 8.

As microesferas brancas foram obtidas com a mesma metodologia, porém sem a adição de ATA. Todos os lotes foram feitos em triplicata.

**Figura 8: Esquema geral da metodologia empregada na obtenção das formulações.**



## 4.6 Caracterização química, físico-química, térmica e morfológica das microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA)

### 4.6.1 Avaliação da taxa de encapsulação do ATA nas ME-ATA

Como o fármaco se distribui de forma não uniforme sobre a malha polimérica da microesfera, foi determinado o teor encapsulado no interior e na superfície destas como descrito a seguir.

#### 4.6.1.1 Teor de ATA adsorvido na superfície das ME-ATA

Foram pesados, cerca de 40 mg de microesferas obtidas em cada lote (item 4.5) e adicionados 8 mL de água ultrapura sob agitação magnética, durante 15 minutos. Em seguida, as dispersões foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL e o volume de cada balão foi aferido obtendo-se as dispersões finais. Na sequência, as dispersões foram filtradas através de membranas de 0,45 µm a fim de recolher o ATA não encapsulado no material filtrado, ou seja, o ATA adsorvido na superfície externa das microesferas. Uma alíquota (0,25 mL) de cada uma das dispersões filtradas foi transferida para microtubo plástico tipo *safe-lock* com 1,5 mL de capacidade e o volume completado com 0,75 mL de metanol, seguido de centrifugação a 8400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para vial e uma alíquota de 10 µL dessa solução foi injetada no sistema de CLAE-DAD, empregando as condições analíticas do método B (item 4.4.2.2).

#### **4.6.1.2 Teor total de ATA nas ME-ATA**

O teor total (encapsulado e adsorvido) de ATA nas microesferas foi determinado após ruptura das microesferas em metanol. Foram pesados cerca de 5 mg de microesferas de cada lote e adicionados 3 mL de metanol grau CLAE. A dispersão foi sonicada por 60 minutos e em seguida transferida para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com metanol e uma alíquota (1 mL) foi transferida para microtubo plástico tipo *safe-lock* com 1,5 mL de capacidade e centrifugado a 8400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para vial e uma alíquota de 10 µL dessa solução foi injetada no sistema de CLAE-DAD, empregando as condições analíticas do método B (item 4.4.2.2).

#### **4.6.2 Caracterização morfológica**

A morfologia de todos os lotes de microesferas obtidos foi avaliada quanto à granulometria por difração de luz. O lote e o respectivo branco que apresentou melhor desempenho quanto ao perfil de encapsulação foi caracterizado por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.

##### **4.6.2.1 Avaliação granulométrica e determinação do índice de polidispersão**

A avaliação da distribuição granulométrica das partículas foi realizada pelo método de difração de luz no equipamento LS Particle Size Analyse modelo LS 13 320 (Beckman Coulter).

Para as análises, 500 mg de microesferas de cada lote foram pesadas e dispersas em 25 mL de água destilada sob agitação magnética constante, até homogeneidade. Em seguida, esta dispersão foi adicionada aos poucos na célula contendo água destilada até atingir o grau de turvação requerido para análise (8-12%). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A partir dos resultados obtidos na análise granulométrica foi determinado o índice de polidispersão utilizando a seguinte equação:

$$P = \left( \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \right)$$

Onde: d90, d10 e d50 correspondem aos percentuais de microesferas com diâmetros volumétricos acima de 90%, 10% e 50% respectivamente.

#### **4.6.2.2 Microscopia óptica de luz**

Para confirmar a formação de microesferas utilizando o método anteriormente descrito, 0,04 g de microesferas foi dispersa em 3 mL de água. Uma gota da dispersão foi então colocada em uma lâmina para microscopia e coberta por uma lamínula. Em seguida adicionou-se uma gota de óleo de imersão e examinou-se ao microscópio óptico de luz (aumento da imagem de 1.000 vezes).

#### **4.6.2.3 Microscopia eletrônica de varredura**

A avaliação da morfologia e tamanho das microesferas contendo ATA foi realizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando equipamento Jeol modelo JSM – 840A (Centro de Microscopia, UFMG). Cerca de 10 mg das microesferas foi dispersa em água, seguida da deposição de uma gota em placa metalizada. Após estar seca, a amostra foi fixada com ouro por aproximadamente 5 minutos e, em seguida, analisada por microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.6.3 Caracterização térmica e físico-química das ME-ATA**

Os lotes que apresentaram maior reprodutibilidade nos teores de ATA e maior homogeneidade na distribuição granulométrica foram analisados por espectrometria

na região do infravermelho, por calorimetria exploratória diferencial e também tiveram seu potencial zeta determinado.

#### **4.6.3.1 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

As análises por FTIR foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum one, pela técnica de reflectância total. As amostras de ATA, carbopol, HPMC, mistura física branca (mistura com proporções dos polímeros HPMC e carbopol 934, conforme utilizado na elaboração da formulação), mistura física com ATA (mistura em proporções iguais entre polímeros e ATA), formulação ME-ATA e formulação ME foram analisadas por adição direta da amostra no equipamento. Os espectros foram registrados no intervalo de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . As análises foram realizadas no laboratório de Química Farmacêutica do departamento de Produtos Farmacêuticos, em colaboração com o professor Dr. Ricardo José Alves, pela técnica Raquel Geralda Isidório.

#### **4.6.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Foram pesados, exatamente 5 mg de cada um dos polímeros, bem como de ATA, da mistura física branca, da mistura física com ATA, das formulações ME-ATA e ME, os quais foram adicionados em cadinhos. Estes cadinhos foram fechados de forma semi-hermética com auxílio de compressor e disponibilizados para análise.

As análises calorimétricas foram realizadas no equipamento da TA Instruments, modelo DSC 2910 Modulated, no intervalo de temperatura de 25 a 220 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Índio foi utilizado para calibração da temperatura e da entalpia e nitrogênio foi utilizado como gás de purga. Os dados obtidos foram analisados pelo software de isotermas do próprio equipamento. As temperaturas de transição foram definidas pela posição dos picos observados nas curvas de DSC.

#### **4.6.3.3 Análise termogravimétrica (TG)**

As curvas termogravimétricas foram obtidas em uma termobalança Shimadzu modelo TGA50H, com fluxo de nitrogênio de 10 mL/min e programação de aquecimento de 25 a 600 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min. As análises

foram realizadas no Laboratório de Análise Termogravimétrica do Departamento de Química da UFMG, em colaboração com a Profa. Dra. Maria Irene Yoshida.

#### 4.6.3.4 Potencial zeta

As determinações de potencial zeta foram realizadas em equipamento Zetasizer 3000Hs da Malven Instruments.

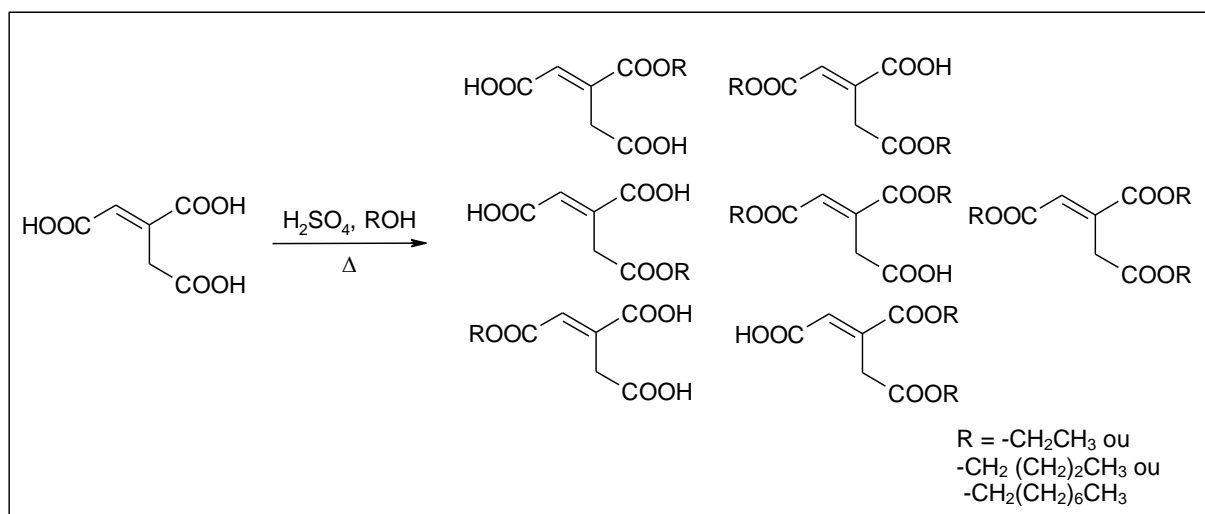
Para as análises, pesou-se cerca de 10 mg de microesferas brancas e das formulações F3a, b e c (tabela 4 do item 4.5.1), seguido da adição de 10 mL de água ultrapura e dispersão em agitador magnético até a formação de uma suspensão homogênea de micropartículas. Em seguida, foi retirada uma alíquota (1 mL) da suspensão e adicionados 9 mL de água ultrapura sob agitação magnética, obtendo-se dispersões de microesferas diluídas 1000 vezes em água ultrapura. As análises foram realizadas em triplicata.

### 4.7 Síntese e caracterização de ésteres do ácido *trans*-aconítico

#### 4.7.1 Esterificação do ácido *trans*-aconítico (ATA)

As reações foram realizadas de acordo com o método descrito por Piang-Siong (2012), visando obter produtos de cadeia alquílica curta e média mono, di e triesterificados do ATA com etanol (EtOH), *n*-butanol (BuOH) e *n*-octanol (OcOH), como representado na Figura 9.

**Figura 9 - Esquema de reação para obtenção dos ésteres do ATA.**



**Nota:** Condições reacionais: 9h, 100°C, 2,7%  $H_2SO_4$ .



Inicialmente foram reproduzidas as condições reacionais relatadas por Piang-Siong (2012); na sequência, a temperatura e tempo de reação foram otimizados. Procedeu-se à análise da cinética da reação, descrita nos itens 4.7.2 e 4.7.4.

#### **4.7.2 Avaliação da cinética das reações de esterificação**

Para a avaliação da cinética das reações, foram pesados 100 mg de ATA, os quais foram transferidos para balão tritubulado contendo 10 mL do álcool empregado na esterificação (EtOH, BuOH ou OcOH). A mistura reacional foi aquecida à 75 °C seguida da adição de 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Retiraram-se alíquotas de 50 µL em intervalos regulares de 15 minutos e no ponto zero da reação. O volume alíquotado foi completado com 950 µL de acetonitrila grau CLAE, sonificado por 10 minutos, centrifugado em 8400 *g* e o sobrenadante foi transferido para vial. Uma alíquota dessa solução (10 µL) foi injetada no sistema de CLAE-DAD, procedendo-se a eluição com gradiente exploratório (item 4.4.2.2) para os derivados octílicos, e com as condições do método A (item 4.4.2.2) para os derivados etílicos e butílicos.

Cada amostra coletada para o estudo de cinética foi analisada por CLAE-DAD e cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel. A quantificação dos derivados sintetizados foi realizada pela área dos picos referentes a cada classe de éster (mono, di e triéster) no cromatograma. Para as análises por CCD estabeleceu-se uma fase móvel para visualizar as três classes de ésteres sintetizados com resolução adequada, constituída por *n*-hexano/acetato de etila (7:3), seguido da adição gradativa de 1 mL de ácido fórmico sob agitação manual. Usou-se como revelador luz UV em 254 nm e, como fase estacionária, sílica gel 60G F<sub>254</sub> (indicador de fluorescência).

#### **4.7.3 Determinação *in silico* do LogP**

O coeficiente de partição, expresso como Log P, foi calculado pelo software ChemBioDraw Ultra<sup>®</sup> (Cambridge, Reino Unido).

#### **4.7.4 Avaliação do efeito da temperatura sobre as reações de esterificação**

A fim de avaliar o efeito da temperatura na formação dos ésteres, partiu-se das condições reacionais descritas no item 4.7.1. Utilizou-se inicialmente a temperatura de 75°C, sendo então avaliada uma faixa ampla de temperaturas, de 65°C a 95°C, em intervalos de 10°C. Para cada temperatura avaliada, após 120

minutos retirou-se uma alíquota de 50  $\mu$ L e completou-se o volume para 1000  $\mu$ L com acetonitrila grau CLAE. As amostras foram sonicadas, centrifugadas a 8400 g e transferidas para vial. Injetaram-se de 10  $\mu$ L do sobrenadante no sistema de CLAE-DAD, procedendo-se a eluição com gradiente exploratório para os derivados octílicos, e o método A para os derivados etílicos e butílicos (item 4.4.2.2).

#### 4.7.5 Purificação dos compostos sintetizados

A purificação dos compostos obtidos foi realizada visando isolar os produtos puros (triésteres) ou mistura de produtos da mesma classe (mono e diésteres) com reprodutibilidade e menor gasto de solvente. Piang-Siong et al. (2012) descrevem a elaboração da reação por meio da adição de 20 mL de acetato de etila, seguido de partição com água e eliminação dos solventes presentes na fase orgânica, a reprodução deste tipo de elaboração no presente trabalho gerou a formação de emulsão, impossibilitando a separação das fases e purificação dos produtos, portanto as condições de elaboração foram otimizadas como descrito a seguir.

Para o empacotamento da coluna pesaram-se 25 g de sílica gel 60 (200-400 mesh) que foi vertida em coluna de vidro com diâmetro de 2,5 cm. Ao final de cada reação, o meio reacional foi vertido em béquer contendo cerca de 1,5 g de sílica gel 60 (200-400 mesh), seguida de homogeneização e secagem com auxílio de soprador térmico serigráfico até obtenção de um pó seco e homogêneo. Na sequência, este pó foi depositado no topo da coluna e sobre ele foi colocada uma fina camada de algodão. O gradiente utilizado para obtenção das diferentes classes de ésteres está descrito na tabela 5.

**Tabela 5 - Série eluotrópica utilizada para separação das diferentes classes de ésteres sintetizados em coluna aberta de sílica gel.**

Proporção dos solventes (%)			Volume (mL)
Hexano	EtOAc	MeOH	
100	0	0	20
70	30	0	100
30	70	0	100
0	70	30	100
0	0	100	100

Em cada coluna realizada foram coletadas 42 frações com volume de 10 mL em frascos tarados. A massa dos produtos e o rendimento da reação foram determinados e estão descritos no item 5.4.3.

#### 4.7.6 Caracterização dos ésteres sintetizados

Todos os ésteres foram caracterizados por CCD, CLAE-DAD, espectrometria no ultravioleta (UV), espectroscopia no infravermelho (IV) em aparelho de reflectância total atenuada com transformada de Fourier (ATR-FTIR) em espectropetro Perkin Elmer (USA) modelo Spectrum One, os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos com interface para espectrômetro de massas (UPLC-DAD-MS/MS). No caso dos triésteres, isolados com pureza adequada, eles também foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , empregando técnicas mono e bidimensionais. As caracterizações por CCD e CLAE-DAD foram realizadas conforme descrito no item 4.4.2.2.

##### 4.7.6.1 Caracterização dos ésteres por UPLC-ESI-MS

A caracterização química das misturas de ésteres foi realizada empregando-se sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (Waters) acoplado a detector DAD e em interface com espectrômetro de massas triplo quadrupolo (TQD) com ionização por electrospray (Waters Micromass). Para a análise das misturas empregou-se uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC BEH C-18, Waters; 50 × 2,1 mm d.i. 1,7  $\mu\text{m}$ ) em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 × 5 mm d.i. 1,7  $\mu\text{m}$ ), procedendo-se a eluição com gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1 % v/v de ácido fórmico: 5 a 95% B em 12 min; 95 a 5% B em 1 min, seguindo-se de 2 min de eluição isocrática. Empregou-se fluxo de 0,3 mL/min e temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção foi de 3  $\mu\text{L}$ , sendo as amostras analisadas na concentração de 1 mg/mL em ACN, após filtração em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Para a fonte de ionização por *electrospray* (ESI), nos modos negativo e positivo, as seguintes condições foram empregadas: temperatura da fonte de 120 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C. O intervalo de massas avaliado foi da relação carga / massa ( $m/z$ ) de 80 a 600.

As condições de voltagem do cone e voltagem do capilar foram otimizadas, variando-se a voltagem do cone de 20 a 70 V, avaliando-se em intervalos de 10V, e a voltagem de capilar entre 3, 3,5 e 4 kV. A otimização das condições de análise foi realizada com os ésteres octílicos.

#### 4.7.6.2 Análises por RMN

A caracterização estrutural da mistura de diésteres e dos triésteres etílicos, butílicos e octílicos foi realizada a partir de análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) e subespectros DEPT-135 (100 MHz), bem como dos experimentos bidimensionais COSY, HSQC, HMQC e HMBC. As análises foram realizadas no Departamento de Química, ITEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25 °C, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Utilizou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) para solubilização das amostras. As análises foram realizadas pelo Prof. Dr. Jose Dias de Souza Filho e pela técnica Raquel Geralda Isidório.

#### Mistura isomérica de monoésteres etílicos do ácido *trans*-aconítico

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_6$  e rendimento de 12,2 %.

IV:  $\nu_{\text{max}}$  3489, 2987, 1721, 1651, 1394, 1206, 1108, 1065, 1011, 918, 789  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 203.20  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 225.28  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 201.15  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 156,45, 138,88, 111,04; modo negativo: 197,38, 155,68, 110,85, 87,19.

#### Mistura isomérica de diésteres etílicos do ácido *trans*-aconítico

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_6$  e rendimento de 43,0 %.

IV:  $\nu_{\text{max}}$  2985, 1714, 1651, 1467, 1447, 1393, 1370, 1322, 1258, 1176, 1094, 1025, 967, 909, 862, 785  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 231,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 253,54  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 229,10  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 185,01, 139,11, 110,98; modo negativo: 183,14, 139,01, 111,10.

#### Triéster etílico do ácido *trans*-aconítico (1-propeno-1,2,3- ácido tricarbóxico, éster trietílico)

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$  e rendimento de 32,2,0 %.

IV  $v_{\max}$  2983, 1716, 1654, 1466, 1447, 1368, 1321 1272, 1160, 1093, 1028, 972, 908, 861, 783  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,17 (3H, t,  $J$  7,12,  $\text{CH}_3$ ), 1,23 (3H, t,  $J$  7,08,  $\text{CH}_3$ ), 1,24 (3H, t,  $J$  7,16,  $\text{CH}_3$ ), 3,87 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4,06 (2H, q,  $J$  7,12,  $\text{CH}_2$ ), 4,15 (2H, q,  $J$  7,16,  $\text{CH}_2$ ), 4,19 (2H, q,  $J$  7,08,  $\text{CH}_2$ ), 6,86 (1H, s, CH) ppm.

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  14,15 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 14,23 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 14,9 (1C,  $\text{CH}_3$ ), 33,94 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 61,07 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 61,11 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 61,98 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 129,22 (1C, CH), 140,14 (1C), 165,45 (1C), 166,12 (1C), 169,99 (1C) ppm.

LC-MS ( $m/z$ ): 259,21  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 281,20  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 257,15  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 213,28, 185,19, 167,10, 157,03, 138,94, 110,91; modo negativo: 211,36, 110,91.

#### **Mistura isomérica de monoésteres *n*-butílicos do ácido *trans*-aconítico**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_6$  e rendimento de 8,9%.

IV:  $v_{\max}$  3480, 2961, 2875, 1698, 1651, 1463, 1393, 1323, 1261, 1175, 1097, 1060, 1019, 952, 911, 833, 790  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 231,10  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 253,19  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 229,15  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 157,03, 139,01, 110,98; modo negativo: 182,56; 110,91.

#### **Mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do ácido *trans*-aconítico**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_6$  e rendimento de 8,1%.

IV:  $v_{\max}$  2961, 2936, 2875, 1717, 1651, 1464, 1388, 1231, 1260, 1170, 1093, 1060, 1020, 959, 909, 788, 738  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 287,18  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 309,30  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 285,15  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 156,97, 139,01, 111,04; modo negativo: 211,10, 166,91, 139,01.

#### **Triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico (1-propeno-1,2,3- ácido tricarbóxico, éster tributílico)**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_6$  e rendimento de 20,7%.

IV:  $v_{\max}$  2960, 2935, 2875, 1718, 1652, 1465, 1412, 1385, 1320, 1274, 1164, 1092, 1061, 1021, 964, 908, 841, 786, 738  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,91 (9H, m,  $3\text{CH}_3$ ), 1,36 (6H, m,  $3\text{CH}_2$ ), 1,60 (6H, m,  $3\text{CH}_2$ ), 3,92 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4,14 (2H, t,  $J$  6,6,  $\text{CH}_2$ ), 4,18 (2H, t,  $J$  6,6  $\text{CH}_2$ ), 6,89 (1H, CH) ppm.

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  13,58 (3C,  $\text{CH}_3$ ), 18,99 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 19,05 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 30,47 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 30,54 (2C,  $\text{CH}_2$ ), 33,10 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 64,81 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 64,85 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 65,67 (1C,  $\text{CH}_2$ ), 129,00 (1C, CH), 165,39 (1C), 166,02 (1C), 169,82 (1C) ppm,  
LC-MS ( $m/z$ ): 343,45  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 365,30  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 381,24  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , 341,25  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 156,07, 138,94; modo negativo: 287,03, 211,04, 139,13.

### **Mistura isomérica de monoésteres *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_6$  e rendimento de 37,7%.

IV:  $\nu_{\text{max}}$  3213, 2954, 2922, 2854, 1698, 1655, 1464, 1427, 1386, 1321, 1272, 1180, 1095, 1051, 960, 903, 830, 800, 715  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 287,24  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 309,24  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 285,19  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 156,77, 139,13, 110,72; modo negativo: 110,91.

### **Mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_6$  e rendimento de 11,1%.

IV:  $\nu_{\text{max}}$  2955, 2925, 2856, 1721, 1652, 1466, 1388, 1321, 1270, 1168, 1094, 1009, 909, 837, 789, 722  $\text{cm}^{-1}$ .

LC-MS ( $m/z$ ): 399,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 421,36  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 397,31  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 156,97, 128,94, 113,09; modo negativo: 267,03, 223,10, 195,07, 179,03.

### **Triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico (1-propeno- 1,2,3- ácido tricarbóxico, éster trioctílico)**

Líquido; amarelo claro; F.M.;  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_6$  e rendimento de 22,9%.

IV:  $\nu_{\text{max}}$  2955, 2925, 2956, 1740, 1720, 1652, 1466, 1379, 1320, 1272, 1164, 1094, 1012, 909, 788, 723  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,81 (9H, m,  $3\text{CH}_3$ ), 1,21 (30H, m  $15\text{CH}_2$ ), 1,53 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1,59 (4H, m,  $2\text{CH}_2$ ), 3,99 (2H, t,  $J$  7,6,  $\text{CH}_2$ ), 4,08 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4,12 (4H, m,  $2\text{CH}_2$ ), 6,85 (H, s, CH) ppm.

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  14,12 (3C, 3CH<sub>3</sub>), 22,72 (3C, CH<sub>2</sub>), 25,95 (2C, CH<sub>2</sub>), 26,00 (3C, CH<sub>2</sub>), 28,61 (2C, CH<sub>2</sub>), 29,26 (1C, CH<sub>2</sub>), 29,29 (1C, CH<sub>2</sub>), 29,31 (2C, CH<sub>2</sub>), 31,88 (4C, CH<sub>2</sub>), 33,24 (1C, CH<sub>2</sub>), 65,22 (1C, CH<sub>2</sub>), 65,26 (1C, CH<sub>2</sub>), 66,10 (1C), 129,11 (1C, CH), 140,18 (1C), 165,49 (1C), 166,21 (1C), 169,91 (1C) ppm.

LC-MS ( $m/z$ ): 511,61 [M+H]<sup>+</sup>, 533,48 [M+Na]<sup>+</sup>, 550,41 [M+K]<sup>+</sup>, 509,50 [M-H]<sup>-</sup>.

MS/MS ( $m/z$ ), modo positivo: 268,57, 156,97, 139,07, 112,96; modo negativo: 276,72, 266,97.

#### **4.8 Avaliação da atividade antiartrítica *in vivo***

Os ensaios foram realizados sob supervisão do Prof. Mauro Martins Teixeira e do Prof. Flávio Almeida Amaral, no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os ensaios foram executados com auxílio da Dra. Nathália Vieira Batista, da doutoranda Daiane Boff e da mestranda Vívian Louise do Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, UFMG.

##### **4.8.1 Animais**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss e C57BL/6 com idade entre 6 e 9 semanas, obtidos, respectivamente, do Biotério da Faculdade de Farmácia e do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, ICB. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 83/2015).

##### **4.8.2 Modelo experimental de artrite aguda induzida por LPS**

Foi instituído jejum de 4 horas antes do tratamento e água foi fornecida *ad libitum*. O tratamento foi realizado por gavagem com administração do ATA nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg dissolvidos em salina. Após 1 h, os camundongos Swiss foram anestesiados por via inalatória com isofurano e tiveram a região da articulação fêmur-tibial depilada. Na sequência, foram injetados 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de LPS diluído em tampão fosfato salina (PBS) (100 ng/cavidade). Os animais do grupo controle receberam 10  $\mu\text{L}$  de PBS. Seis animais por grupo constituíram a unidade amostral (HENRIQUES et al., 2016). A eutanásia e as análises ocorreram 12 horas após administração do estímulo inflamatório. Fosfato dissódico de dexametasona foi

empregado como controle positivo na dose de 10 mg/kg, administrado por gavagem, dissolvido em salina.

Como os ésteres sintetizados apresentam polaridades variadas, foi avaliada a interferência do uso de solução salina de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% como veículo. Os ensaios foram realizados com o ATA.

O ATA, a formulação de microesferas mucoadesivas com maior teor de ATA, e os ésteres sintetizados foram avaliados inicialmente na concentração de 173  $\mu\text{mol/kg}$  (equivalente a 30 mg/kg de ATA). Foi avaliada a cinética da atividade do ATA administrado de forma isolada e do ATA encapsulado nas microesferas no intervalo de 1 a 48 horas de pré-tratamento. Os ésteres mais ativos foram avaliados quanto ao comportamento dose/resposta no intervalo de 0,0173 a 173  $\mu\text{mol/kg}$ .

#### **4.8.3 Modelo experimental de artrite aguda induzida por antígeno (AIA)**

Os camundongos C57BL/6 foram imunizados pela injeção intradérmica (i.d.) de uma emulsão contendo 100  $\mu\text{L}$  de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich), na qual foram dissolvidos 500  $\mu\text{g}$  de albumina bovina metilada (mBSA; Sigma-Aldrich). Os experimentos foram realizados 14 dias após a imunização com CFA/mBSA.

Inicialmente o ATA foi avaliado nas doses de 30, 90 e 270 mg/kg, dissolvidos em salina e administrados por gavagem, 1 hora antes do desafio. Os animais foram tratados e, após 1 h, foram desafiados através da injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial) de mBSA (10  $\mu\text{g}$ /cavidade). Visando otimizar o modelo, foi instituído jejum de 4 horas, com fornecimento de água *ad libitum* antes do tratamento. Para tanto, ATA foi administrado por gavagem nas doses de 3, 30, 90 e 270 mg/kg, a fim de selecionar a dose ideal de trabalho. Os animais foram eutanasiados 24 h após o desafio.

Seis animais por grupo constituíram a unidade amostral; os grupos controle positivo e negativo não foram tratados, o grupo negativo foi desafiado com solução de PBS, outro grupo controle foi tratado com dexametasona (10 mg/kg) (COELHO et al., 2008).

#### **4.8.4 Modelo experimental de artrite crônica induzida por antígeno (AIA)**

AIA crônica foi induzida conforme descrito por Wengner et al., 2007. Os camundongos C57BL/6 foram imunizados com injeção s.c. de uma emulsão



contendo 50 µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund, na qual foram dissolvidos 100 µg de albumina bovina metilada e suplementado com uma suspensão de *Micobacterium tuberculosis* inativado por aquecimento (4 mg/mL) da linhagem H37RA (Difco, Detroit, MI). Após sete dias, os animais foram adicionalmente imunizados com mBSA dissolvido em adjuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma-Aldrich). Foi injetado 200 ng de toxina de *Bordetella pertussis* (Calbiochem) por via intraperitoneal (i.p.) paralelamente a cada imunização. O primeiro desafio com o antígeno ocorreu 15 dias após a segunda imunização pela injeção de 100 µg de mBSA dissolvidos em 20 µL de PBS na cavidade fêmur-tibial de cada animal. Após 30 dias os animais foram novamente desafiados pela injeção de 100 µg de mBSA dissolvidos em 20 µL de PBS na cavidade fêmur-tibial.

Os animais foram tratados *per os* 1 hora antes do segundo desafio e uma vez ao dia com ATA (173 µM/Kg), mistura de diésteres octílicos (DiO; 17,3 e 1,73 µM/Kg). Os animais foram eutanasiados sete dias após o desafio. Dez animais por grupo constituíram a unidade amostral; os grupos controle positivo e negativo foram tratados com o veículo (Salina ou CMC 0,5%), o grupo controle negativo foi desafiado com solução de PBS, outro grupo controle foi tratado com dexametasona (10 mg/kg).

#### **4.8.5 Contagem total e diferencial de células**

Para avaliação da migração celular, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> 12 horas (modelo de inflamação induzida por LPS) ou 24 horas (modelo AIA) após administração do estímulo inflamatório e a cavidade articular (tíbio-femural) foi exposta. Alíquotas de 20 µL do lavado articular foram diluídas em 20 µL de líquido de Turk. A contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100×) e contador manual. As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação no aparelho Citospin (Shandon Lipshaw Inc.) onde foram colocados 50 µL de albumina bovina sérica (BSA) a 3% e 80 µL do lavado articular. Em seguida, as lâminas foram centrifugadas a 400 rpm por 5 minutos e secas à temperatura ambiente. As lâminas secas foram coradas segundo a técnica de May-Grumwald e Giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000×), usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os

tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de células polimorfonucleares e mononucleares  $\times 10^4$ / cavidade articular.

#### **4.8.6 Análise histopatológica**

A região da articulação fêmur-tibial foi removida cirurgicamente e dissecada mantendo-se o invólucro muscular. Os espécimes obtidos foram fixados em solução de formalina (10% paraformaldeído a 37%, 0,65%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) durante 24 horas. As amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA a 10% pH 7,2, à temperatura ambiente, por um período de três semanas. Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo obtendo-se cortes consecutivos de 5  $\mu\text{m}$ , os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina e então analisados em microscópio óptico. O score histológico foi avaliado segundo Queiroz-Junior et al. (2011). Foram avaliados os seguintes parâmetros: infiltrado leucocitário (score de 0-4 onde 0: ausência de infiltrado leucocitário; 1: inflamação leve (1-10%); 2: inflamação moderada (10-25%); 3: inflamação intensa (25-50%) e 4: inflamação severa (acima de 50%); Integridade do tecido sinovial score de 0-3 onde 0: sem alterações; 1: hiperplasia focal; 2: hiperplasia extensa (30-50%); e 3: hiperplasia generalizada (acima de 50%); e reabsorção óssea (score de 0-2 onde 0: sem alterações; 1: escassas lacunas de reabsorção e 2: perda óssea/cartilaginosa significativa). Estes parâmetros foram quantificados em um score total de 8.

#### **4.8.7 Determinação de citocinas e quimiocinas por ELISA**

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram quantificados por ensaio de ELISA (COELHO et al., 2008), 12 h (modelo de inflamação induzida por LPS), 24 h (modelo AIA agudo) e 7 dias (modelo de AIA crônico) após administração do estímulo inflamatório. Após o sacrifício dos animais, foi retirada a região periarticular do joelho do membro inferior estimulado. O tecido coletado foi pesado e em seguida homogeneizado em solução de extração de citocinas, constituída por PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, sendo o volume dessa solução ajustado de acordo com a massa do tecido (1 mL para cada 100 mg de tecido). Em seguida, as

amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8400 *g* e o sobrenadante utilizado para o ensaio de TNF- $\alpha$  e CXCL-1, sendo esse sobrenadante diluído na proporção de 1:3 em solução de PBS/BSA a 1%. Todos os procedimentos do ensaio de ELISA foram realizados segundo instruções do fabricante dos kits (R&D System), sendo a detecção realizada em leitor de microplacas (item 4.7.5.1) no comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.8.8 Protocolo de ELISA para ensaios *in vivo***

Os kits de ELISA utilizados para determinação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  humanos e TNF- $\alpha$  e CXCL-1 de camundongos foram obtidos da R&D Systems (DY210 DuoSet, DY201 DuoSet, DY410 DuoSet e DY453 DuoSet, respectivamente) e os procedimentos adotados foram realizados conforme as orientações do fabricante. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de uma solução de anticorpo de captura (anticorpo de cabra anti-TNF- $\alpha$  de camundongos ou anticorpo de rato anti-CXCL1 de camundongos), na concentração de 5,5  $\mu$ g/mL, 0,8  $\mu$ g/mL, 1,0  $\mu$ g/mL e 2,0  $\mu$ g/mL em PBS, respectivamente. Essa solução permaneceu em contato com a placa *overnight*, a 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas (3 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200  $\mu$ L/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2 horas. Em seguida, o padrão de TNF- $\alpha$  de camundongo (2000 a 31,25 pg/mL) ou de CXCL1 (1000 a 15,625 pg/mL) e as amostras (100  $\mu$ l do sobrenadante/ poço) foram adicionados à placa. Após 18 horas de incubação a 4 °C, as placas foram lavadas e 100  $\mu$ L de solução de anticorpo de detecção biotinilado (anticorpo de cabra anti-TNF- $\alpha$  e anti-CXCL1 de camundongo na concentração de 200 ng/mL) foram adicionados às mesmas e incubadas por 1 hora. Transcorrido este período e após lavagem, adicionou-se à placa 100  $\mu$ L de uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (R&D system). Após 20 a 30 min, a placa foi novamente lavada e 100  $\mu$ L de tampão citrato contendo *o*-fenilenodiamina (OPD, Sigma), na concentração de 0,4 mg/mL e 0,2  $\mu$ L/mL de peróxido de hidrogênio (Merck) foi adicionado. Após 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria, em um leitor de placas de ELISA, no comprimento de onda de 490 nm.

#### 4.8.9 Determinação da atividade de mieloperoxidase

O tecido residual (*pellet*) de cada réplica dos tratamentos foi coletado no intervalo de 12 horas (modelo de inflamação induzido por LPS) ou 24 horas (modelo AIA) após administração do estímulo inflamatório, sendo utilizado para a quantificação do infiltrado de neutrófilos. Para avaliar o acúmulo de neutrófilos foi utilizada a quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO) (SOUZA et al., 2000). Brevemente, o *pellet* foi ressuscitado em solução de EDTA a 5% preparada em salina e submetido à homogeneização e centrifugação (8400 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em 1,5 mL de solução aquosa de NaCl a 0,2 % gelada e 1,5 mL de solução aquosa gelada de NaCl a 1,6% contendo 5% de glicose para cada 100 mg de tecido. Foi realizada nova centrifugação (8400 g, 10 minutos). Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em tampão fosfato com brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB, Sigma) a 5%, seguido de homogeneização por 30 segundos. Para a lise celular, as amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação (8400 g, 15 minutos) e os sobrenadantes coletados para o ensaio de MPO. Para a determinação da atividade da MPO, as amostras foram adicionadas à placa (25 µl/poço), seguido da adição de tetrametilbenzidina (TMB; 25 µl/poço) 1,6 mM e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionada solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,002% (100 µl/poço) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M (50 µL/poço). A atividade da MPO das amostras foi determinada por colorimetria em leitor de ELISA, em 450 nm. Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) a partir da comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido com neutrófilos do pulmão de camundongos processados da mesma maneira (COELHO et al., 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação do método analítico para quantificação de ATA por CLAE-DAD

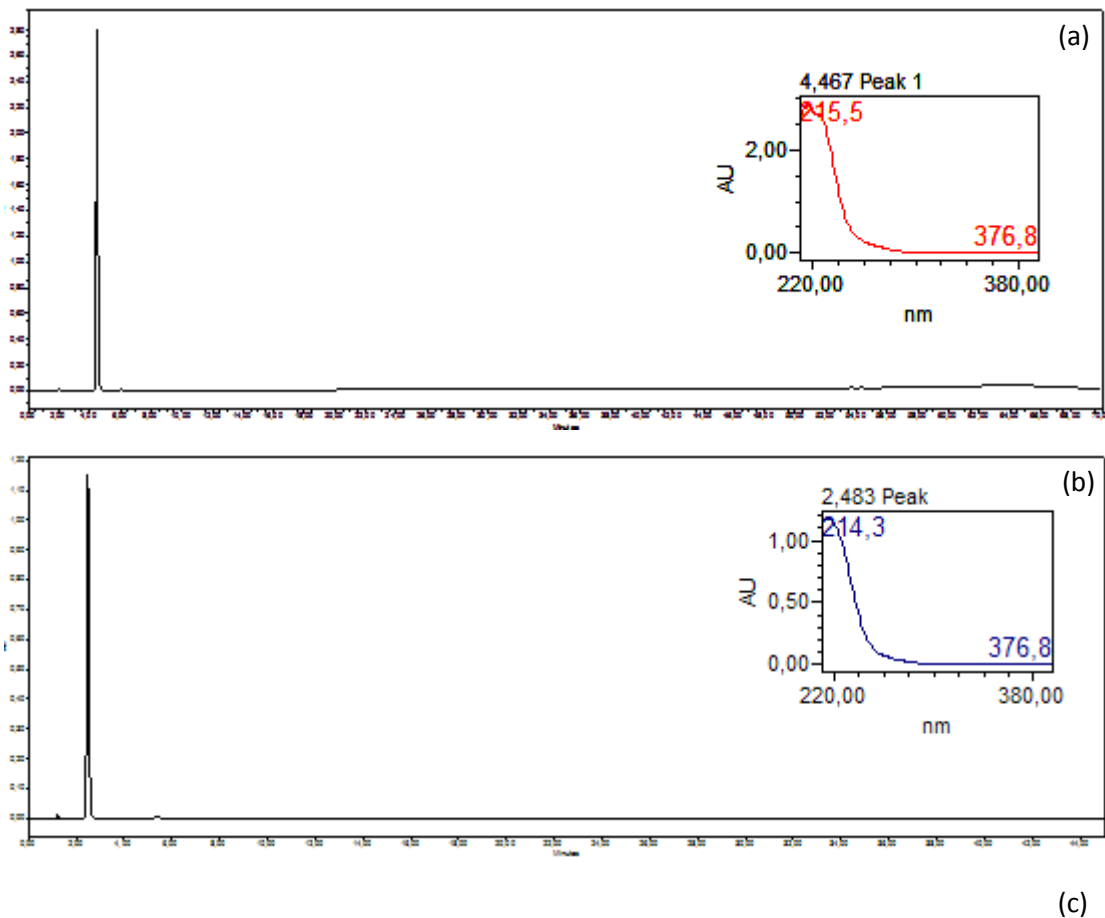
#### 5.1.1 Desenvolvimento do método analítico

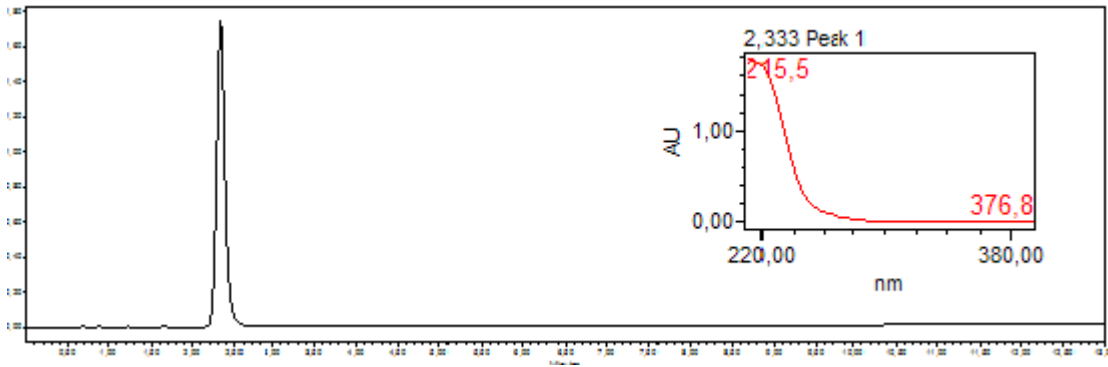
Inicialmente foi realizada uma corrida exploratória a fim de verificar o perfil de eluição do ácido *trans*-aconítico (ATA), seguindo-se alterações nas condições de

eluição para reduzir o tempo de análise (métodos B e C), conforme descrito no item 4.4.2.2. Os cromatogramas obtidos para cada método estão apresentados na figura 10 a, b e c, respectivamente.

O tempo de retenção do ATA no perfil exploratório foi de 4,47 minutos. Devido sua rápida eluição, o método foi modificado a fim de reduzir o tempo de corrida e consumo de solvente, resultando no Método A. Nessas condições, o ATA eluiu em 2,48 minutos, um TR pequeno comparado ao tempo total da corrida (45 minutos). A fim de reduzir este tempo, foi desenvolvido o método B, no qual o ATA apresentou tempo de retenção de 2,33 minutos e a corrida cromatográfica teve duração de 13 minutos.

**Figura 10 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para a análise de solução de referência de ATA utilizando o perfil exploratório (a), método A (b) e método B (c), e respectivos espectros no UV registrados no DAD. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.4.2.2.**





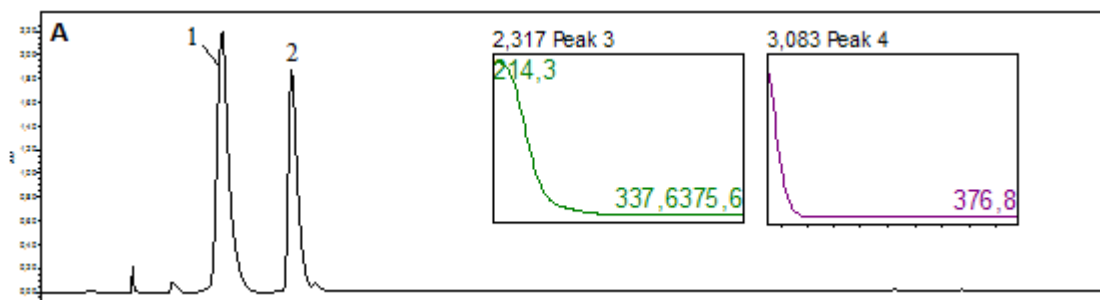
O método B foi definido como método de escolha para validação e posterior quantificação do ATA nas formulações, uma vez que este permite a análise do ATA em menor tempo levando a considerável redução de consumo de solvente e uso de equipamento comparado aos outros métodos.

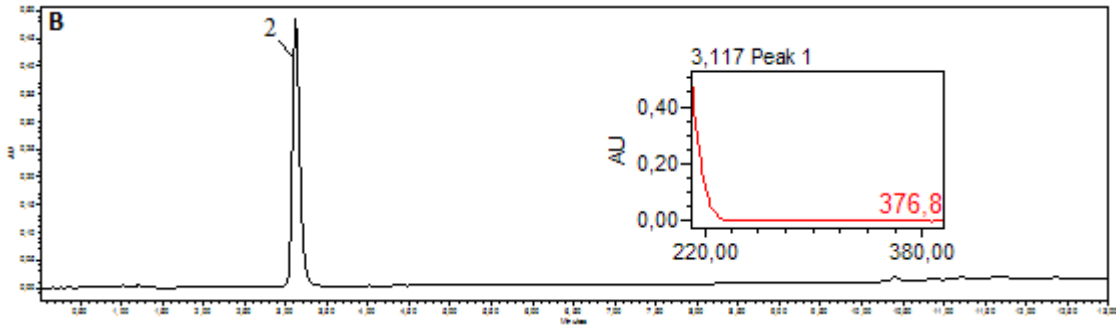
### 5.1.2 Seletividade

Este parâmetro avalia a capacidade do método em quantificar o analito de interesse na presença de interferentes da matriz (BRASIL, 2003). A avaliação deste parâmetro foi realizada pela comparação entre o cromatograma da formulação e respectivo branco, bem como pela avaliação da pureza espectral do pico do ATA.

As Figuras 11 A e B apresentam os cromatogramas e os espectros no ultravioleta obtidos para a formulação ME-ATA F3c e seu respectivo branco.

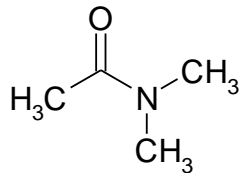
**Figura 11 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para a formulação F3c (A) e a formulação branca (B) utilizando o método B e respectivos espectros no UV registrados no DAD. Picos: 1, ATA; 2, DMA. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.4.2.2**





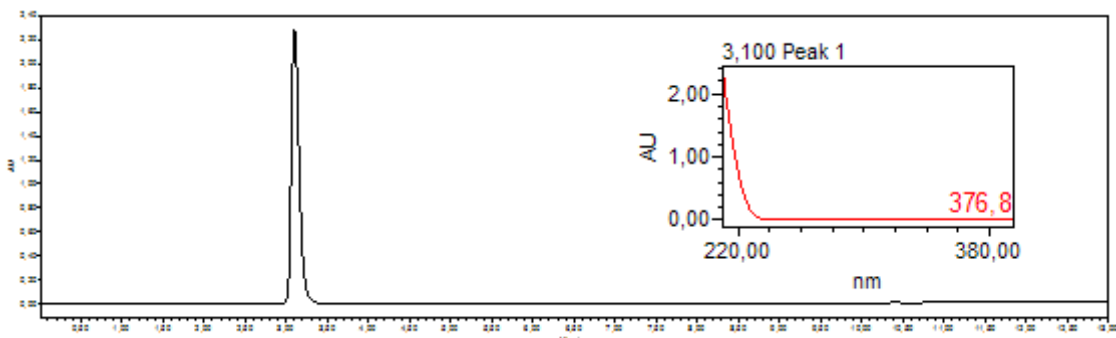
Observa-se, no cromatograma da formulação (Figura 11A), que o ATA apresenta TR de 2,3 minutos e máximo de absorção no UV em 214 nm, resultado semelhante ao obtido para a substância de referência (Figura 10A), além de outro pico com TR de 3,08 minutos. Este pico está presente no cromatograma do branco da formulação (Figura 11B), indicando que este se refere a algum componente da formulação.

A fim de Identificar qual componente da formulação apresenta tempo de retenção e absorção no UV correspondente ao interferente encontrado, todos os constituintes foram analisados por CLAE-DAD. Somente a dimetilacetamida (DMA) (18) produziu pico cromatográfico com absorção detectável e TR idêntico ao observado na formulação (Figura 12).



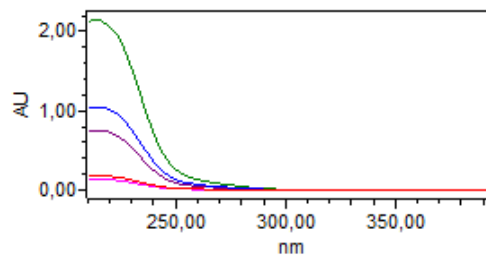
18

**Figura 12 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para dimetilacetamida (DMA) e respectivo espectro no UV registrado no DAD. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.4.2.2**



Pelo exposto, o método B possibilitou a separação do ATA dos demais constituintes da matriz, em especial a DMA. Para verificar a seletividade do método cromatográfico, foi avaliada a pureza espectral do pico correspondente ao ATA por sobreposição dos espectros no UV extraídos em 5 regiões distintas do pico (Figura 13). A sobreposição dos espectros indicou o mesmo  $\lambda_{\max}$  de absorção, sugerindo que não há co-eluição de outra substância com o ATA.

**Figura 13 - Sobreposição de espectros de UV extraídos em cinco regiões distintas do pico referente ao ATA na formulação ME-ATA.**



Em conjunto, os resultados de avaliação da seletividade e especificidade mostram que método é seletivo.

### 5.1.3 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foram construídas curvas analíticas para o ATA com 6 concentrações distintas, em dois dias diferentes (item 4.4.2.2). A tabela 6 apresenta os dados referentes à faixa de trabalho, massa injetada, área média e DPR% das áreas dos picos.

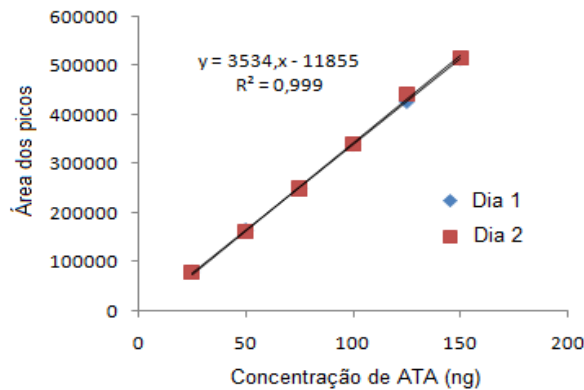
**Tabela 6 - Massas injetadas, áreas de pico e DPR das áreas, empregados para construção das curvas analíticas do ATA em dois dias de análise.**

Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	Massa injetada (ng)	Faixa de trabalho (%)	Dia	
			1 Área média $\pm$ DPR%	2 Área média $\pm$ DPR%
2,5	25	25	78667,34 $\pm$ 0,84	78914 $\pm$ 1,15
5	50	50	162670,0 $\pm$ 1,35	16423 $\pm$ 0,96
7,5	75	75	250265,7 $\pm$ 0,44	249398,3 $\pm$ 1,98
10	100	100	342108,3 $\pm$ 0,18	340238 $\pm$ 0,81
12,5	125	125	443763,3 $\pm$ 0,07	427409 $\pm$ 0,33
15	150	150	516820,3 $\pm$ 0,77	514869 $\pm$ 0,59



Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear e as curvas analíticas obtidas estão dispostas na figura 14 e na tabela 7.

**Figura 14 - Curvas analíticas obtidas para o ATA em dias distintos. A equação da figura se refere à curva média dos dois dias.**



**Nota:** Análises realizadas em triplicata

**Tabela 7 - Dados de regressão linear para o ATA em dois dias consecutivos.**

Parâmetros estatísticos	Dia 1	Dia 2	Curva média
Faixa linear (ng)	25 – 150	25 – 150	25 – 150
Coefficiente de determinação R <sup>2</sup>	0,999	0,998	0,999
DPR %	0,81	0,67	0,74
Inclinação	3497	3557	3534
Intercepto	10170	13540	11855

**Nota:** Análises realizadas em triplicata

As curvas analíticas construídas indicaram relação linear entre as massas injetadas de ATA (ng) e as áreas dos picos correspondentes, sendo obtido coeficiente de determinação ( $r^2$ ) maior do que 0,99. As regressões são significativas, para as curvas do dia 1 e do dia 2, com valores de  $p$  inferiores a 0,001. As curvas analíticas obtidas em dois dias consecutivos foram estatisticamente equivalentes. Portanto, dentro das faixas de concentrações analisadas, o método apresentou linearidade. As curvas foram reunidas para a construção de uma curva média.

#### 5.1.4 Precisão intradia e interdias

A precisão intradia e interdias foi determinada pela avaliação de três concentrações de ATA: baixa (2,5 µg/mL), média (7,5 µg/mL) e alta (12,5 µg/mL). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados das áreas de pico

correspondentes a cada concentração injetada, teores encontrados e DPR intradia e interdias estão representados na Tabela 8.

A RE 899 da ANVISA (Brasil, 2003) determina que, para os testes de precisão, os valores de DPR devem ser inferiores a 5%. Os resultados obtidos indicam que o método desenvolvido para doseamento do ATA apresenta precisão intradia e interdias satisfatórios.

**Tabela 8 - Avaliação da precisão intradia e interdias do ATA pelo método de CLAE-DAD.**

Conc. nominal de ATA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Conc. determinada de ATA ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%) Intradia	DPR (%) interdia	
2,5	82700	2,67	0,842381	2,37	
	Dia 1	82546			2,66
		83827			2,70
		78656	2,56		
	Dia 2	79910	2,59		1,515705
		81077	2,62		
7,5	267078	7,89	0,4475		
	Dia 1	268188			7,92
		269477			7,960
		247565	7,34		
	Dia 2	245024	7,26		0,9609
		249776	7,40		
12,5	442202	12,84	0,1842	3,38	
	Dia 1	441718			12,83
		440615			12,80
		415398	12,08		
	Dia 2	418610	12,18		0,8093
		411890	11,99		

### 5.1.5 Exatidão

A tabela 9 apresenta os resultados referentes à avaliação da exatidão do método de CLAE-DAD para doseamento de ATA, determinada a partir de estudos de recuperação.

**Tabela 9 - Avaliação da exatidão do método de CLAE-DAD para doseamento de ATA**

Amostra	Conc. de ATA teórica	Conc. de ATA real	Recuperação (%)	DPR%
1	2,5	2,53	101,53	
2	2,5	2,54	101,85	0,402669
3	2,5	2,55	102,27	
1	7,5	7,54	100,63	
2	7,5	7,59	101,31	0,430687
3	7,5	7,54	100,55	
1	12,5	12,50	100,11	
2	12,5	12,53	100,25	0,246461
3	12,5	12,47	99,77	
Média			100,91	0,87

**Nota:** Método empregado: Item 4.4.2.3 (Método B)

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) estabelece faixas de recuperação em função da concentração do analito na amostra. Para concentrações do analito de 10%, 1%, 0,1% e 0,01% na amostra, os valores aceitos de recuperação são 95-102%, 92-105%, 90-108% e 85-110%, respectivamente (AOAC, 2002). A faixa de concentração de ATA nas ME-ATA variou de 2,7 a 10,4 µg/mL. Portanto o método desenvolvido apresentou exatidão satisfatória.

### 5.1.6 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os valores de LD e LQ foram calculados a partir dos dados da curva analítica média, empregando as equações descritas no item 5.1.3, sendo obtidos valores de 0,2 µg/mL e 0,67 µg/mL, respectivamente.

Estes valores demonstram que o método apresenta capacidades de detecção e quantificação adequadas, uma vez que é possível quantificar o ATA em concentrações superiores a 0,67 µg/mL.

## 5.2 Avaliação do teor de ATA encapsulado e adsorvido nas formulações

As concentrações totais de ATA e o teor de ATA adsorvido nas microesferas mucoadesivas foram quantificados usando o método cromatográfico desenvolvido (item 4.4.2.2.) e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

**Tabela 10 - Concentrações de ATA (total, adsorvido na superfície e encapsulado) em diferentes formulações de microesferas mucoadesivas (ME-ATA).**

Formulação	Concentração de ATA (% m/m ± DPR) em diferentes lotes de ME-ATA			
	Massa teórica total de ATA (mg)	Massa real total de ATA (mg)	ATA total (%)	ATA adsorvido na superfície (%)
F1	50	6,57 ± 3,27	13,14 ± 6,54	2,52 ± 1,45
F2	50	5,87 ± 3,32	11,74 ± 6,64	2,55 ± 0,72
F3a	50	13,02 ± 1,18	26,04 ± 2,37	5,22 ± 1,15
F3b	150	88,97 ± 15,41	59,31 ± 10,27	0,96 ± 0,48
F3c	300	205,36 ± 9,66	68,45 ± 3,22	0,78 ± 0,40
F4	50	12,04 ± 1,37	24,08 ± 2,74	4,70 ± 0,92
F5	50	13,33 ± 7,66	26,65 ± 15,31	5,275 ± 2,63

**Nota:** As análises foram realizadas em triplicata. Massa teórica total refere-se a massa de ATA adicionada na produção da formulação e a massa total refere-se a massa de ATA incorporada na formulação.

As formulações F1 e F2 apresentaram teores de ATA reduzidos em relação às demais; as formulações F3a F4 e F5 apresentaram teores semelhantes de ATA entre si, e as formulações F3b e F3c maiores teores de ATA quando comparadas com as restantes. Estes dados sugerem que a proporção entre os dois polímeros utilizados na manufatura da formulação, carbopol 934 e HPMC (item 4.5.1), influenciam os teores de encapsulação do ATA. Pode-se supor, também, que o HPMC contribui para menor encapsulação deste composto, uma vez que a formulação F1 possui como único polímero na sua composição o HPMC e a F2 possui 5 vezes mais HPMC que carbopol. Não foram observadas diferenças significativas da formulação F3a (que contém proporções iguais dos dois polímeros supracitados em sua composição) em relação às formulações F4 e F5, que possuem somente carbopol ou grandes proporções dele em sua composição. Isto indica que o aumento da taxa de encapsulação não dependente somente do teor de carbopol

utilizado na elaboração da formulação. Este fator sugere uma maior afinidade do ATA pelo carbopol, quando comparado ao HPMC.

As formulações F3b e F3c apresentaram percentuais de encapsulação superiores às demais, sendo o teor de F3c maior que o de F3b. Tendo em vista que a diferença destas formulações em relação às demais é a proporção de ATA utilizada na sua manufatura (150 e 300 mg, respectivamente), verifica-se que quanto maior a massa de ATA empregada na formulação, maior foi o percentual de encapsulação do mesmo. As proporções detalhadas de massa de polímeros e ATA utilizados na manufatura dos diferentes lotes de microesferas estão descritas na Tabela 4 do item 4.5.1.

Tendo em vista que o preparo de microesferas pelo método de emulsificação seguida de evaporação de solvente compreende diferentes etapas (item 4.5), é possível supor que ocorreram perdas do ATA não encapsulado nas ME-ATA durante o preparo das formulações, principalmente nas sucessivas lavagens por processo de carreamento físico.

Ranjha, Khan & Naseem (2010) avaliaram formulações de microesferas mucoadesivas com polímeros em diferentes proporções para encapsulação de flurbiprofeno. Os autores observaram que as formulações que continham somente HPMC, bem como aquelas com HPMC e carbopol na proporção de 1:1, apresentaram maiores teores de encapsulação comparadas com as formulações compostas por carboximetilcelulose (CMC) e carbopol separadamente.

No presente estudo verifica-se que proporções equitativas de HPMC e carbopol contribuiriam para elevar o percentual de encapsulação do ATA quando comparado a formulações com maiores teores de HPMC em sua composição. Porém, no estudo supracitado (Ranjha, Khan & Naseem, 2010) os autores verificaram uma maior afinidade do flurbiprofeno pelo HPMC em comparação ao carbopol e à CMC. Sugere-se que esta diferente afinidade se deva ao fato do ATA ser mais polar que o flurbiprofeno.

Garud & Garud (2012) prepararam microesferas a base de HPMC, carbopol, etilcelulose e quitosana para o encapsulamento de metformina empregando apenas um destes polímeros por lote, pelo método de evaporação de solvente, variando a relação entre fármaco/polímero e a velocidade de agitação mecânica. Os autores verificaram que, ao aumentar a proporção do polímero em relação ao fármaco, o percentual de fármaco encapsulado diminuiu independentemente do polímero

testado. Os autores não observaram variações significativas do teor de encapsulação para formulações obtidas com HPMC e carbopol. Estas observações corroboram os resultados do presente estudo, uma vez que maiores concentrações de ATA empregados no processo de manufatura das formulações levaram a maiores taxas de encapsulação da formulação final.

El-Hameed & Kellaway (1997) avaliaram o desempenho de polímeros hidrofílicos empregadas no preparo de microesferas mucoadesivas para administração intranasal. Os autores utilizaram quitosana, carbopol 934P, HPMC e polivinilalcol (PVA) na incorporação de dextrana fluorosceína isotiocianato (FITC-dextran) pelo método de emulsificação/evaporação de solvente. Os autores verificaram que microesferas a base de carbopol apresentaram maior percentual de encapsulação (81%) quando comparado aos outros polímeros, que apresentaram taxas inferiores a 55%, sendo quitosana a menor delas (36%). Os autores relatam que, durante o processo de evaporação de solvente, a quitosana precipitou antes do fármaco, o que poderia resultar nos menores teores de encapsulação observados. Assim, uma formulação composta por diferentes proporções poliméricas poderia reduzir os efeitos indesejados observados em formulações compostas por apenas um polímero.

Wang et al. (2009) relatam que é importante o uso de polímeros de polaridade compatível com o fármaco. Os autores atribuem os baixos teores de encapsulação em micropartículas de PCL para encapsulação de rodamina ao fato do polímero ser hidrofóbico e o fármaco hidrofílico. Resultado semelhante foi observado por Maestrelli et al. (2008), ao incorporarem cetoprofeno em complexos de inclusão de ciclodextrina em PLGA.

Portanto, a utilização de proporções iguais entre HPMC e carbopol teve um efeito positivo no presente estudo, uma vez que o carbopol permitiu aprimorar a eficiência da encapsulação e o HPMC incrementou o potencial mucoadesivo da formulação.

### **5.3 Análise morfológica das formulações**

A morfologia das microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA) foi avaliada pela distribuição de tamanho e índice de polidispersão, e também por microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### 5.3.1 Análise granulométrica e avaliação do índice de polidispersão

A análise granulométrica foi realizada por difração de luz (item 4.6.2.1). Neste método, a amostra dispersa em uma solução aquosa estática é adicionada em um fluido aquoso do módulo e então distribuída através de uma célula, com velocidade constante. Em seguida, o feixe de laser é incidido sobre a célula ocorrendo sua difração pelas partículas presentes, que é registrada pelos detectores (RIBEIRO-COSTA et al., 2009). A média do tamanho e o índice de polidispersão das diferentes formulações e seus respectivos brancos estão dispostos na Tabela 11.

**Tabela 11 - Tamanho médio e índice de polidispersão das formulações contendo ATA (F1-5) e seus respectivos brancos (FB1-5).**

Formulação	Tamanho médio ( $\mu\text{m} \pm \text{DPR}$ )	Índice de polidispersão ( $\mu\text{m} \pm \text{DPR}$ )
F1	7,71 $\pm$ 2,69	3,99 $\pm$ 0,52
FB1	59,32 $\pm$ 12,30	4,18 $\pm$ 1,09
F2	27,42 $\pm$ 1,80	3,29 $\pm$ 1,98
FB2	177,4 $\pm$ 3,68	1,13 $\pm$ 0,04
F3a	16,26 $\pm$ 4,89	5,22 $\pm$ 1,15
F3b	21,71 $\pm$ 3,77	1,78 $\pm$ 0,33
F3c	37,89 $\pm$ 1,68	1,72 $\pm$ 0,1
FB3	174,15 $\pm$ 26,66	1,36 $\pm$ 0,39
F4	93,19,08 $\pm$ 1,08	1,32 $\pm$ 0,03
FB4	96,89 $\pm$ 15,28	2,77 $\pm$ 0,31
F5	89,58 $\pm$ 3,82	1,59 $\pm$ 0,27
FB5	126,2 $\pm$ 4,17	1,29 $\pm$ 0,06

**Nota:** Os lotes foram obtidos em triplicata.

Todas as formulações apresentaram tamanho médio inferior ao respectivo branco (Tabela 11). Maiores teores de carbopol na malha polimérica (F4 e F5) levaram ao aumento do diâmetro médio das partículas contendo ATA. Este aumento de tamanho pode estar associado à alta capacidade do carbopol em conferir viscosidade ao sistema como um todo na presença de água, bem como ao seu caráter higroscópico (LIU et al., 2005). Nas formulações com proporções poliméricas constantes (F3a, b e c), nas quais se variou apenas a concentração de ATA, o aumento do tamanho da partícula foi proporcional ao aumento da concentração de ATA. Assim, na formulação F3a, que apresentou o menor teor de ATA (24% m/m; formulação preparada com 50 mg de ATA), o tamanho médio das partículas foi de

aproximadamente 16  $\mu\text{m}$ , enquanto F3c, que apresentou o maior teor (67% m/m, formulação preparada com 300 mg de ATA), possui diâmetro médio de aproximadamente 37  $\mu\text{m}$ .

A literatura não relata, de modo geral, grandes variações no tamanho de partículas em função da relação fármaco/polímero. Segundo Gavini et al. (2008), microesferas de quitosana apresentam tamanho maior em relações polímero/fármaco 1:1 (8,15  $\mu\text{m}$ ) do que na relação 1:2 (5,92  $\mu\text{m}$ ) na encapsulação de metoclopramida. De forma semelhante, Kawadkar & Chauhan (2012) obtiveram diferentes lotes de microesferas de quitosana com genipina, e os lotes com relação fármaco/polímero 3:1 apresentaram menores diâmetros de partículas que os demais. Os autores atribuíram esta variação de tamanho a reações cruzadas entre o fármaco e o polímero.

Chandrakala & Saral (2013) obtiveram diferentes lotes de microesferas a base de HPMC e CMC para encapsulação de levodopa. Os autores verificaram que o diâmetro da partícula variou de maneira dependente da relação polímero/fármaco ou polímero/polímero, indicando que as variações podem não estar associadas apenas ao material utilizado na confecção das microesferas, mas também a variações na quantidade de fármaco utilizado no preparo das mesmas. Este fato condiz com o presente estudo, uma vez que os lotes F3b e F3c tiveram um aumento de 100 a 250 mg de ATA comparado aos demais lotes, sugerindo que esse incremento possa contribuir para o aumento do diâmetro das partículas.

A análise da média de tamanho das microesferas indica que apenas a formulação F4 apresentou tamanho médio de partícula maior que o respectivo branco. As demais formulações apresentaram tamanho menor que seus respectivos brancos, em especial as formulações F1 e F2, que apresentaram 50% ou mais de HPMC em termos de proporção polimérica na sua composição. A Tabela 12 apresenta a distribuição granulométrica de acordo com as diferentes proporções de partículas em faixas de tamanho.



**Tabela 12 - Tamanho médio e índice de polidispersão das formulações ME-ATA (F1-5) e seus respectivos brancos (FB1-5).**

Formulação	<10% ( $\mu\text{m} \pm$ DPR)	<25% ( $\mu\text{m} \pm$ DPR)	<50% ( $\mu\text{m} \pm$ DPR)	<75% ( $\mu\text{m} \pm$ DPR)	<90% ( $\mu\text{m} \pm$ DPR)
F1B	11,98 $\pm$ 0,14	19,20 $\pm$ 0,38	33,92 $\pm$ 1,45	67,66 $\pm$ 7,38	154,9 $\pm$ 42,40
F1	1,12 $\pm$ 0,37	1,99 $\pm$ 0,69	4,418 $\pm$ 1,29	10,57 $\pm$ 3,55	19,18 $\pm$ 794,
F2B	85,65 $\pm$ 0,76	121,35 $\pm$ 0,64	170,85 $\pm$ 1,77	226,55 $\pm$ 2,89	278,80 $\pm$ 8,77
F2	5,079 $\pm$ 2,79	10,12 $\pm$ 4,29	19,04 $\pm$ 4,60	36,62 $\pm$ 3,13	63,33 $\pm$ 19,69
F3B	75,35 $\pm$ 1,05	106,4 $\pm$ 1,55	152,56 $\pm$ 0,19	210,95 $\pm$ 14,78	282,35 $\pm$ 58,48
F3a	3,19 $\pm$ 2,80	5,86 $\pm$ 4,36	13,24 $\pm$ 4,67	24,15 $\pm$ 5,35	34,706 $\pm$ 7,36
F3b	5,06 $\pm$ 2,04	10,90 $\pm$ 2,87	20,26 $\pm$ 4,33	31,86 $\pm$ 5,44	40,76 $\pm$ 6,37
F3c	8,55 $\pm$ 1,60	19,88 $\pm$ 1,46	35,70 $\pm$ 2,78	55,07 $\pm$ 3,50	70,14 $\pm$ 3,11
F4B	5,25 $\pm$ 0,96	20,75 $\pm$ 4,98	80,11 $\pm$ 15,89	157,66 $\pm$ 32,01	223,53 $\pm$ 17,19
F4	38,87 $\pm$ 0,44	58,29 $\pm$ 0,63	89,06 $\pm$ 2,21	124,75 $\pm$ 2,76	156,4 $\pm$ 0,14
F5B	51,13 $\pm$ 0,95	82,67 $\pm$ 0,60	121,63 $\pm$ 1,59	166,90 $\pm$ 1,66	208,8 $\pm$ 9,79
F5	35,28 $\pm$ 3,38	53,52 $\pm$ 4,53	80,72 $\pm$ 8,59	120,80 $\pm$ 6,71	162,03 $\pm$ 7,37

**Nota:** Análises realizadas em triplicata.

O índice de polidispersão ou índice de span avalia a amplitude de distribuição de tamanho das partículas, classificando-as em monodispersas (homogêneas) ou polidispersas (heterogêneas). Considera-se que as partículas apresentam alto grau de homogeneidade quando este valor é menor que 1. Valores acima de 1 indicam heterogeneidade no tamanho das partículas ou presença de aglomerados particulares e/ou populações de tamanhos variados (GAUMET et al., 2008). Portanto, todas as formulações avaliadas são polidispersas.

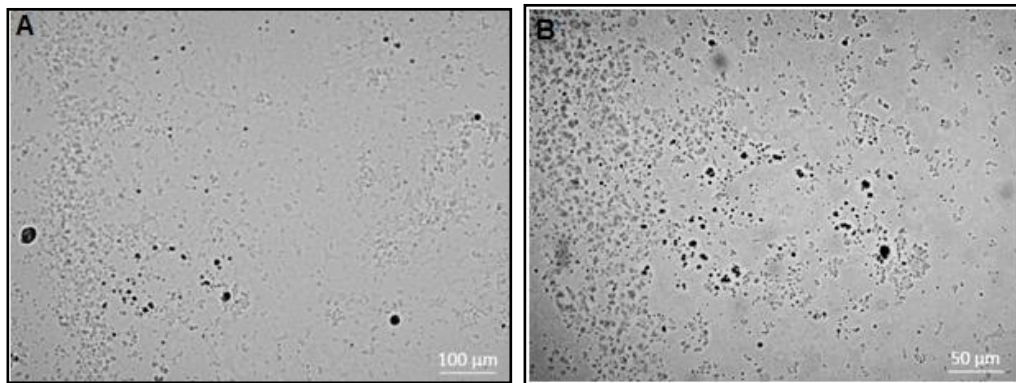
Kawadkar & Chauhan (2012) relatam índice de polidispersão (IP) variando de 1,03 a 5,21 dependendo do lote avaliado para formulações a base de quitosana e genipina. Os autores enfatizam que o aumento de genipina no lote resultou em menor IP, fato também observado para o diâmetro médio das partículas. Os autores atribuíram as variações aos maiores teores de quitosana devido à menor intensidade de reações cruzadas e ao aumento da viscosidade da fase interna.

Gavini et al. (2007) obtiveram menor variação nos valores de IP, porém todos estes foram superiores a 1 para a formulação de quitosana e metoclopramida. Os resultados de ambos os estudos são similares aos do presente trabalho, no qual se observou valores de IP de 1,13 a 5,21, indicando dificuldade de obtenção de sistemas particulados de tamanhos micrométricos monodispersos.

### 5.3.2 Microscopia ótica

A análise por microscopia ótica possibilitou observar a morfologia das microesferas e fornecer informações sobre o tamanho geral destas. As figuras 15 A e B mostram a morfologia formação de microesferas mucoadesivas sem ATA (branco) nos aumentos de 100 e 200 vezes, respectivamente.

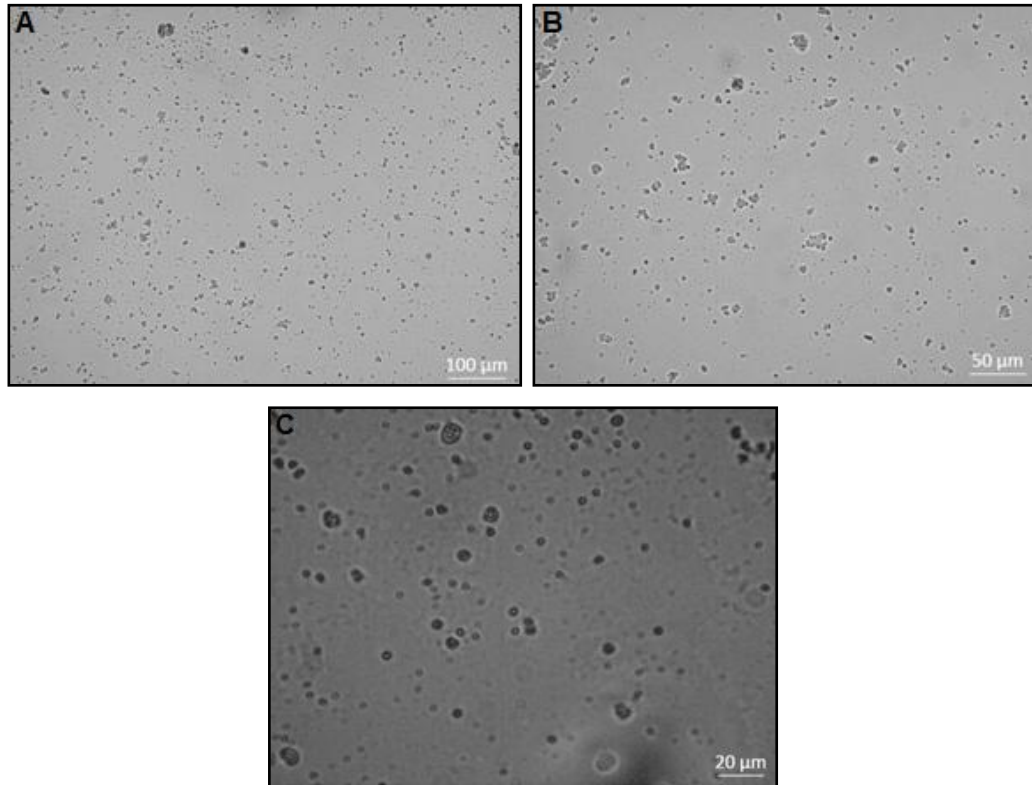
**Figura 15 - Imagens obtidas por microscopia ótica da formulação de microesferas mucoadesivas sem ATA, nos aumento de 100x (A) e 200x (B).**



Imagens com aumentos superiores por microscopia ótica foram inviáveis devido à perda de resolução. As figuras 15 A e B mostram relativa heterogeneidade na distribuição granulométrica das partículas. Isto pode ser atribuído ao método de preparo das microesferas, emulsificação/evaporação de solvente, o qual se baseia na formação de microgotículas e posterior evaporação do solvente interno destas, originando as microesferas. Segundo Garud & Garud (2012), a velocidade de agitação influencia no tamanho destas micropartículas e poderia explicar a heterogeneidade observada. Outra possível razão é que o tempo e o volume de solvente (água) empregados para dispersão da amostra no preparo das lâminas tenha sido insuficiente para dispersar todas as partículas, possibilitando a visualização de aglomerados particulares.

As figuras 16 A, B e C apresentam imagens obtidas por microscopia ótica para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ácido *trans*-aconítico (lote F3c), nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes, respectivamente.

**Figura 16 - Imagens obtidas por microscopia ótica para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA lote F3), com aumento de 100x (A), 200x (B) e 400x (C).**



As imagens obtidas indicam a formação de microesferas da formulação com maior uniformidade de tamanho, quando comparadas ao branco. É possível inferir que a maioria das partículas presentes tem diâmetro inferior a 40 µm e que a variação na distribuição granulométrica é menor que a observada para o branco da formulação. De maneira semelhante ao branco, não foi possível obter imagens com maiores aumentos, devido à perda de resolução.

É provável que um dos fatores responsáveis pela variação de tamanho observada em todas as formulações se deva à higroscopicidade e capacidade de incrementar a viscosidade que os polímeros empregados apresentam. Em conjunto, esses fatores aumentam a viscosidade da fase interna e das microesferas devido a formação de aglomerados poliméricos na etapa de emulsificação, o que dificulta a dispersão da malha polimérica, como previamente observado (Liu et al., 2005; O'donnell & McGinity, 1997).

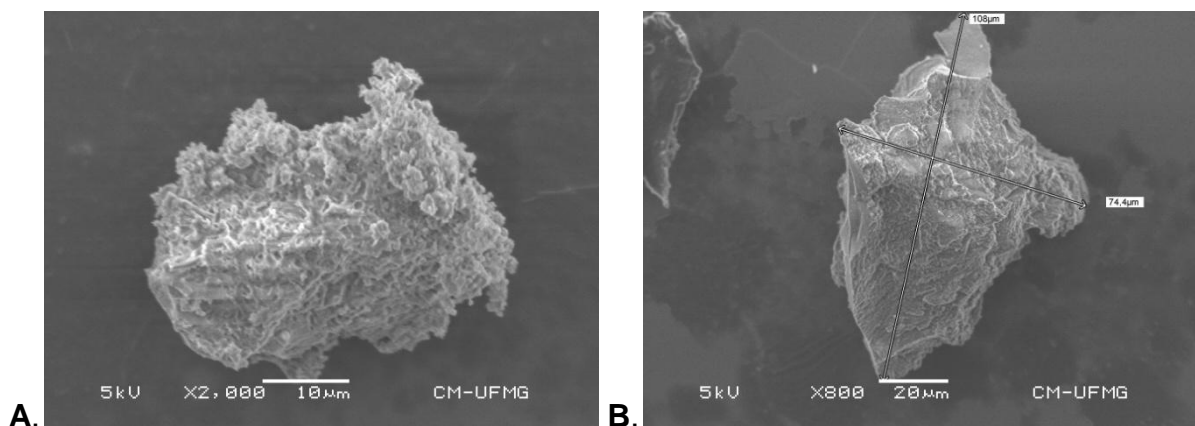
Como a técnica de microscopia ótica não permite uma resolução suficiente para examinar a superfície das microesferas de forma precisa, faz-se necessário

utilizar outros meios de avaliação morfológica. Assim, além da microscopia ótica, no presente estudo foram realizadas análises por difração a laser e microscopia eletrônica de varredura, a fim de se obter maiores detalhes sobre as características morfológicas das partículas.

### 5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no intuito de se obter maiores informações sobre a morfologia das microesferas, como tamanho e distribuição. As figuras 17 A e B apresentam imagens obtidas por MEV para o formulação de microesferas mucoadesivas sem o ATA (branco).

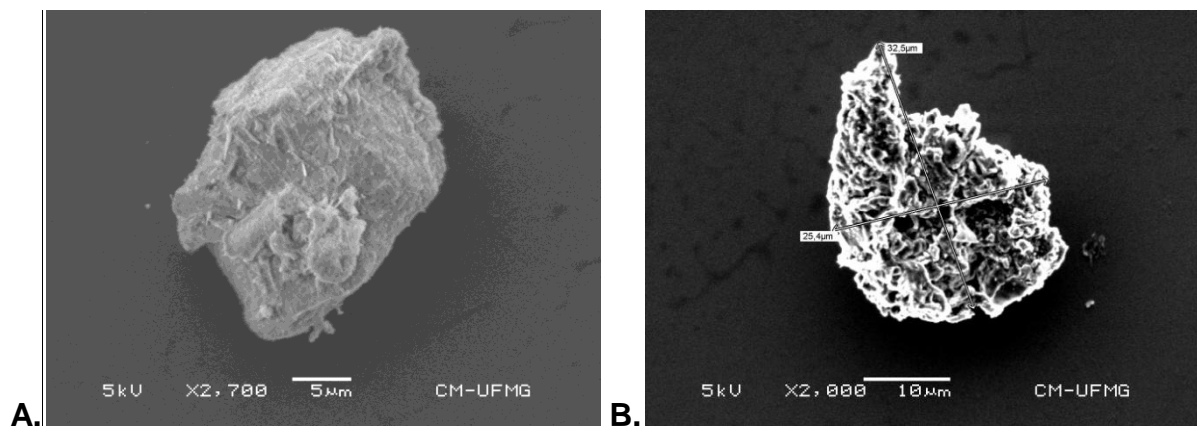
**Figura 17 - Imagens obtidas por MEV para formulação de microesferas mucoadesivas sem ATA (branco), com ampliação de 2000× (A) e 800× (B).**



As imagens obtidas evidenciam a morfologia discretamente esferiforme das partículas, bem como a superfície porosa, fato que permite hidratação rápida da partícula, acelerando a etapa de intumescimento no processo de mucoadesão. Outro fator observado é o tamanho da partícula (108 µm de altura por 74,4 µm de largura), condizente com o tamanho médio observado para o branco nas análises granulométricas. Além disso, verificam-se características observadas na microscopia ótica, como a não dispersão total da malha e a distribuição heterogênea no tamanho de partículas.

As figuras 18 A e B apresentam imagens de MEV obtidas para a formulação ME-ATA (lote F3c) nas mesmas ampliações utilizadas para análise da formulação branca.

**Figura 18 - Imagens obtidas por MEV para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (F3c), com aumento de 2700× (A) e 2000× (B).**



De forma semelhante ao branco, as micrografias da formulação F3c mostram que as partículas apresentam morfologia discretamente esferiforme e superfície porosa. Os dados obtidos corroboram os resultados da análise granulométrica, uma vez que as partículas apresentaram tamanho reduzido como se observa na figura 18 B (32,5 µm de altura por 25,4 µm de largura).

As análises de distribuição granulométrica realizadas por MO e MEV levaram a resultados semelhantes: ambas evidenciaram populações de partículas de diferentes tamanhos, o que poderia, em parte, ser atribuído à alta viscosidade dos polímeros, que afeta a fase de emulsificação e resulta em aumento do tamanho das partículas bem como tamanho reduzido das microesferas contendo ATA. O carbopol é um polímero aniônico, o que pode levá-lo a formar complexos não iônicos ou catiônicos com excipientes da matriz ou com o próprio fármaco (SINGLA et al., 2000).

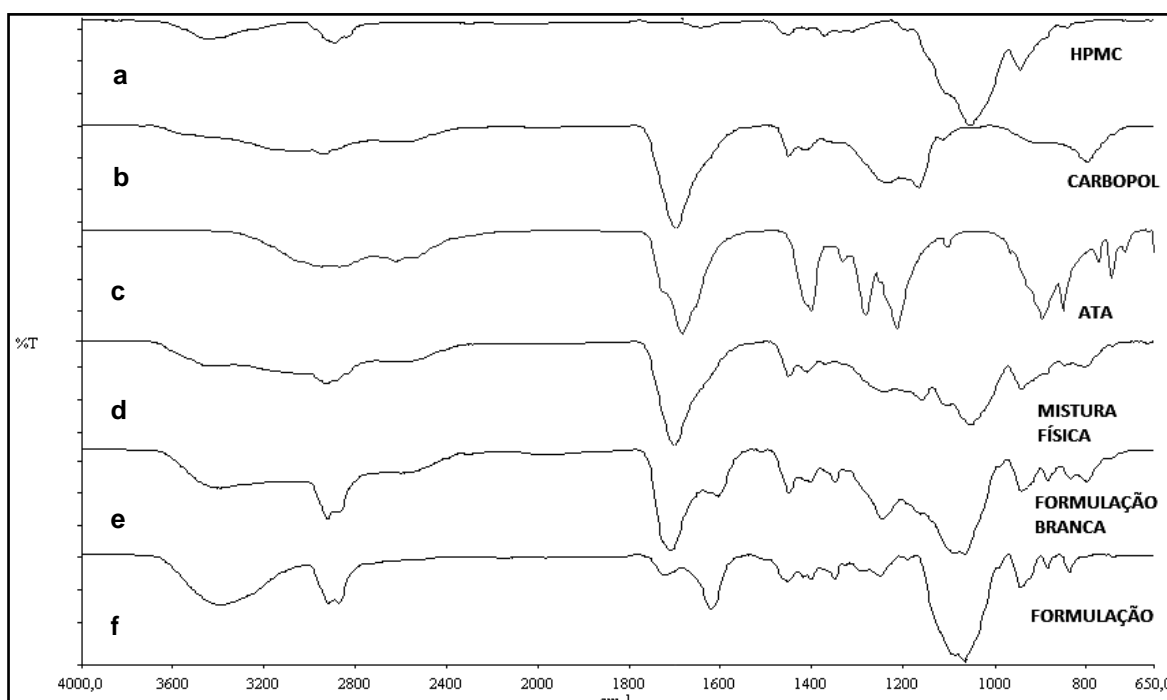
Ranjha, Khan & Naseem, (2010) avaliaram a morfologia de microesferas mucoadesivas de carbopol, HPMC e CMC para o encapsulamento de flurbiprofeno pela técnica de emulsificação seguida de evaporação de solvente. Os autores relatam que as análises por MEV exibiram boa resolução para formulações dos polímeros isolados ou utilizados em conjunto, e as imagens relatadas no trabalho não apresentam interferentes. No presente estudo se observou padrão de resultados relatados semelhantes aos relatados por Ranjha, Khan & Naseem, (2010); as imagens obtidas sugerem a presença de poucos interferentes residuais na formulação.

### 5.3.4 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) possibilita a avaliação de compatibilidade entre os componentes da formulação, suas possíveis interações químicas e a estabilidade destes na formulação (MIDHA, NAGPAL, ARORA 2015; ZHOUL et al., 2009).

A figura 19 apresenta os espectros na região do IV obtidos para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ácido *trans*-aconítico (F3a), bem como o branco da formulação e seus constituintes isoladamente e em mistura.

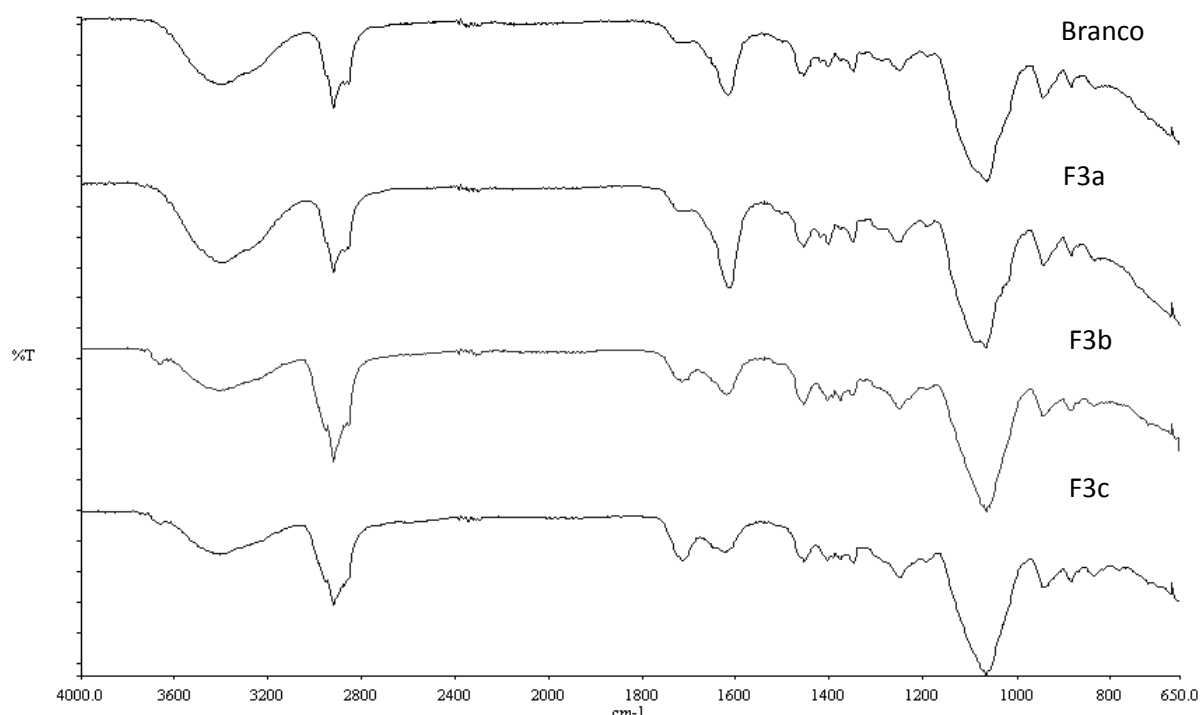
**Figura 19 - Espectros na região do IV obtidos para a formulação de contendo ATA (F3a), branco da formulação, mistura física dos constituintes da formulação, e constituintes isolados, (ATA), carbopol e HPMC.**



A análise dos espectros no IV possibilita inferir que o contato entre os componentes da matriz no estado sólido não apresenta incompatibilidade, uma vez que a mistura física dos constituintes apresentou bandas de absorção características de cada um deles, ou seja, do HPMC, carbopol e ATA. Já a formulação contendo ATA (ME-ATA) apresentou diferenças quando comparada à formulação branca (ME), principalmente na intensidade da banda em aproximadamente  $1720\text{ cm}^{-1}$ , indicando que esta banda se deve ao estiramento de C=O de ácido carboxílico

presentes no ATA. Tendo em vista que os lotes F3b e F3c possuem maiores teores de ATA que F3a, foram obtidos espectros no IV a fim de verificar se a banda em  $1720\text{ cm}^{-1}$  era de fato resultante do estiramento C=O do grupo carboxila de ATA (figura 20).

**Figura 20 - Espectros obtidos na região do IV para o branco da formulação de microesferas mucoadesivas e para as formulações contendo ácido *trans*-aconíticos (ME-ATA, três lotes distintos de F3).**



Verificou-se que com o aumento do teor de ATA nas formulações (incremento crescente de F3a para F3b e para F3c), houve aumento da intensidade da banda em  $1720\text{ cm}^{-1}$ , o que indica que esta banda é referente ao estiramento C=O de ácido carboxílico. Observa-se, também, uma banda em aproximadamente  $1620\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento C=O de amida. Conforme relatado nas análises de seletividade do método cromatográfico (item 4.4.4), observou-se a presença de DMA residual nas formulações. Portanto, é provável que a banda observada se deva à presença de DMA.

As análises no IV empregadas na caracterização de microesferas têm como principal intuito inferir sobre as características estruturais e interações entre o fármaco e a malha polimérica. Jana, Nando, Khastgir. (2013) relatam a ocorrência

de ligações cruzadas entre a quitosana e o ácido cítrico, inferidas a partir das bandas em aproximadamente 1750 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos C=O e C-O-C de ésteres. As interações entre diferentes polímeros e resíduos de celulose e ácido cítrico foram relatadas por diversos autores (YANG, WANG, KANG 1997; MARTEL et al., 2001; COMA et al.; 2003; REDDY, JIANG, YANG, 2010; KUMBAR, KULKARNI & ANIMABHAVI, 2002) e as principais características evidenciadas são alterações nas bandas supracitadas nos espectros na região do infravermelho.

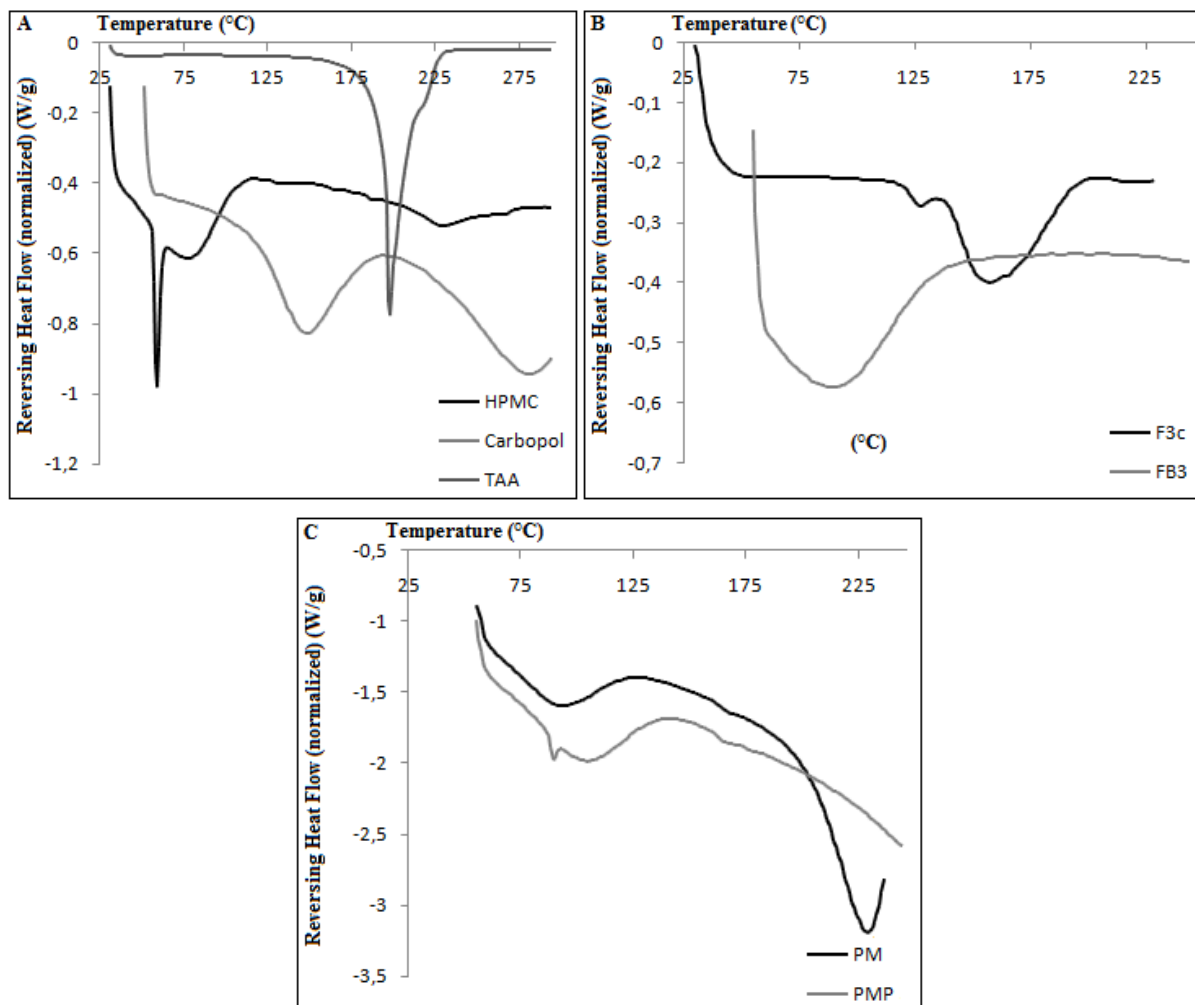
### **5.3.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) baseia-se na aplicação linear de aquecimento e/ou resfriamento em uma amostra, a fim de determinar a temperatura e energia associadas a eventos térmicos de absorção ou liberação de energia (endotérmicos e exotérmicos), tais como fusão, cristalização, transição vítrea e decomposição. Estes eventos fornecem informações sobre as propriedades físico-químicas das substâncias e possíveis interações, estabilidade e compatibilidade entre os compostos com precisão e exatidão (BOND et al., 2002; HARDING et al., 2008).

A figura 21 apresenta os termogramas obtidos para os componentes individuais empregados no preparo da formulação (HPMC, carbopol e ATA), seguido da mistura física destes com e sem o ATA (branco), bem como para a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) e seu respectivo branco (ME, lote FB3c).



**Figura 21: Curvas de DSC obtidas para os componentes da formulação HPMC, carbopol e ácido *trans*-aconítico (ATA) (A), formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) e seu respectivo branco (ME, lote FB3c) (B), mistura física dos componentes contendo ATA e mistura física dos componentes sem o ATA (branco) (C).**



A temperatura de gelatinização do HPMC ocorre entre 50-90°C, a transição vítrea entre 170 e 180°C, o polímero escurece entre 190-200°C e carboniza entre 225-230°C (ROWE, SHESKEY & QUINN, 2009). O termograma do HPMC permite visualizar quatro eventos endotérmicos: dois iniciais em 59°C e 74°C, condizentes com a gelatinização do polímero; outro em 180°C, relacionado com a transição vítrea; e o último evento em 225°C, correspondente à carbonização. Siepmann & Peppas (2012) atribuem a variação observada na temperatura de transição vítrea às diferentes proporções de substituintes dos radicais e à massa molecular do polímero.

Quanto ao carbopol, observa-se um evento endotérmico em 149°C. Gómez-Carracedo et al. (2004) relatam que a temperatura de transição vítrea do carbopol ocorre nesta faixa; porém, picos de DSC para polímeros não se comportam como se observa para outros tipos de amostras puras (que se apresentam finos como o observado para o ATA). Quando o carbopol atinge temperaturas acima de 130°C, ocorre eliminação de solventes residuais do processo de manufatura do polímero que atuam como plastificantes, o que altera o perfil da curva de DSC. Os autores relatam, ainda, que o carbopol contém cerca de 2 a 4% de umidade residual e, devido a este fator, é comum observar picos na região de 50 a 100°C. Para evitar a formação desses picos, no presente trabalho, as amostras foram mantidas previamente em dessecador por 72 horas. As especificações técnicas do carbopol relatam que a fusão deste ocorre em 260 °C, durante 30 minutos (ROWE, SHESKEY & WELLER, 2009). No termograma obtido observa-se um evento endotérmico com máximo de temperatura em 277°C, possivelmente relacionado à fusão do polímero.

O termograma do ATA apresenta dois eventos endotérmicos em 198°C e 213°C, correspondente ao seu ponto de fusão. Wyrzykowski et al. (2011) relatam que o ATA não funde antes de se decompor, estes dois eventos associados são indicativos de um processo complexo na fusão do composto que reflete no perfil da curva de DSC. Segundo os autores, este fato estaria associado à estabilidade termodinâmica do ATA no processo de degradação, e a inflexão da curva tem relação com a decomposição de produtos intermediários formados durante o aquecimento da amostra, em especial a formação de anidrido.

A mistura física apresentou três eventos endotérmicos principais: em 58°C e 132°C, referentes às temperaturas de gelatinização e transição vítrea do HPMC e carbopol, respectivamente, e um último evento em 196°C, referente ao ponto de fusão do ATA. A mistura física branca apresenta eventos também relacionados à gelatinização e transição vítrea dos polímeros, e demonstrou uma inflexão da curva e geração de outro pico endotérmico, provavelmente associado ao ponto de fusão do HPMC; porém, esta observação não pode ser conclusiva na faixa de temperatura avaliada.

Os dois eventos endotérmicos apresentados pela formulação e a ausência de eventos relacionados ao HPMC indicam interação entre o fármaco e a matriz polimérica, uma vez que a energia necessária para fusão do fármaco e transição

vítrea do carbopol foi menor, quando comparada aos termogramas obtidos para cada composto isoladamente, bem como para a mistura física desses. O termograma da formulação branca apresenta dois eventos endotérmicos associados à gelatinização do HPMC (59°C) e à temperatura de transição vítrea do carbopol (147°C).

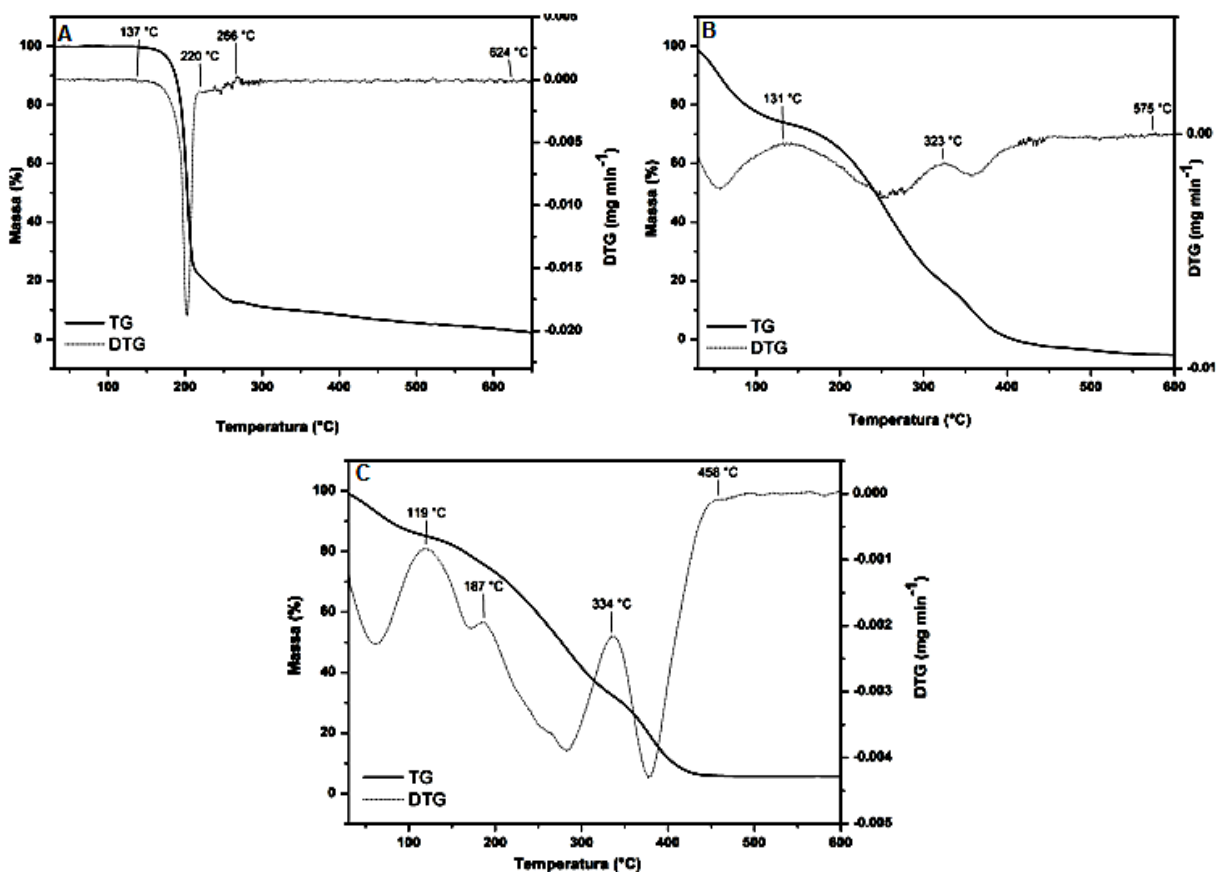
Jana, Nando & Khastgir (2013) avaliaram a encapsulação de aceclofenaco em quitosana para obtenção de microesferas mucoadesivas. Os autores verificaram um alargamento do pico endotérmico referente ao fármaco na formulação, porém sem altas variações na temperatura máxima do ápice do pico endotérmico associado ao ponto de fusão do fármaco. No presente estudo observamos um alargamento de pico endotérmico, associado ao deslocamento para uma menor temperatura, na formulação quando comparado ao termograma do ATA. Na formulação não se observou um pico no tempo de fusão do ATA. Estes dados sugerem que O ATA se distribuiu de forma heterogênea na malha e que a formulação não gerou estruturas cristalinas uma vez que o pico endotérmico observado se deve, em parte, aos eventos térmicos associados ao carbopol (pico largo na região de 140 °C), e ao ponto de fusão do ATA, o que indica interação entre o ATA e a matriz polimérica. Os espectros no IV (figuras 19 e 20) sugerem que esta interação não levou a modificações estruturais bruscas, devido à similaridade espectral entre a formulação e seu respectivo branco.

### **5.3.6 Análise termogravimétrica (TG)**

A análise termogravimétrica (TG) permite determinar a estabilidade térmica dos polímeros a partir da avaliação da perda de massa da amostra submetida a um fluxo de calor, por tempo estabelecido. Observa-se a relação entre a perda de massa e a estrutura molecular da amostra, bem como as interações entre componentes de uma formulação. Estes eventos estão relacionados com a evaporação de componentes residuais ou com a decomposição da matriz. Em função de suas características, a técnica apresenta limitações para amostras de natureza desconhecida (DENARI & CAVALHEIRO, 2012).

A figura 22 apresenta os termogramas obtidos para o ATA, a formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) e seu respectivo branco (ME, lote FB3c).

**Figura 22: Curvas de TG e DTG obtidos para o ATA (A), formulação de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lote F3c) (B) e respectivo branco (ME, lote FB3c) (C).**



O termograma do ATA (Figura 22a) indica que este se decompõe logo após fundir. Observa-se 80% de perda de massa até 220°C e é possível supor que as demais perdas são referentes a produtos de degradação (8,3% até 266°C) e resíduos (9% até 600°C). Estes resultados corroboram as análises de DSC, uma vez que é descrita a formação de anidrido *trans*-aconítico como produto de degradação. Quanto à formulação branca, observa-se a perda de 25,3% de massa até 129°C. Como os polímeros são higroscópicos, e emprega-se água no processo de obtenção da formulação, sugere-se que esta perda seja referente à água residual. Em seguida, observa-se perda de 53% de massa até 315°C, o que indica a degradação dos polímeros HPMC (225-230°C) e carbopol (260°C), como observado anteriormente na análise de DSC e descrito na literatura para esses polímeros (ROWE, SHESKEY & WELLER, 2009). O restante da perda de massa (26,27%) ocorre até 599°C e pode ser atribuída a resíduos de produtos de degradação.

O termograma da formulação contendo ATA é semelhante àquele da formulação branca: observa-se perda de 13% de massa até 119°C, referente à água, seguida de perda de 52% de massa até 334°C, referente à degradação dos polímeros, acompanhado de um pico distinto na curva a 187°C, indicando a presença do ATA. É possível que o ATA sofra algum tipo de interação com os componentes da matriz polimérica, devido à diminuição desta temperatura em comparação ao termograma do ATA isolado. A perda de massa restante (27,6%) ocorre até 457,6°C, sugerindo maior estabilidade da formulação em comparação com o branco.

Singh & Dhiman (2016) produziram um gel mucoadesivo de goma de acácia contendo carbopol para o carregamento simultâneo de gentamicina e lidocaína, visando o tratamento de afecções orais. Os autores relatam a ocorrência de três estágios de decomposição da matriz polimérica, o primeiro em 155°C, atribuído à perda de massa referente à água residual livre presente no polímero; a segunda perda de massa na faixa de 155 a 315 °C, referente à perda de água associada à matriz por interações químicas como ligação de hidrogênio e formação de anidridos como observado para o ATA no presente estudo; e uma última perda em 459°C, associada à degradação final da matriz por processos de descaboxilação e despolimerização.

Este perfil de degradação térmica relatada pelos autores acima condiz com o perfil observado para a formulação F3c e respectivo branco, pois se observa uma redução inicial de massa associada à perda de água, seguido de um evento intermediário, que pode estar associado à formação de anidrido e perda de água residual com interações químicas de maior força com a matriz; e um evento final, representando a degradação completa da matriz por despolimerização e descarboxilação.

Há diferentes relatos na literatura do emprego de quitosana no preparo de micropartículas poliméricas e perfil térmico destas. Ochiuz et al., (2013) avaliaram o perfil térmico de micropartículas mucoadesivas de quitosana com tartarato de metoprolol. Os autores relatam os eventos térmicos associados à perda de água, sendo a perda mais expressiva (18%) para as microesferas contendo ou não o fármaco, em comparação com o polímero (8%), sugerindo que as micropartículas apresentam maior capacidade retentiva de água, como observado no presente

estudo. Os outros eventos relatados pelos autores estão relacionados com a degradação da quitosana e do fármaco.

Walke et al. (2015) descrevem um perfil de degradação térmica semelhante para microesferas à base de quitosana empregada na encapsulação de toxóides contendo antígenos. Os autores relatam três perdas expressivas de massas: a primeira associada à água residual; a segunda ao início da degradação da quitosana por reações de desacetilação e despolimerização; e um último evento associado à decomposição da matriz.

Pelo exposto, pode-se concluir que matrizes poliméricas apresentam perfis de estabilidade relativamente semelhantes. Apesar das particularidades, observam-se eventos associados à perda de massa de água residual; início de composição da matriz como um todo, ou de cada componente de forma isolada; e outro evento associado à composição final, como observado no presente estudo, onde foram empregados polímeros sintéticos (carbopol) e semissintéticos (HPMC), bem como para polímeros naturais, como relatado na literatura para a quitosana.

### 5.3.7 Potencial Zeta

Inicialmente foi preparada uma solução de cada formulação avaliada na diluição de 1:100 partes em água. As soluções apresentaram alto grau de polidispersão e por isso foi realizada outra diluição (1:1000), que apresentou dispersão adequada. Os resultados de potencial zeta das amostras estão dispostos na tabela 13.

**Tabela 13 - Potencial Zeta das formulações de microesferas mucoadesivas contendo ATA (ME-ATA, lotes F3a, b e c) e respectivo branco (ME, lote FB3).**

Formulação	Potencial Zeta (mV ± DPR)	Massa de ATA (mg)
F3a	-32,5 ± 4,12	50
F3b	-34,8 ± 2,55	150
F3c	-34,4 ± 3,23	300
F3 branca	-42,8 ± 1,27	-

**Nota:** Análises realizadas em triplicata para cada lote.

Sistemas particulados dispersos tendem a gerar cargas em função da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície da partícula, ou por

adsorção de espécies iônicas inerentes ao líquido dispersante. A determinação deste potencial se dá por técnicas eletroforéticas e os resultados estão associados com a estabilidade físico-química do sistema e com possíveis interações entre a matriz e o fármaco (KIRBY & HASSELBRINK, 2004).

Todas as formulações apresentaram valores elevados de potencial zeta; a formulação branca apresentou menor potencial zeta que as formulações contendo ATA, mas a massa de ATA presente nas microesferas não influenciou significativamente o potencial zeta. Estes valores contribuem para a estabilidade da formulação, pois há uma maior repulsão de cargas, evitando a agregação entre as partículas. Dispersões coloidais são consideradas estáveis quando apresentam valor de potencial zeta de  $\pm 30$  mV (LAOUINI et al., 2012).

O processo de mucoadesão pode ser dividido em dois estágios, o primeiro consiste no contato entre a forma farmacêutica com propriedades mucoadesivas e a mucosa; o segundo na consolidação da partícula na mucosa. A consolidação ocorre por interações físico-químicas entre a partícula e a mucosa, porém, o sistema polimérico é ativado na presença de umidade, pois esta atua como plastificante, permitindo que as moléculas se relacionem de forma independente com a superfície da mucosa seja por interações de Van der Waals ou de hidrogênio. Para materiais catiônicos, esta interação pode ocorrer pela interação entre a carga positiva do material e a carga negativa de carboxilas e/ou sulfatos presentes em superfícies celulares, ou diretamente na mucina. Alguns polímeros, como o carbopol em meio aquoso, se acumulam rapidamente na interface diminuindo a energia de superfície desta e aumentando a adesão da formulação pelo muco (SMART, 2005). Em função deste mecanismo, verifica-se que a energia superficial das partículas é importante tanto na desagregação de aglomerados, quanto pela influência no mecanismo de mucoadesão.

Gavin, Konijeti & Nagaraju (2015) prepararam nanopartículas a base de etilcelulose, carbopol e HPMC para encapsulação de brometo de neostigmina. Os autores verificaram que o potencial zeta destas formulações não apresentou diferenças expressivas em função da proporção entre os polímeros utilizados, variando de -20,86 a -29,96 mV; porém, os autores não discutem os resultados e nem apresentam os resultados para formulações brancas. Verifica-se, no presente estudo, que mesmo se tratando de microesferas, os valores de potencial zeta não são muito diferentes daqueles de partículas poliméricas nanoestruturadas.

Já formulações à base de quitosana apresentam potencial zeta positivo em função do nitrogênio presente em sua estrutura. Esta característica catiônica propicia mucoadesão por mecanismos eletrostáticos. No geral, as microesferas apresentam valor de potencial zeta variável de acordo com o pH avaliado e/ou concentrações de tampões. Há descrição de microesferas de quitosana brancas de um mesmo lote com potencial zeta variando entre 3,5 a 26,3 mV em função da concentração de tampão fosfato. Além disso, verifica-se que microesferas brancas a base de quitosana na forma de sal apresentam maior potencial zeta que microesferas com quitosana base, o que é explicado pela habilidade de dissociação do sal e geração de carga em meio aquoso. Outro fato evidenciado para estudos de contato entre quitosana e mucina é que ambos têm seu potencial zeta reduzido quando associados, evidenciando as interações eletrostáticas (HE, DAVIS & IILUM 1998).

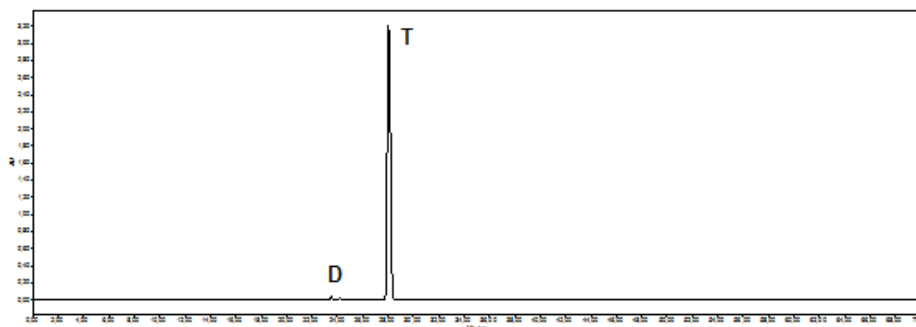
Estas observações evidenciam que as interações entre mucosa e partículas sofrem influência direta do potencial da superfície destas partículas, e que estas interações afetam o potencial mucoadesivo da formulação como um todo. Porém, não foram encontrados estudos correlacionando o potencial zeta de microesferas mucoadesivas, como as produzidas no presente estudo, e a mucina, que possam evidenciar a influência no potencial zeta da interação.

#### **5.4 Reações de esterificação do ácido *trans*-aconítico (ATA)**

A esterificação do ATA com EtOH, BuOH e OcOH foi inicialmente realizada empregando as condições descritas por Piang-Song (2012). Observou-se a formação dos ésteres e o consumo completo do produto de partida ATA; porém, foi obtido quase que na totalidade o triéster, sendo observados em pequena quantidade os diésteres e traços dos monoésteres (Figura 23). Dessa forma, foi necessário otimizar as condições reacionais para obter os derivados mono e diesterificados.



**FIGURA 23: Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a reação de esterificação do ATA com EtOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por 24 horas). Condições cromatográficas: vide parte experimental (perfil exploratório, item 4.4.2.2)**



**Nota:** Picos do cromatograma referentes aos diésteres (D) e triéster (T) etílico.

#### 5.4.1 Avaliação da cinética das reações de esterificação

As reações de esterificação de Fischer & Speier baseiam-se na ativação da carbonila do ácido carboxílico pelo catalizador de natureza ácida, que favorece o ataque nucleofílico do álcool reagente. Estas reações ocorrem de forma concomitante com as reações de hidrólise. Em função disso, variáveis como temperatura, tempo de reação e concentração dos reagentes alteram a direção da reação, favorecendo a formação dos produtos ou o retorno aos materiais de partida, como representado na figura 24 (FISHER & SPEIER, 1895; FERNANDES et al., 2013).

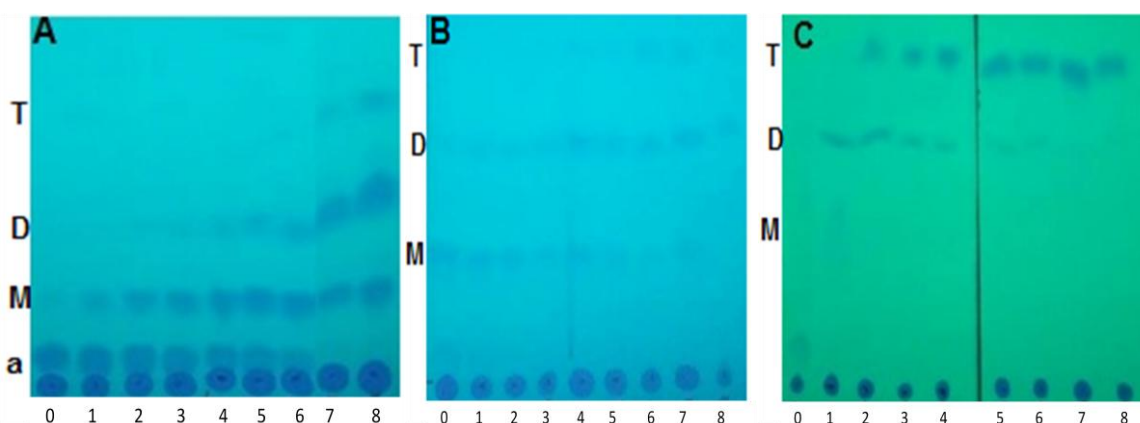
#### **Figura 24 - Equação química geral das reações de esterificação de Fischer entre ácidos carboxílicos e álcoois em meio ácido.**

Este tipo de reação gera como produtos o éster e água. A água formada na reação, associada à água residual presente nos reagentes, pode favorecer a hidrólise do éster, gerando o novamente o material de partida.

Para a avaliação da cinética das reações, empregaram-se técnicas cromatográficas de CCD e de CLAE-DAD. A análise dos cromatogramas de CCD obtidos para o estudo cinético (Figura 25) indica que o aumento da cadeia alifática

do álcool favoreceu a formação dos ésteres, tornando-os menos polares em comparação ao produto de partida (ATA), uma vez que possuem maior fator de retenção ( $R_f$ ). O potencial catalítico do ácido sulfúrico, empregado na reação, pode ser observado pela formação dos monoésteres no tempo zero da reação, onde ainda não há aquecimento do sistema. Observou-se a formação dos diésteres etílicos entre 30 e 45 minutos (pontos 2 e 3, Figura 25 A), enquanto os diésteres butílicos e octílicos foram observados após 15 minutos da reação (ponto 1, Figura 25 B e C). Por sua vez, os triésteres foram observados em 105, 75 e 45 minutos de reação, respectivamente para os derivados etílico, butílico e octílico (pontos 7, 5 e 3, Figura 25 A, B e C).

**Figura 25 - Cromatoplaças obtidas por CCD de sílica gel para a avaliação da cinética das reações de esterificação do ATA com EtOH (A), BuOH (B) e OcOH (C).**

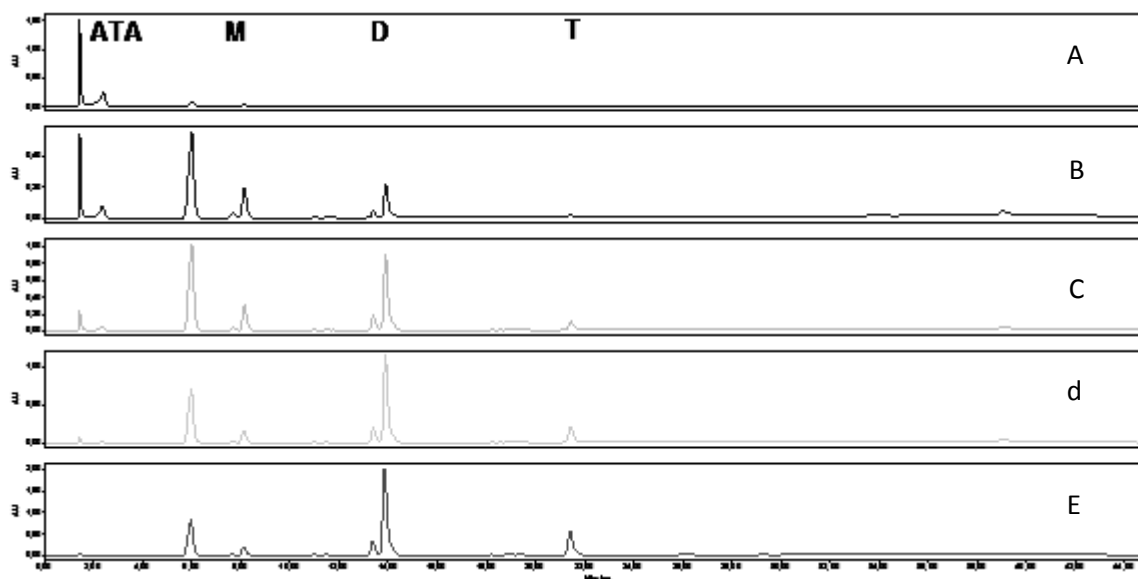


**Nota: Intervalos de tempo avaliados:** 0: início da reação; 1: 15 minutos; 2: 30 minutos; 3: 45 minutos; 4: 60 minutos; 5: 75 minutos; 6: 90 minutos; 7: 105 minutos; 8: 120 minutos. **a:** ATA; **M:** Monoésteres; **D:** Diésteres; **T:** Triéster. Fase móvel: Hex/EtOAc (7:3) e 1 mL de ácido fórmico, revelador: UV a 254 nm.

Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas por CLAE para monitorar a cinética das reações de esterificação e estimar o percentual de derivados formados de acordo com o tempo da reação. Nas figuras 26 a 28 estão dispostos os cromatogramas obtidos para as reações de esterificação do ATA com etanol, *n*-butanol e *n*-octanol respectivamente. Os cromatogramas estão dispostos em ordem crescente de tempo, no intervalo de 0 a 120 minutos, e foram extraídos no  $\lambda$  de 210 nm, em intervalos de 30 minutos. Empregou-se o método B para análise

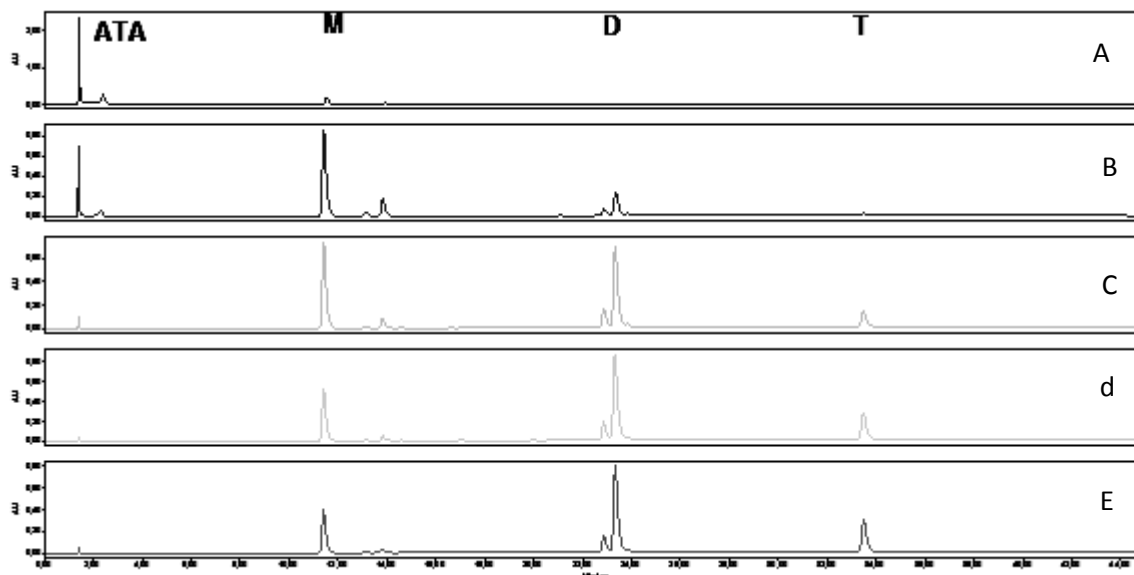
cromatográfica do estudo cinético das reações de esterificação com EtOH e BuOH (item 4.4.2.2).

**Figura 26 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com EtOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas: vide parte experimental (método B, item 4.4.2.2).**



**Nota: Intervalos de tempo avaliados: A: 0 início da reação; B: 30 minutos; C: 60 minutos; d: 90 minutos; E: 120 minutos. ATA: ácido *trans*-aconítico; M: região dos monoésteres no cromatograma; D: região dos diésteres no cromatograma; T: Triéster.**

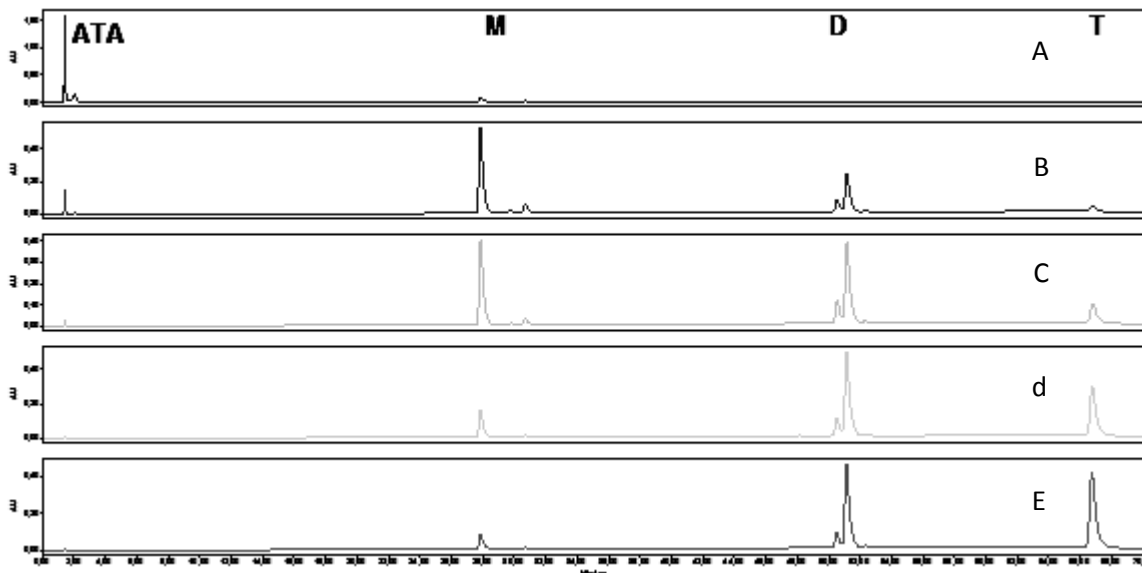
**Figura 27 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com ButOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas: vide parte experimental (método B, item 4.4.2.2).**



**Nota: Intervalos de tempo avaliados: A: 0 início da reação; B: 30 minutos; C: 60 minutos; d: 90 minutos; E: 120 minutos. ATA: ácido *trans*-aconítico; M: região dos monoésteres no cromatograma; D: região dos diésteres no cromatograma; T: Triéster.**

Não foi possível caracterizar o triéster octílico empregando as condições cromatográficas do método B devido à elevada lipofilia desse derivado. Dessa forma, para a caracterização desses derivados foram empregadas as condições cromatográficas do gradiente exploratório (item 4.4.2.2).

**Figura 28 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para o estudo cinético da reação de esterificação do ATA com OcOH (75°C, 2,7% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação foi monitorada em intervalos regulares de 30 minutos, com tempo total de 120 minutos. Condições cromatográficas: vide parte experimental (perfil exploratório, item 4.4.2.2).**



**Nota: Intervalos de tempo avaliados: A:** 0 início da reação; **B:** 30 minutos; **C:** 60 minutos; **d:** 90 minutos; **E:** 120 minutos. **ATA:** ácido *trans*-aconítico; **M:** região dos monoésteres no cromatograma; **D:** região dos diésteres no cromatograma; **T:** Triéster.

A tabela 14 apresenta os tempos de retenção (TR) dos ésteres obtidos pela reação com os diferentes álcoois, bem como a estimativa da lipofilia desses derivados, expressa como valores calculados de coeficiente de partição (log P) (item 4.7.3). O ATA apresentou TR de 2,3 min. nas condições cromatográficas do método B, e foi detectado até 30 minutos após o início de todas as reações realizadas. O log P calculado para este composto foi de -0,82.

**Tabela 14 - Tempos de retenção (TR) nas análises por CLAE-DAD dos derivados obtidos nas reações de esterificação do ATA com diferentes álcoois e respectivos valores de log P calculados. Condições cromatográficas: vide parte experimental (método B e gradiente exploratório, item 4.4.2.2).**

Álcool	Monoésteres		Diésteres		Triéster	
	TR (min)	Log P	TR (min)	Log P	TR (min)	Log P
etanol	6,067		13,450			
(Método B)	7,767	-0,22	13,993	0,38	21,517	0,98
	8,217		14,283			
<i>n</i> -butanol	11,40		22,867			
(Método B)	13,133	0,68	23,333	2,19	33,583	3,69
	13,833		23,800			
<i>n</i> -octanol	22,117		37,100			
(Método B)	22,333	2,35	37,533	5,33	-	8,7
	23,000		38,367			
<i>n</i> -octanol	27,683		50,636			
(Perfil exploratório)	29,567	2,35	51,000	5,33	66,967	8,7
	30,500		52,200			

**Nota:** ATA, TR = 2,3 min; log P = -0,82.

Conforme esperado, a polaridade dos ésteres obtidos diminuiu em função do aumento da cadeia alifática do álcool precursor e do número de carboxilas esterificadas. Observa-se uma relação diretamente proporcional entre o aumento dos valores de TR e do coeficiente de partição (log P); dessa forma, o triéster dos derivados octílicos não eluiu nas condições cromatográficas do método B e por isto foi empregado o gradiente exploratório para sua análise.

Como abordado anteriormente, as propriedades físico-químicas dos fármacos influenciam diretamente o perfil farmacocinético. Neste sentido, a polaridade exerce um papel de destaque, uma vez que ela tem relação direta com a lipofilia e, dessa forma, influencia a absorção e distribuição dos fármacos. Para que uma substância seja absorvida e distribuída, ela deve ser capaz de transpor barreiras biológicas em diferentes compartimentos do organismo, em especial as membranas. Para tanto, estas moléculas devem apresentar tamanho, grau de ionização e polaridade adequados. Além disso, a lipofilia de uma molécula determina a extensão e a velocidade da etapa farmacocinética (absorção, distribuição, biotransformação e excreção), bem como da etapa farmacodinâmica (interação entre a substância e o

sítio receptor, gerando uma resposta biológica de caráter agonista ou antagonista). Uma forma de avaliar a lipofilia da molécula é a determinação do seu coeficiente de partição ( $\log P$ ). Este é definido como a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância dissolvida em um sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado com a mudança de energia livre provocada pela substância em equilíbrio termodinâmico com o sistema (LIPINSK et al., 1997).

O coeficiente de partição pode ser determinado diretamente pelo método experimental do *shake flask* ou por métodos indiretos como os cromatográficos e computacionais. A desvantagem do método direto é a necessidade de alto grau de pureza da substância analisada, o que pode ser contornado com os métodos indiretos. O fator limitante dos métodos indiretos consiste na ineficácia para distinguir valores para isômeros, como observado no presente estudo. Este fator é comum de se observar, uma vez que programas computacionais partem de uma simplificação molecular, sem considerar fatores como a estereoquímica da molécula e a disposição das ligações entre os átomos da molécula (CLEMENTE, 2011).

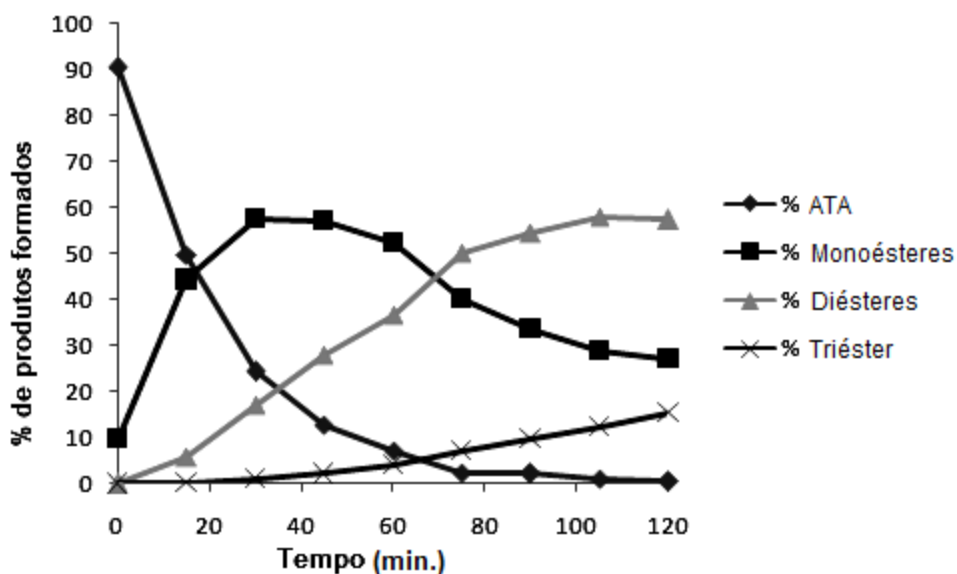
Apesar dos isômeros apresentarem os mesmo valores calculados de  $\log P$ , foi possível verificar tempos de retenção diferentes para eles, indicando que a polaridade é influenciada pelo sítio de esterificação da molécula, o que provavelmente deve influenciar o valor experimental do  $\log P$ .

O estudo cinético das reações de esterificação do ATA também compreendeu a determinação do percentual de derivados formados (mono, di e triésteres) nos diferentes intervalos de tempos avaliados. As determinações foram realizadas por normalização das áreas dos picos, sendo expressas em termos percentuais, e os resultados estão dispostos nas tabelas 15-17 e representados graficamente nas figuras 29-31. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 15 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com EtOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD.**

Composição da mistura reacional do ATA com etanol (% $\pm$ DPR)				
Tempo (min)	ATA	Monoésteres	Diésteres	Triéster
0	90,4 $\pm$ 9,1	9,6 $\pm$ 1,9	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
15	49,7 $\pm$ 3,2	44,4 $\pm$ 4,1	5,8 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0
30	24,4 $\pm$ 3,0	57,5 $\pm$ 6,2	17,2 $\pm$ 2,4	0,9 $\pm$ 0,1
45	12,7 $\pm$ 2,5	57,2 $\pm$ 6,5	27,9 $\pm$ 3,6	2,2 $\pm$ 0,8
60	7,0 $\pm$ 1,8	52,4 $\pm$ 5,9	36,6 $\pm$ 4,1	4,0 $\pm$ 0,9
75	2,4 $\pm$ 0,7	40,3 $\pm$ 5,3	50,3 $\pm$ 5,3	7,0 $\pm$ 1,5
90	2,1 $\pm$ 0,4	33,8 $\pm$ 4,7	54,5 $\pm$ 5,2	9,6 $\pm$ 1,7
105	1,0 $\pm$ 0,3	28,7 $\pm$ 3,1	57,9 $\pm$ 6,1	12,3 $\pm$ 2,0
120	0,4 $\pm$ 0,2	27,0 $\pm$ 2,9	57,4 $\pm$ 5,7	15,3 $\pm$ 2,1

**Figura 29 - Cinética da reação de esterificação do ATA com EtOH.**

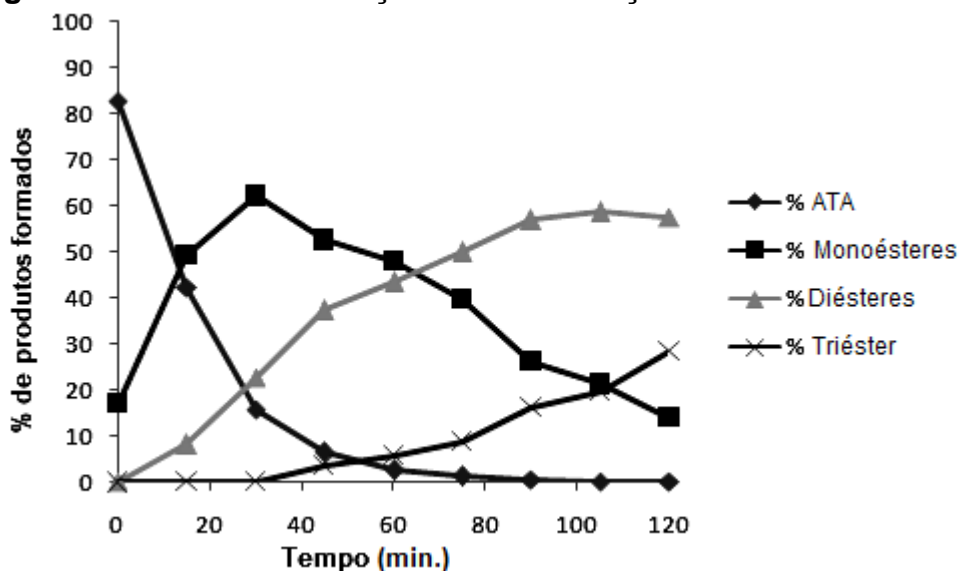




**Tabela 16 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com ButOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD.**

Composição da mistura reacional do ATA com butanol (% $\pm$ DPR)				
Tempo (min)	ATA	Monoésteres	Diésteres	Triéster
0	82,9 $\pm$ 8,8	17,0 $\pm$ 2,2	0,08 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0
15	42,4 $\pm$ 5,1	49,4 $\pm$ 5,6	8,18 $\pm$ 1,7	0,02 $\pm$ 0
30	15,7 $\pm$ 2,6	62,1 $\pm$ 6,1	22,8 $\pm$ 2,9	0,05 $\pm$ 0
45	6,5 $\pm$ 1,9	52,5 $\pm$ 5,5	37,3 $\pm$ 3,1	3,6 $\pm$ 0,4
60	2,5 $\pm$ 0,7	48,1 $\pm$ 4,2	43,4 $\pm$ 3,3	5,9 $\pm$ 0,7
75	1,3 $\pm$ 0,4	39,8 $\pm$ 3,0	49,9 $\pm$ 5,1	8,9 $\pm$ 1,2
90	0,6 $\pm$ 0,0	26,2 $\pm$ 2,7	56,9 $\pm$ 5,2	16,3 $\pm$ 2,3
105	0,3 $\pm$ 0,0	21,2 $\pm$ 2,5	58,7 $\pm$ 4,9	19,7 $\pm$ 2,8
120	0,1 $\pm$ 0,0	13,9 $\pm$ 1,8	57,7 $\pm$ 5,1	28,3 $\pm$ 3,3

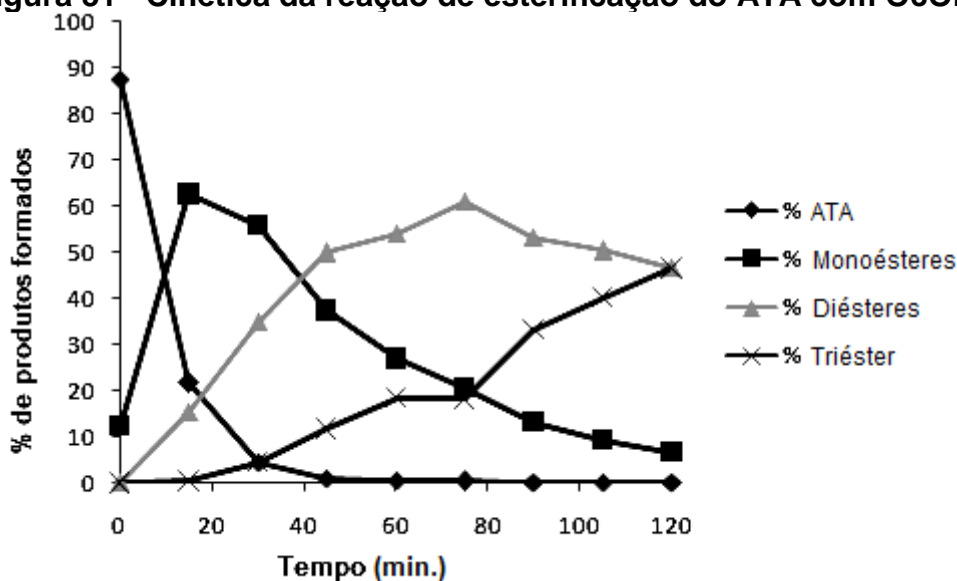
**Figura 30 - Cinética da reação de esterificação do ATA com BuOH.**



**Tabela 17 - Composição percentual dos derivados formados na reação de esterificação do ATA com OcOH em função do tempo reacional, estimada por normalização das áreas dos picos dos cromatogramas de CLAE-DAD.**

Composição da mistura reacional do ATA com octanol (% ± DPR)				
Tempo (min)	ATA	Monoésteres	Diésteres	Triéster
0	87,5 ± 6,6	12,4 ± 1,7	0,1 ± 0,0	0 ± 0,0
15	21,7 ± 3,1	62,6 ± 5,5	15,3 ± 2,0	0,3 ± 0,0
30	4,5 ± 0,2	55,8 ± 5,4	35,1 ± 2,9	4,6 ± 0,2
45	1,0 ± 0,0	37,3 ± 3,0	49,9 ± 5,3	11,7 ± 0,9
60	0,47 ± 0,0	26,9 ± 3,0	54,1 ± 5,2	18,5 ± 1,9
75	0,4 ± 0,0	20,5 ± 2,5	60,9 ± 5,5	18,2 ± 2,3
90	0,3 ± 0,0	13,3 ± 1,9	53,3 ± 5,1	33,1 ± 4,7
105	0,2 ± 0,0	9,2 ± 1,2	50,4 ± 5,2	40,1 ± 5,1
120	0,1 ± 0,0	6,6 ± 1,0	46,7 ± 4,9	46,4 ± 5,5

**Figura 31 - Cinética da reação de esterificação do ATA com OcOH.**



Cerca de 10 a 20% do material de partida (ATA) é convertido em monoésteres imediatamente após a adição do catalisador ( $H_2SO_4$ ). Na sequência, observa-se a formação gradativa dos monoésteres até os primeiros 30 minutos da reação com etanol e *n*-butanol, e em tempo inferior para reação com *n*-octanol (15 minutos). Decorrido este tempo, observou-se um decréscimo na formação dos monoésteres, enquanto a formação dos diésteres foi crescente até o tempo final da reação com etanol. Observou-se um decréscimo no percentual de diésteres na

reação com OcOH e aumento gradativo do teor de triésteres a partir de 75 minutos de reação, o que sugere a conversão de diésteres em triéster octílicos.

A formação do triéster aconteceu de forma gradativa, representando 15,3% da reação com etanol, 28,3% com *n*-butanol e 46,5% com *n*-octanol ao final das 2 horas de reação. Estes dados corroboram os dados obtidos na análise por CCD (Figura 25) e sugerem que quanto maior a cadeia alifática do álcool, mais favorecida termodinamicamente é a reação em função da formação do produto. É provável que este equilíbrio termodinâmico dificulte a hidrólise dos produtos formados, retornando ao material de partida.

Piang-Siong et al. (2012) avaliaram a cinética reacional da síntese de ésteres do ATA com álcool isoamílico (C5) e álcool dodecílico (C12) utilizando diferentes agentes catalíticos, entre eles H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,7%) por 540 minutos na temperatura de 100°C. Os autores relatam diferentes proporções molares de ATA/álcool (1:3 para o álcool dodecílico e 1:6 para o álcool isoamílico), e verificaram que, ao final das reações, 91% do ATA havia se convertido em triéster isoamílico frente a 96% de conversão para o triéster dodecílico. Isso indica que o maior tamanho da cadeia do álcool influencia a conversão de forma positiva, uma vez que mesmo com a metade da relação molar no meio reacional em comparação ao álcool isoamílico, o rendimento da reação com álcool dodecílico foi maior.

Este dado da literatura corrobora os resultados do presente estudo, uma vez que ao final das reações, a maior conversão de ATA em triésteres foi observada para os derivados *n*-octílicos (aproximadamente 46%), seguida pelos derivados *n*-butílicos (aproximadamente 28%) e pelos derivados etílicos (aproximadamente 15%). É factível supor que a menor conversão de ATA em triésteres no presente estudo, em comparação ao supracitado, se deva às diferenças na temperatura reacional (75°C vs 100°C) e no tempo reacional (120 min vs 540 min).

O fato do ATA ser uma molécula de baixa massa molecular, com três grupos carboxila, contribui positivamente para a reatividade. É sabido que o tamanho da cadeia lateral de ácidos carboxílicos influencia a cinética reacional: a esterificação de Fisher é mais efetiva quando se usa ácido acético (C2) frente ao ácido caprílico (C14), ou até mesmo o butírico (C8) com metanol (LIU, LOTERO & GOODWIN, 2006).

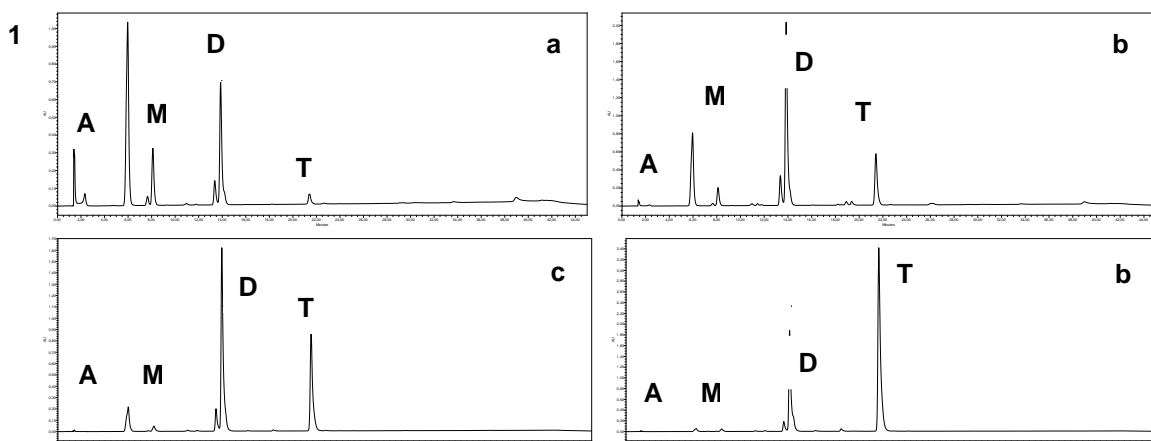
No presente trabalho utilizou-se excesso de álcool no meio reacional. Há relatos na literatura enfatizando a importância desta prática: Liu, Lotero & Goodwin

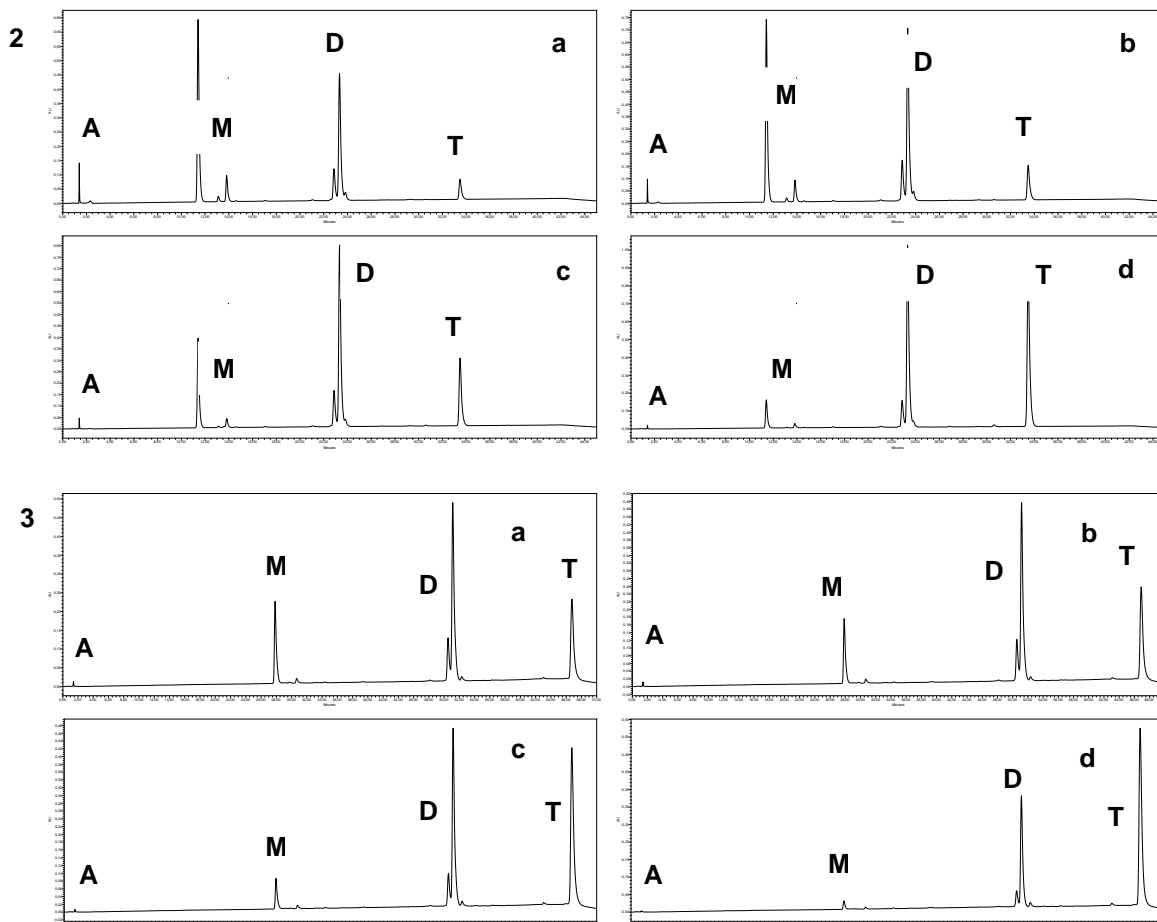
(2005) avaliaram o efeito da adição de água em reações de esterificação de Fisher entre ácido acético e metanol a 60°C. Os autores verificaram que a adição de água (2,6 M) diminuiu a eficiência catalítica em aproximadamente 90%, e atribuíram o fato ao aumento da energia de ativação. Como exposto anteriormente, reações de esterificação geram como produtos o éster e água; dessa forma, a adição de excesso de álcool no meio reacional desloca o equilíbrio para formação dos produtos, reduzindo as reações de hidrólise. Além disso, os autores propõem que a menor conversão do ácido em éster se deva à maior solvatação do metanol em presença de água. Este efeito poderia explicar porque reações entre o ATA e álcoois de maior cadeia carbônica (*n*-octanol) apresentaram melhor equilíbrio termodinâmico no presente estudo, pois cadeias longas conferem maior hidrofobicidade, com conseqüente redução da solvatação, quando comparado aos álcoois de menor cadeia.

#### 5.4.2 Efeito da temperatura nas reações de esterificação

A fim de otimizar as condições experimentais de esterificação do ATA, avaliou-se o efeito da temperatura na formação dos derivados. Os cromatogramas de CLAE-DAD representados na Figuras 32 foram obtidos para os produtos formados nas temperaturas de 65, 75, 85 e 95°C para os derivados etílicos, *n*-butílicos e *n*-octílicos, no tempo de 120 minutos.

**Figura 32 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para os produtos da esterificação do ATA com EtOH (1), BuOH (2) e OcOH (3) em diferentes temperaturas, no tempo de 120 minutos.**





**Nota:** Temperaturas avaliadas: **a:** 65°C; **b:** 75°C; **c:** 85°C; **d:** 95°C. Condições cromatográficas: vide parte experimental (método B para **1** e **2**, e gradiente exploratório para **3**, item 4.4.2.2) **ATA:** ácido *trans*-aconítico; **M:** região de eluição dos monoésteres no cromatograma; **D:** região de eluição dos diésteres no cromatograma; **T:** Triéster.

A análise dos cromatogramas indica que a velocidade da reação é dependente da temperatura empregada, ocorrendo maior formação de produtos com o aumento da temperatura. O aumento da temperatura de 65 °C para 85 ou 95 °C incrementa significativamente a formação dos produtos na reação com etanol, quando comparada às reações com *n*-butanol e *n*-octanol, sendo que a 95°C quase não se observa os picos referentes aos monoésteres no cromatograma. As análises de cinética (item 5.4.1) indicam que a reação com etanol é menos favorecida termodinamicamente que as reações com *n*-butanol e *n*-octanol. Durante a reação com etanol, observou-se diminuição do meio reacional nas temperaturas de 85 e 95°. Tendo em vista a temperatura de ebulição do etanol (78,5°C), é provável que a diminuição da concentração desse álcool no meio aumente a proporção do

catalisador ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), favorecendo a formação de triésteres e diésteres de forma mais expressiva nesta reação, em comparação com as demais.

Kolah et al. (2007) avaliaram a cinética da reação entre o ácido cítrico e etanol. Os autores utilizaram como catalisador resina de troca iônica Amberlisty 15, na concentração de 1 a 5%, e avaliaram temperaturas no intervalo entre 78 e 120°C. Para concentração do catalisador de 5%, o aumento gradativo da temperatura aumentou a conversão de ácido cítrico em mono e diésteres; porém, os autores não discutiram se este incremento estaria relacionado somente à temperatura ou a alterações no volume de meio reacional ao final da reação.

Piang-Siong et al. (2012) avaliaram o rendimento da esterificação de ATA com álcool isoamílico em temperaturas de 85 a 120°C (relação molar 1:6; 2,7% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 540 minutos) e constataram que o aumento da temperatura não influenciou significativamente a velocidade da reação no intervalo avaliado, mas favoreceu a formação do triéster. É possível verificar na figura 32 a influência positiva da temperatura na formação dos diferentes triésteres, e negativa para os monoésteres e diésteres.

Ao constatarem a interferência negativa da água na cinética de esterificação do ácido acético com metanol, Liu, Lotero & Goodwin (2005) avaliaram se este efeito era dependente da temperatura. Os autores não observaram diferenças na cinética reacional a 40°C e 60°C e concluíram que a temperatura não afeta as reações de hidrólise de ésteres em presença de água. Como no presente estudo a temperatura influenciou positivamente a formação dos ésteres, é factível supor que o aumento da temperatura também não favoreceu as reações de hidrólise.

Concluindo, o presente estudo mostrou que o aumento da cadeia hidrocarbônica do álcool utilizado incrementou a cinética da reação, seja por efeitos de solvatação ou por estabilidade termodinâmica. Efeito semelhante foi observado para a temperatura; porém, temperaturas superiores ao ponto de ebulição do etanol reduziram o volume do meio reacional e aumentaram as concentrações do catalisador. Esta variação provocou aceleração da reação e maior formação do triéster. Como o objetivo do presente estudo era obter massa de todos os ésteres, requerida para ensaios biológicos posteriores, e a temperatura de 75°C mostrou-se adequada para todos os álcoois utilizados, adotou-se como parâmetro esta temperatura para as sucessivas reações.

### 5.4.3 Purificação dos ésteres sintetizados

Inicialmente não se conhecia o perfil de eluição dos ésteres; portanto, a otimização das condições de eluição foi realizada com o produto final da reação com etanol. As reações foram elaboradas por partição entre solventes imiscíveis: o conteúdo final da reação foi seco em evaporador rotatório, solubilizado em água e transferido para funil de separação, prosseguindo-se à extração com *n*-hexano, seguido de diclorometano e acetato de etila. Esta partição inicial permitiu verificar a migração preferencial de cada classe de éster para estes solventes: triéster para *n*-hexano, diésteres para diclorometano e monoéster para acetato de etila. Porém, em nenhuma das frações foram obtidos os produtos com pureza suficiente. Quando se tentou transpor essa separação para os ésteres *n*-butílicos e *n*-octílicos, não se conseguiu concentrar o meio reacional até resíduo devido ao alto ponto de ebulição dos álcoois, além da intensa formação de emulsão.

Outra tentativa de purificação consistiu em verter o conteúdo reacional diretamente para uma coluna de sílica gel e proceder à eluição com fase móvel apropriada. Porém, todas as frações eram constituídas de misturas dos diferentes ésteres. A alternativa seguinte para a purificação foi incorporar o produto reacional em sílica e aquecer esta mistura até remoção do solvente residual para posterior purificação em coluna de sílica gel. A eluição inicial se deu com um gradiente suave de *n*-hexano e acetato de etila, com aumento gradual de 5% na proporção do último. Esta abordagem se mostrou eficaz para eluir o triéster, os diésteres e parte dos monoésteres; a retirada dos monoésteres residuais foi realizada com eluição em gradiente de acetato de etila e metanol. Tendo em vista que esta purificação consumiu grande volume de solventes, gerou um número elevado de frações (aproximadamente 460), e consumiu um tempo longo para execução (aproximadamente 20 dias), as condições cromatográficas foram otimizadas até resultar na condição de eluição descrita na parte experimental (item 4.7.5).

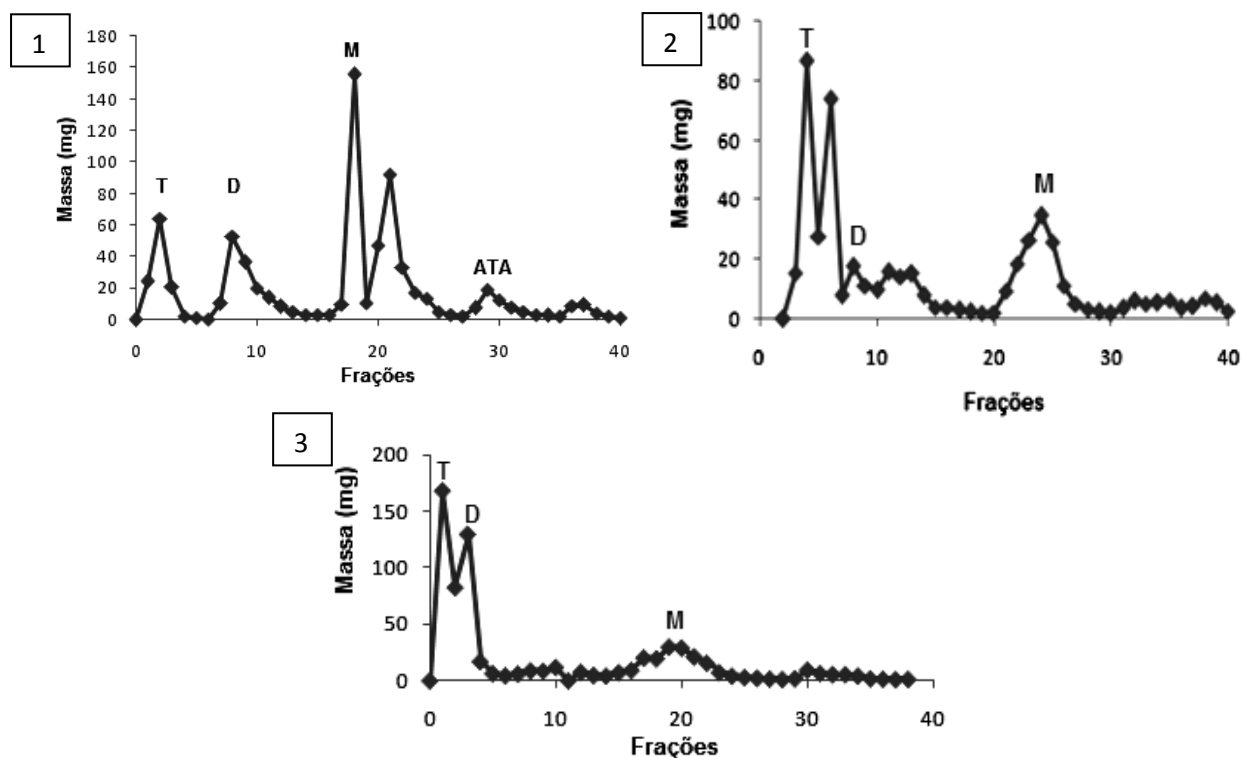
A condição de eluição estabelecida para a reação com etanol foi testada para as outras reações e verificou-se que a mesma possibilitou isolar os derivados mono, di e triesterificados, bem como misturas dos mesmos. A título de exemplo, a tabela 18 e a figura 33 ilustram o perfil de eluição dos produtos das reações com etanol, *n*-butanol e *n*-octanol utilizando a série eluotrópica otimizada, bem como a identificação das classes e das misturas supracitadas.

**Tabela 18 - Frações recolhidas, respectivas massas e derivados obtidos, caracterizados com base nos valores de Rf por CCD de sílica gel, e rendimento das classes de ésteres isoladas. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.7.5).**

Derivados etílicos				Derivados butílicos				Derivados octílicos			
Fração	Massa	Classe	R(%)	Fração	Massa	Classe	R(%)	Fração	Massa	Classe	R(%)
1-7	112,1	T	30,2	1-4	102	T	20,7	1-3	167,7	T	22,9
8	0,4	T+D	-	5-7	101,5	T+D	-	4-5	211,6	T+D	
9-13	142,1	D	43,0	8-13	33,1	D	8,1	6-12	63,1	D	11,1
14-18	23,5	D+M	-	14-18	50,2	D+M	-	13-15	12,3	D+M	
19-24	35,6	M	12,2	19-23	28,4	M	8,9	16-26	167,0	M	37,7
25-26	2,1	M+A	-	24-26	60,4	M+A	-	27-42	49,4	-	
27-33	6,6	A	-	27-33	7,1	A	-				
34-42	0,9	-	-	34-42	8,6	-	-				
Total	323,3	-	85,4		391,3	-	37,7		671,1	-	71,7

**Nota:** T: Triéster; D: Diésteres; M: Monoésteres; A: Ácido *trans*-aconítico; Massa em mg; R: rendimento (%).

**Figura 33 - Cromatogramas obtidos para o fracionamento dos produtos de reação do ATA com etanol (1), *n*-butanol (2) e *n*-octanol (3) em coluna de sílica gel. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.7.5).**



**Nota:** T: Triéster; D: Diésteres; M: Monoésteres; ATA: Ácido *trans*-aconítico.



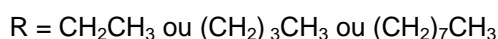
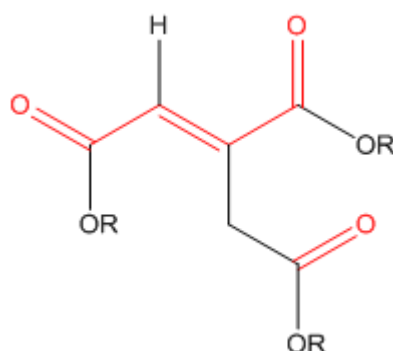
Com a utilização do gradiente eluotrópico estabelecido foi possível realizar a purificação dos mono, di e triésteres, obtendo rendimentos significativos para a reação com etanol (85,4%) e *n*-octanol (71,3%). O rendimento da reação com os diésteres *n*-butílicos foi menos significativa (37,7%); porém o gradiente permitiu a separação das classes com economia de tempo e solvente.

#### 5.4.4 Caracterização dos ésteres sintetizados

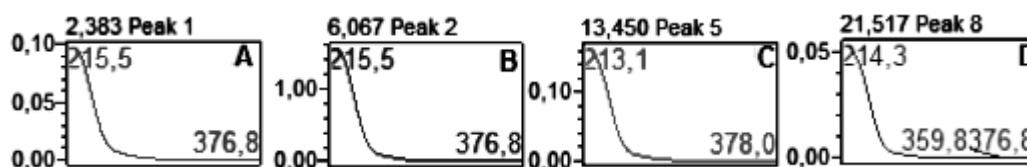
##### 5.4.4.1 Espectroscopia no ultravioleta (UV)

Todos os ésteres obtidos apresentaram  $\lambda_{\max}$  variando de 210 a 216 nm, indicando que todos os derivados apresentam o mesmo cromóforo (carbonila conjugada com olefina vicinal) representado na figura 34. A figura 35 apresenta, a título de exemplo, os espectros no UV obtidos *on line* pelo detector DAD para o ATA e seus ésteres etílicos.

**Figura 34 - Estruturas químicas dos ésteres etílicos, *n*-butílicos e *n*-octílicos do ATA. Em destaque (cor vermelha), o cromóforo responsável pela absorção das substâncias no UV.**



**Figura 35 - Espectros no ultravioleta registrados *on line* pelo detector DAD para o ATA e os ésteres etílicos obtidos.**

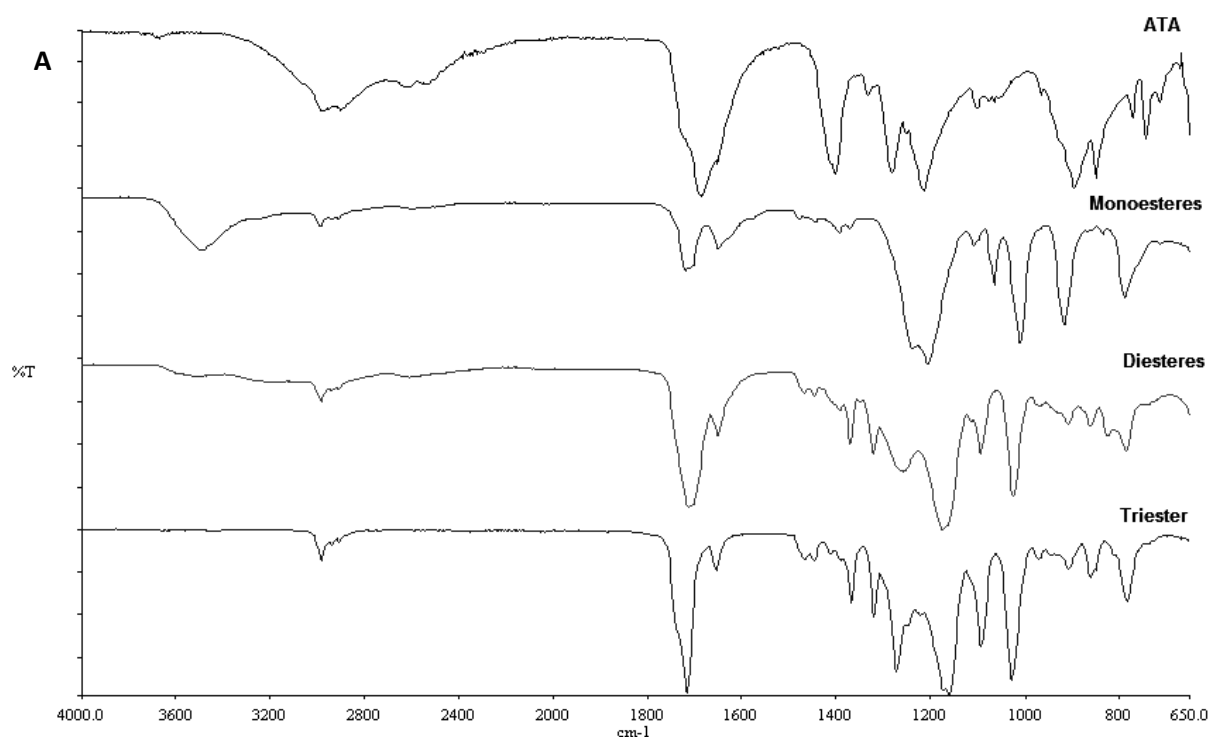


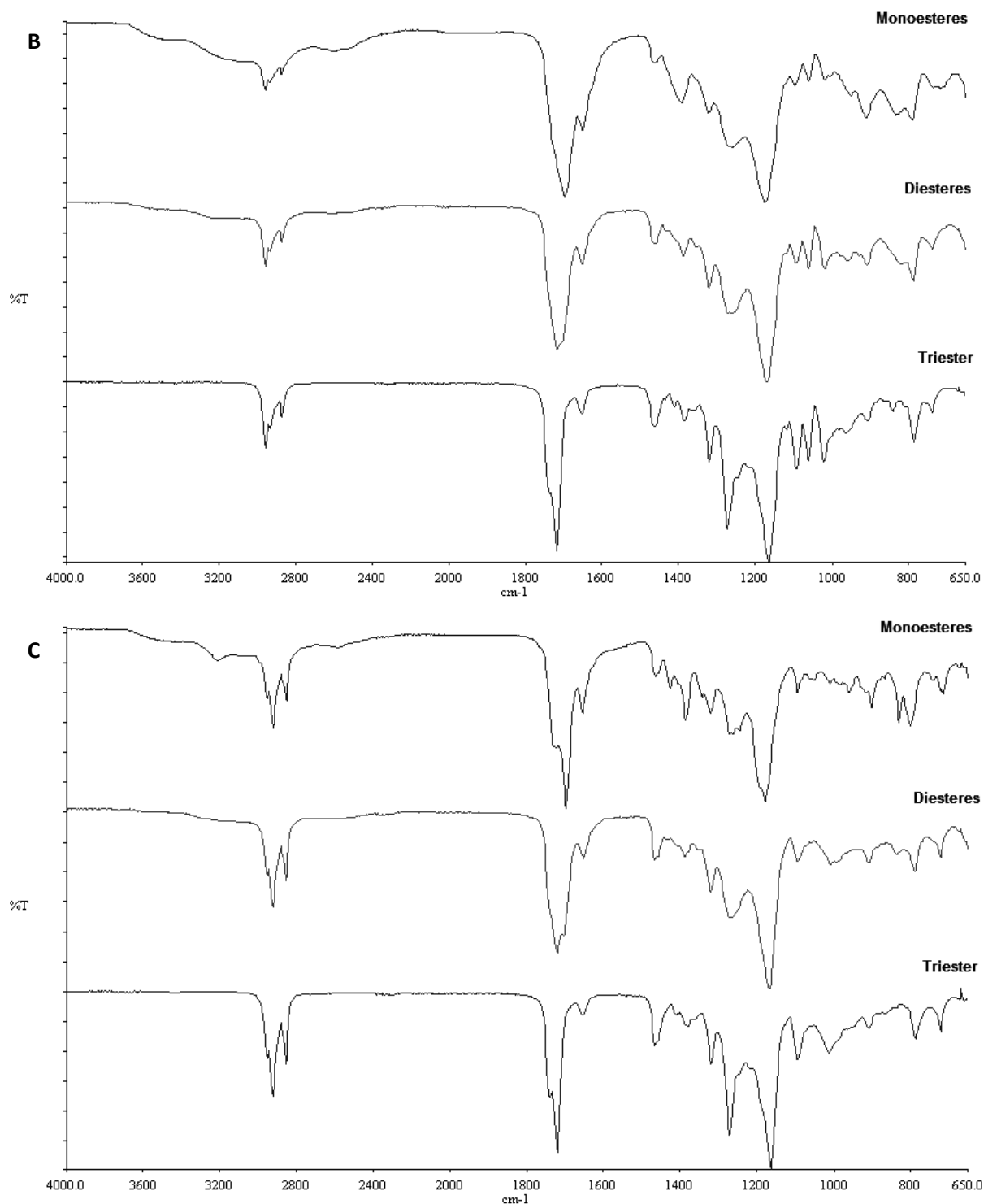
Nota: A: ATA; B: monoésteres; C: diésteres; D: triéster.

#### 5.4.4.2 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho foi feita por FTIR. Os espectros dos ésteres de ATA obtidos estão representados na figura 36 bem como o espectro do material de partida.

**Figura 36 - Espectros obtidos no IV-FTIR para o ATA e seus ésteres etílicos (A), *n*-butílicos (B) e *n*-octílicos (C).**





**Nota:** A: Ésteres etílicos; B: ésteres *n*-butílicos; C: ésteres *n*-octílicos.

O espectro no IV do ATA apresenta uma banda de absorção de baixa intensidade em aproximadamente  $3.610 \text{ cm}^{-1}$ , referente a estiramento de hidroxilas livres de monômeros de ácido carboxílico, bem como uma banda larga de estiramento O-H em associação dimérica, com máximo de absorção em  $2930 \text{ cm}^{-1}$ , parcialmente sobreposta às bandas de estiramento simétrico e assimétrico de C-H,

respectivamente em 2987 e 2820  $\text{cm}^{-1}$ . A banda intensa em 1687  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento C=O do grupo carboxila. A frequência de absorção desta banda ocorreu em valor um pouco inferior ao esperado, devido à conjugação da carbonila com a ligação dupla vizinha. Por sua vez, a banda em 1215  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento de ligação C-O de grupo carboxila.

Observa-se, nos espectros obtidos para os ésteres do ATA, o estreitamento da banda larga atribuída ao estiramento O-H (com máximo de absorção em aproximadamente 3000  $\text{cm}^{-1}$ ) de forma gradativa, de acordo com o número de carboxilas esterificadas nos monoésteres e diésteres, até desaparecer totalmente nos triésteres (Figuras 36 A). É possível observar, também, o aumento da intensidade da banda referente ao estiramento de carbonila de éster em 1715  $\text{cm}^{-1}$ , bem como a presença de bandas em 1270 e 1160  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento da ligação C-O-C de ésteres.

Oliveira et al. (2013) sintetizaram os aromatizantes artificiais propanoato de isobutila, acetato de isoamila e acetato de pentila via esterificação homogênea e heterogênea (uso de resinas ácidas). Os autores caracterizaram a formação dos produtos por FTIR, evidenciando principalmente as bandas de absorção próximas a 1740  $\text{cm}^{-1}$  e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento de carbonila de éster e estiramento da ligação C-O-C, respectivamente, como observado no presente estudo.

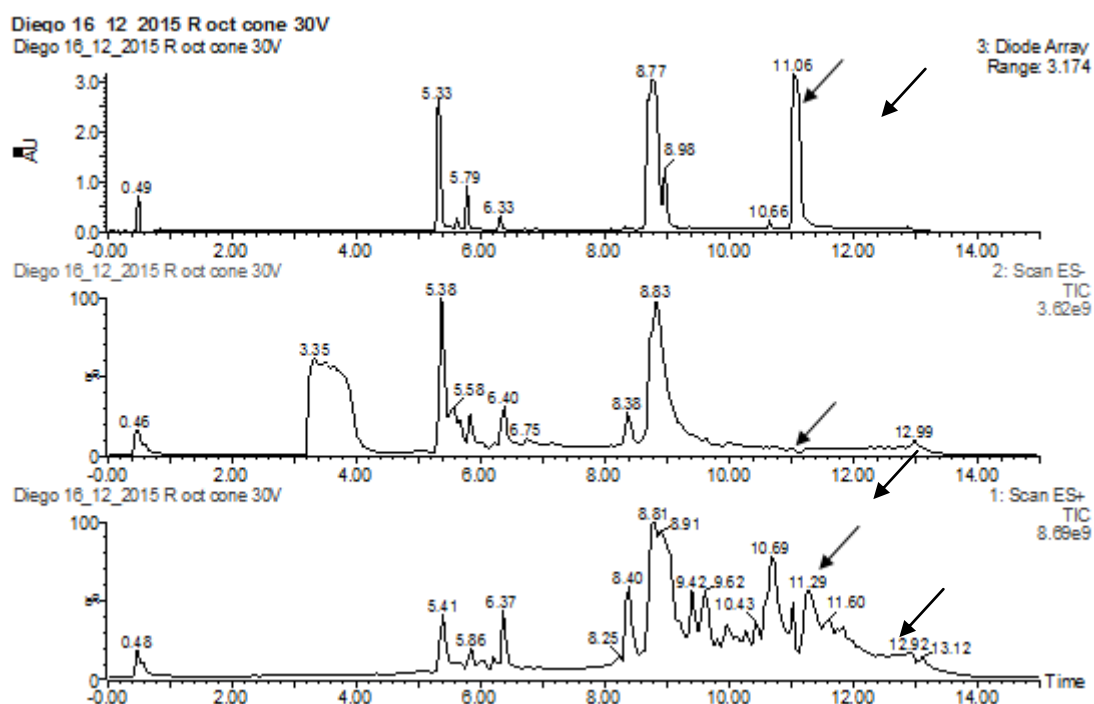
Berdeaux et al. (2012) descrevem que na degradação de ésteres metílicos do ácido oléico e do ácido linoléico observa-se a ocorrência de hidrólise dos grupos metílicos dos ésteres, gerando ácido carboxílico. Dentre as caracterizações que comprovaram a hidrólise descrita, os autores citam que, enquanto o éster apresenta uma banda em 1735  $\text{cm}^{-1}$ , após a degradação esta banda passa a ser observada em 1706  $\text{cm}^{-1}$ . Isso demonstra a importância da técnica para monitorar a modificação estrutural ocorrida na síntese dos derivados.

#### **5.4.4.3 Caracterização dos ésteres do ATA por UPLC-ESI-MS**

Inicialmente foram avaliadas diferentes condições de voltagem do cone e do capilar, a fim de selecionar a voltagem mais adequada para a formação de íons moleculares e que fornecesse um perfil de fragmentação adequado para a caracterização estrutural. Todas as análises foram realizadas com ionização por electrospray em modo de varredura.

A voltagem do cone foi avaliada no intervalo entre 20 e 70 V para todos os derivados *n*-octílicos, nos modos positivo e negativo de ionização. O triéster apresentou maior dificuldade para ionização, fato já esperado uma vez que esta substância não possui grupos facilmente ionizáveis, como as carboxilas livres presentes nos diésteres e monoésteres. A figura 37 apresenta o cromatograma total de íons (TIC) nos modos positivo (ESI<sup>+</sup>) e negativo (ESI<sup>-</sup>), bem como o cromatograma com detecção no DAD, extraído em 210 nm, para os produtos de esterificação do ATA com *n*-octanol.

**Figura 37 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com OcOH. Detecção no DAD em 210 nm; total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI<sup>-</sup>) e positivo (ESI<sup>+</sup>) de ionização. Condições de análise: vide parte experimental (item 4.7.6.1).**

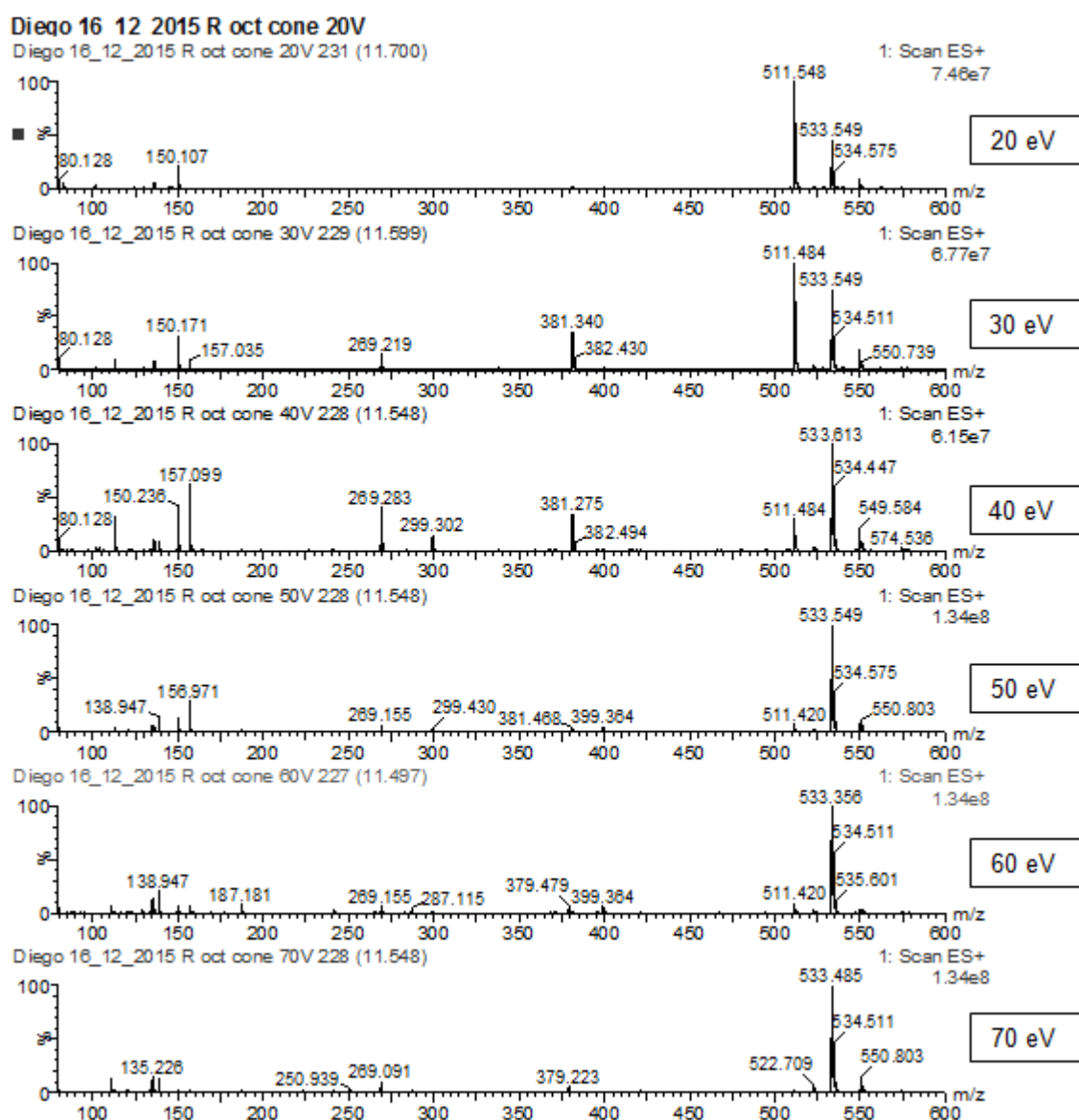


**Nota:** As setas indicam o pico correspondente ao triéster octílico.

Os cromatogramas de TIC indicam que a formação de picos correspondentes a íons do triéster (seta no TR 11,3 min) não foi favorecida no modo negativo de ionização, enquanto a ionização dos monoésteres (TR 5,3 min, 5,8 min e 6,3 min; Figura 37) foi favorecida em ambos os modos, fato também observado para os diésteres (TR 8,4 min, 8,8 min e 8,9 min; Figura 37). É provável que a ionização do triéster octílico no modo positivo se deva à formação de adultos estáveis em

especial ao adulto com sódio ( $m/z$  de 533), enquanto no modo negativo o sinal foi suprimido, indicando que estes não são estáveis nessa condição de ionização. Por esta razão, as análises com o triéster octílico foram realizadas no modo ESI<sup>+</sup>. A fragmentação do triéster octílico no modo positivo de ionização, em diferentes voltagens, está apresentada na figura 38.

**Figura 38 - Perfil de fragmentação do triéster octílico do ATA no modo positivo de ionização, nas diferentes voltagens avaliadas.**



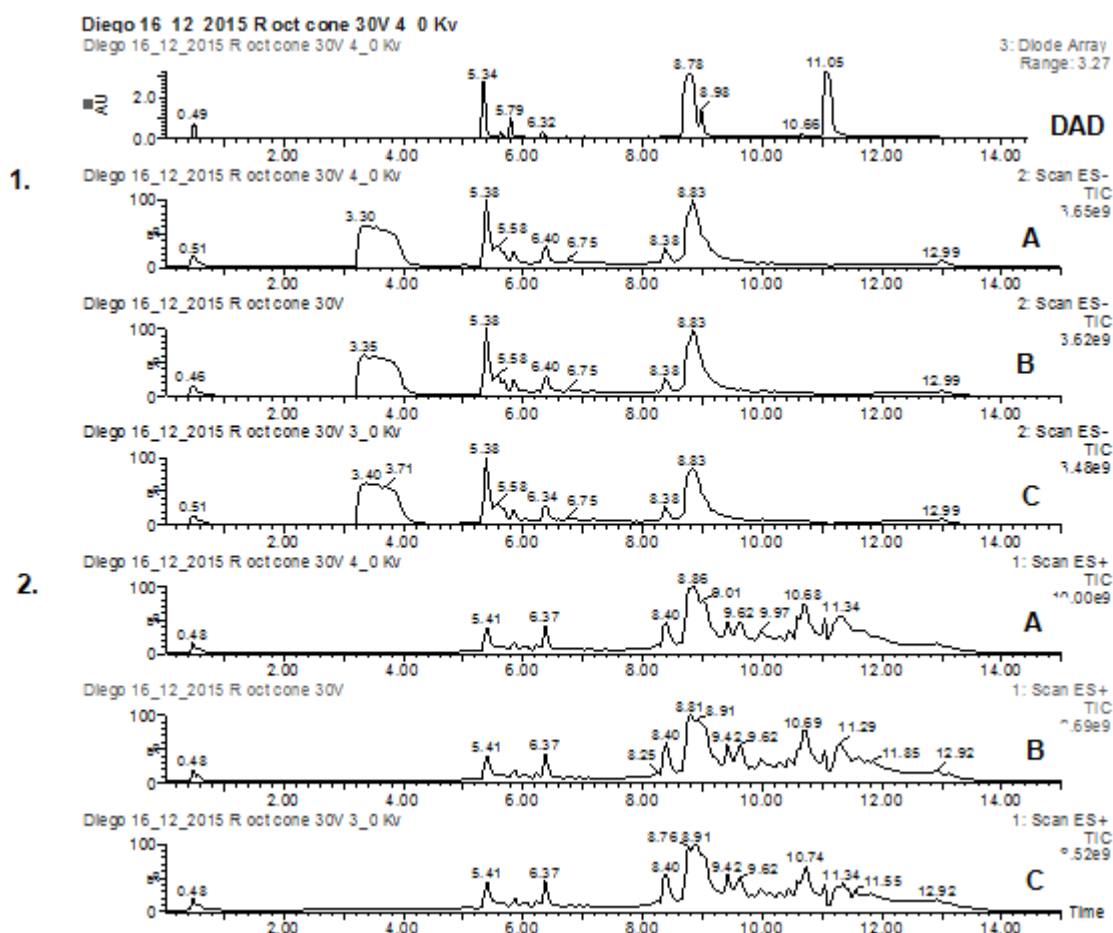
**Nota:** Voltagem do capilar 3,5 KV.

O triéster octílico possui massa molar de 510,76 U.M.A.; portanto, o pico do íon protonado deve aparecer em  $m/z$  511,76 U.M.A. [ $M+H^+$ ]. Um pico em  $m/z$  511,5

[M+H<sup>+</sup>] foi evidenciado nas menores voltagens avaliadas (20, 30 e 40V), enquanto em voltagens maiores foi possível visualizar o adulto com sódio em  $m/z$  533,5 U.M.A. [M+Na<sup>+</sup>]. Na voltagem de 30 V, o pico da molécula protonada e dos adultos com Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> apresentaram uma abundância relativa superior àquela das outras voltagens testadas, sendo esta definida como a voltagem de trabalho.

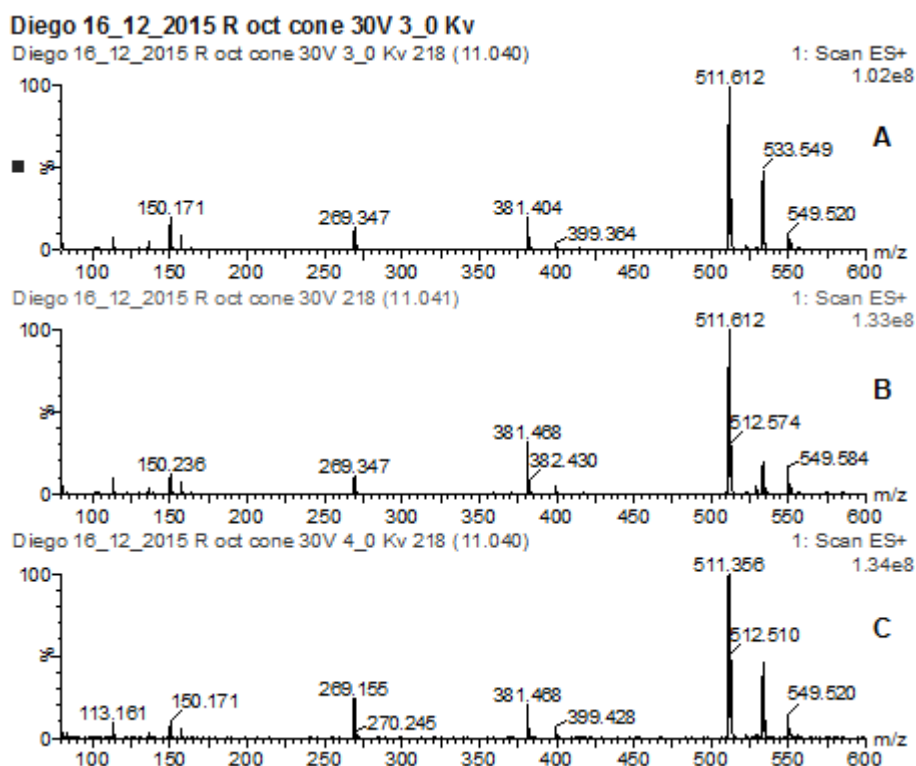
Na sequência, avaliou-se a influência da voltagem do capilar na geração e intensidade dos íons formados. A figura 39 apresenta o cromatograma TIC nos modos positivo e negativo de ionização para as voltagens avaliadas.

**Figura 39 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com OcOH. (DAD) Detecção no DAD em 210 nm; (1) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI<sup>-</sup>) e (2) positivo (ESI<sup>+</sup>) de ionização. Cromatogramas obtidos com diferentes voltagens de capilar: A: 4 Kv; B: 3,5 Kv; C: 3 Kv e no DAD. Condições de análise: vide parte experimental (item 4.7.6.1).**



A variação na voltagem do capilar não alterou significativamente a geração de sinais na faixa avaliada. Também não se observou diferença na geração de íons do triéster octílico (figura 40), sendo obtidos espectros de massas semelhantes nas diferentes voltagens. Tendo em vista que 3,5 kV representa o ponto médio das voltagens analisadas, e o fato de que esta voltagem ser utilizada em análises exploratórias, ela foi definida para as análises posteriores.

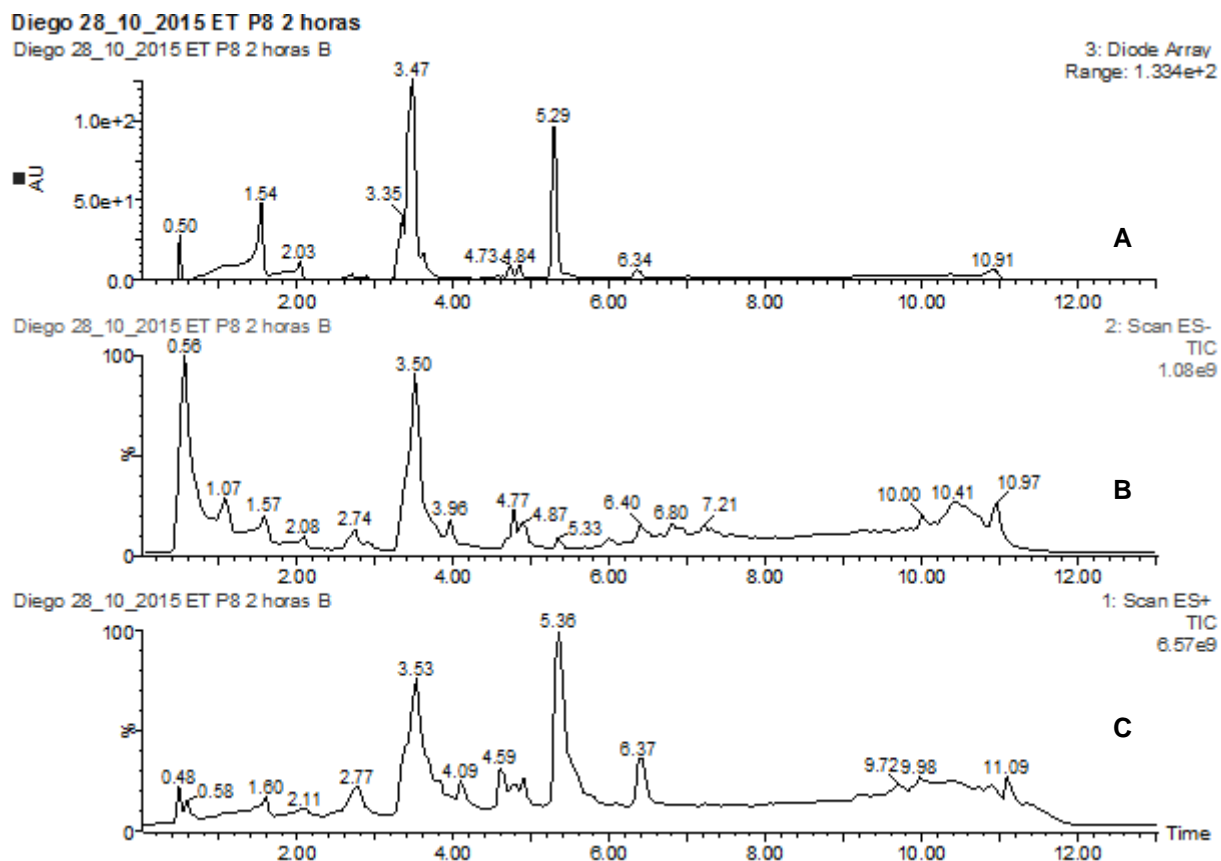
**Figura 40 - Perfil de fragmentação do triéster octílico do ATA no modo positivo de ionização, nas voltagens de cone de 3 (A), 3,5 (B) e 4 kV (C).**



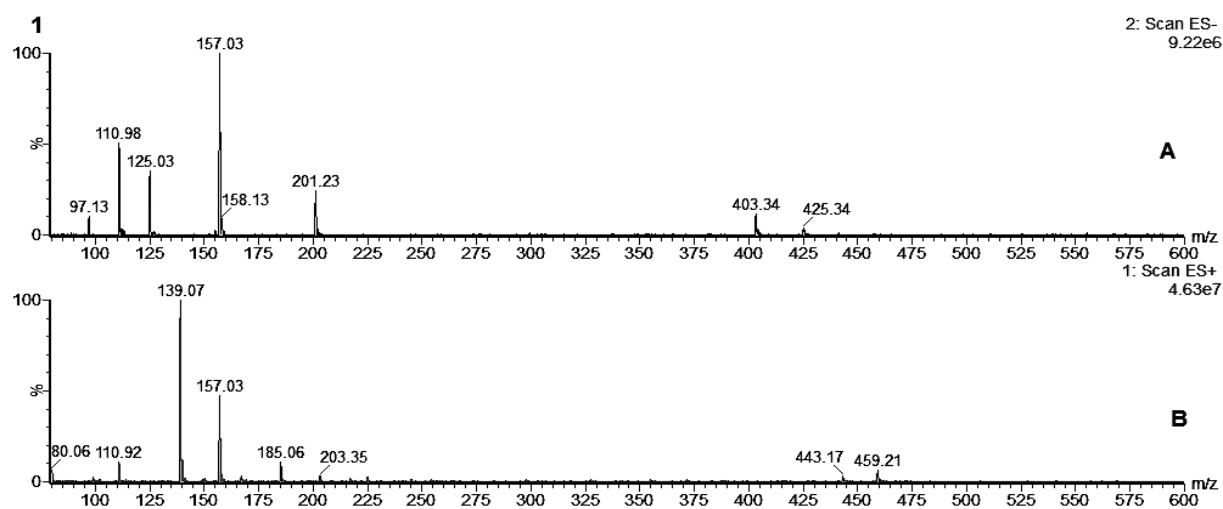
Com as condições de voltagem estabelecidas, foram realizadas análises no modo de varredura (TIC) para os derivados etílicos, *n*-butílicos e *n*-octílicos do ATA obtidos. Devido à similaridade estrutural desses ésteres, apresenta-se somente a caracterização dos derivados etílicos (figura 41). A partir dos cromatogramas de TIC foram extraídos os espectros no modo positivo e negativo para os monoésteres, diésteres e triésteres etílicos (figura 42). Os cromatogramas referentes aos derivados *n*-butílicos e *n*-octílicos encontram-se no apêndice 2.

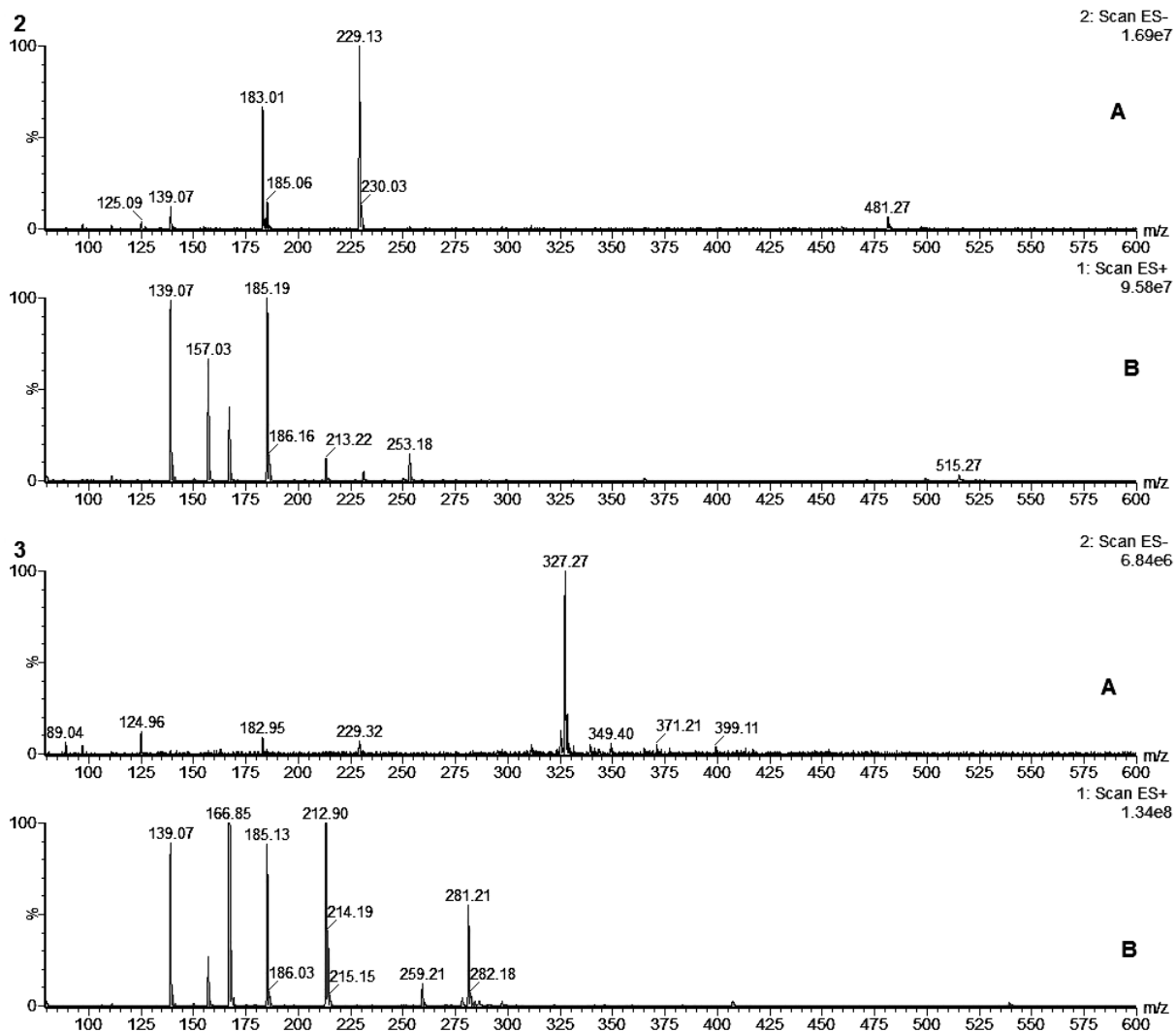


**Figura 41 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH. (A) Detecção no DAD em 210 nm; (B) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI<sup>-</sup>) e (C) positivo (ESI<sup>+</sup>) de ionização. Condições de análise: vide parte experimental (item 4.7.6.1).**



**Figura 42 - Perfis de fragmentação das análises de varredura para os produtos de esterificação do ATA com EtOH: monoésteres (1, TR: 1,54 min.), diésteres (2, TR: 3,47 min.) e triéster (3, TR: 5,29 min.) etílicos em modo negativo (A) e positivo (B) de ionização nas condições otimizadas.**





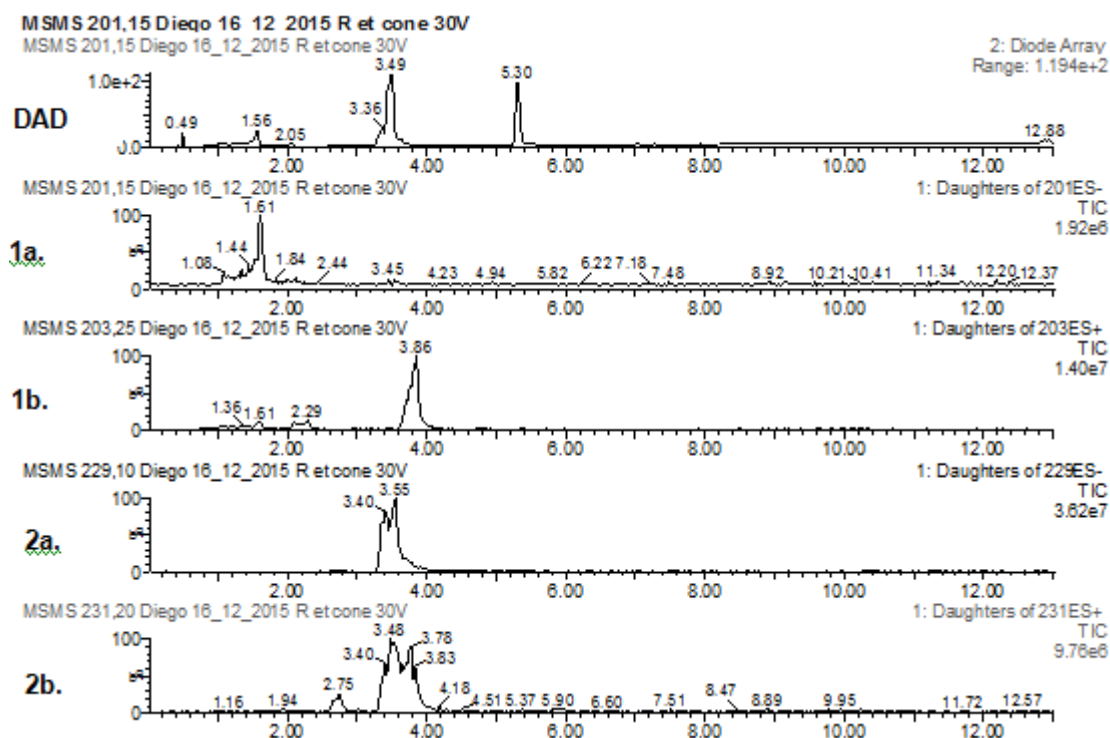
Nos espectros da figura 42 foi confirmada a formação dos íons correspondentes às moléculas protonadas  $[M+H]^+$  e desprotonadas  $[M-H]^-$  para cada éster, nos modos positivo e negativo, respectivamente. Na sequência, procedeu-se às análises de MS/MS. Os íons selecionados para as análises de cada derivado por MS/MS estão listados na tabela 19.

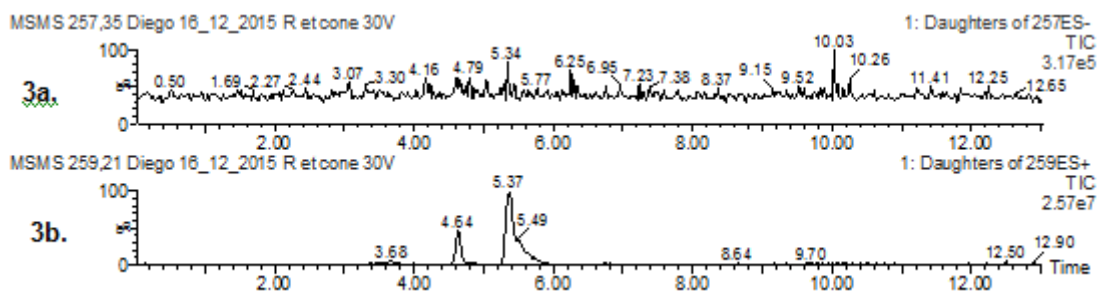
**Tabela 19 - Íons das moléculas protonadas e desprotonadas identificados nas análises dos ésteres etílicos, *n*-butílicos e *n*-octílicos do ATA por UPLC-ESI-MS no modo de varredura TIC, utilizados como íon precursor nas análises de MS/MS.**

Ésteres Analisados	Íons das moléculas protonadas e desprotonadas ( <i>m/z</i> )					
	Derivados etílicos		Derivados <i>n</i> -butílicos		Derivados <i>n</i> -octílicos	
	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>
Monoésteres	203,35	201,23	231,1	229,15	287,24	285,19
Diésteres	231,2	229,13	287,18	285,15	399,3	397,31
Triésteres	257,35	259,21	341,25	343,3	511,61	509,5

Os cromatogramas das análises de MS/MS dos derivados etílicos estão dispostos na figura 43.

**Figura 43 - Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS em experimentos de MS/MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH: 1: monoésteres, 2: diésteres, 3: triéster. (DAD) Detecção no DAD em 210 nm; (a) total de íons (TIC) registrados no modo negativo (ESI<sup>-</sup>) e (b) positivo (ESI<sup>+</sup>) de ionização. Condições de análise: vide parte experimental (item 4.7.6.1).**

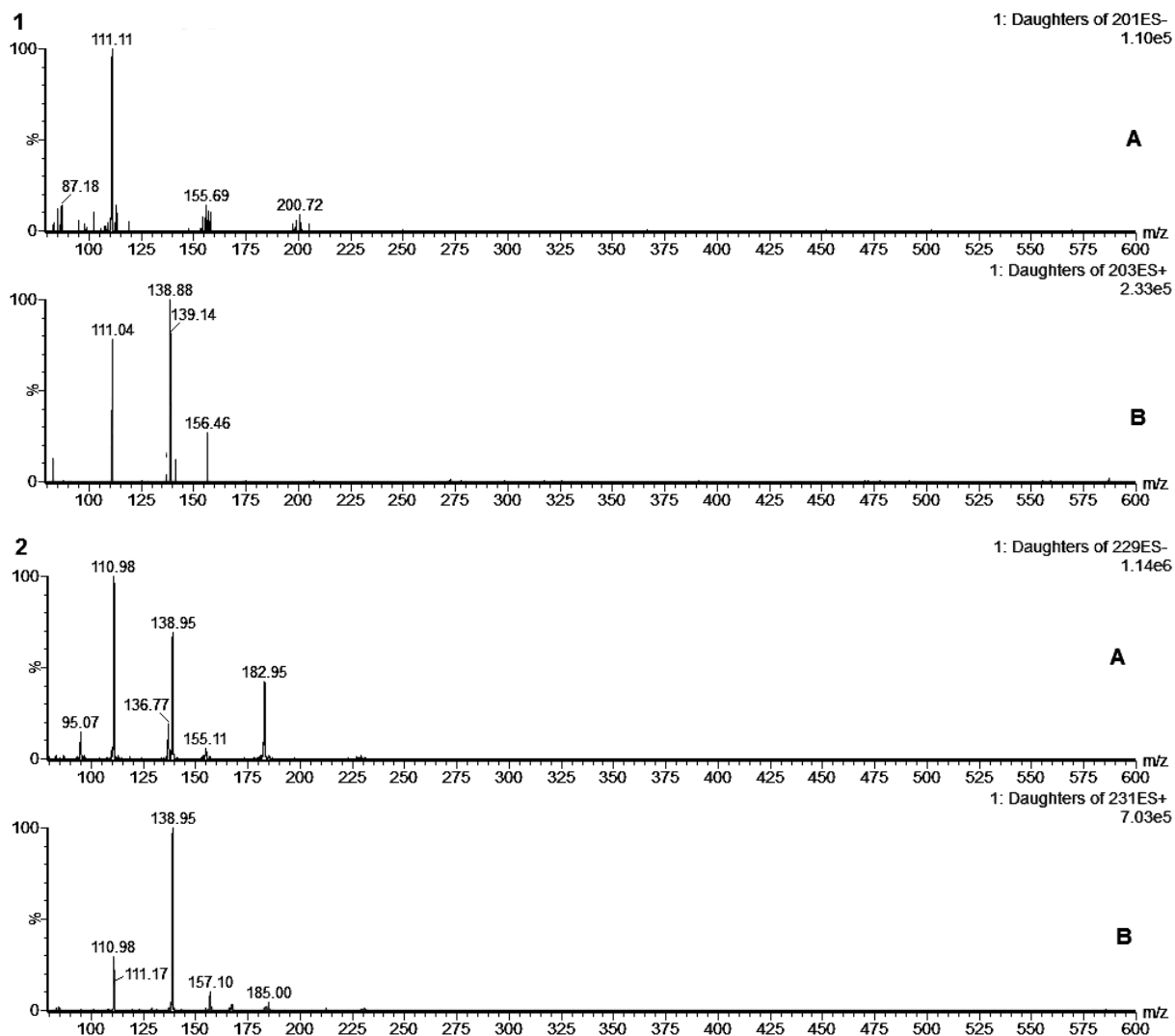


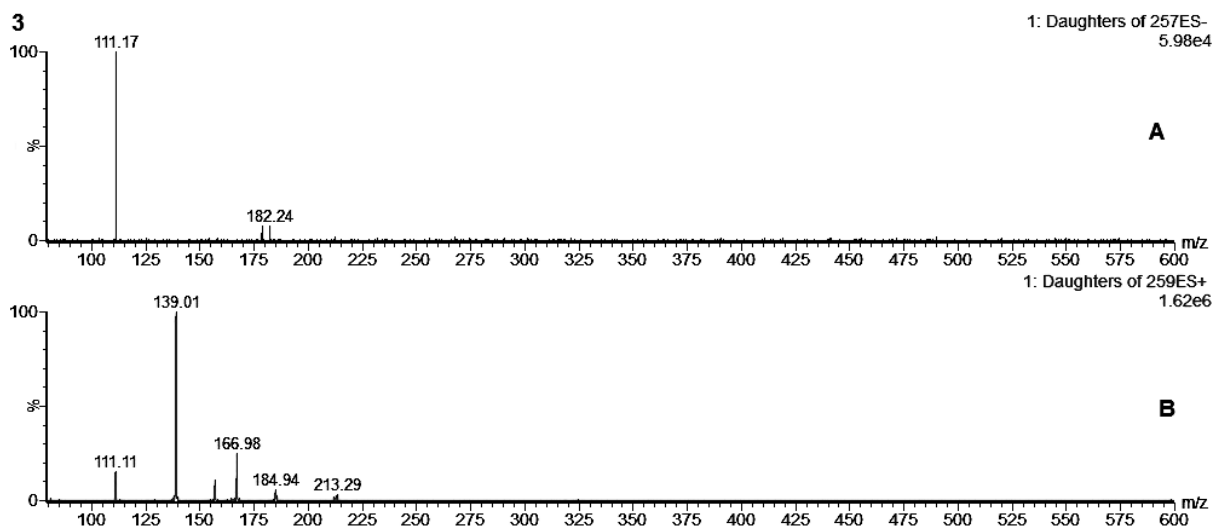


Os cromatogramas de MS/MS obtidos para os derivados etílicos indicam que o modo negativo foi mais adequado para a análise dos monoésteres, uma vez que aparecem em abundância picos com tempos de retenção relativos a essa classe. Já no modo positivo, mesmo tendo selecionado para análise a massa do monoéster protonado ( $m/z$ : 203), os picos mais abundantes têm tempo de retenção relativos aos diésteres. É provável que este fato ocorra em virtude da fragmentação dos diésteres, gerando picos com a mesma razão  $m/z$  que os monoésteres. Quanto aos diésteres, ambos os modos de ionização foram adequados para a seleção de picos com tempos de retenção referentes a esta classe. Já o triéster etílico comportou melhor no modo positivo, conforme relatado para o triéster octílico no início da otimização do método, descrita nesse item. Observa-se um pequeno pico no modo negativo com T.R. de 5,14 minutos, porém muito pouco pronunciado.

Na sequência das análises foram extraídos os espectros de MS/MS dos picos de cada classe de compostos sintetizados (monoésteres, diésteres e triéster), a fim de avaliar seu perfil de fragmentação. A Figura 44 apresenta os espectros obtidos.

**Figura 44 - Perfis de fragmentação das análises de MS/MS para os produtos de esterificação do ATA com EtOH: monoésteres (1), diésteres (2) e triéster (3) etílicos no modo negativo (A) e positivo (B) de ionização, nas condições otimizadas.**





A partir das análises de MS/MS, foram identificados os valores de razão  $m/z$  dos fragmentos derivados dos íons das moléculas protonadas ou desprotonadas, selecionados anteriormente para esta análise. A relação entre os íons selecionados e os fragmentos gerados por estes nas análises de MS/MS estão listados na tabela 20.

**Tabela 20 - Relação entre a razão  $m/z$  dos íons das moléculas protonadas ou desprotonadas identificados nas análises dos ésteres etílicos,  $n$ -butílicos e  $n$ -octílicos do ATA em modo de varredura (MS1) e os fragmentos gerados por estes nas análises de MS/MS por UPLC-ESI-MS nos modos positivo e negativo.**

Classes de ésteres	MS1 ( $m/z$ )		MS/MS ( $m/z$ )	
	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>
Monoésteres etílicos	203,20;	201,15	156,45; 138,88; 111,04	201,35; 197, 38; 155,68;
	225,28			
Diésteres etílicos	231,20;	229,10	185,01; 139,11; 110,98	183,14; 139,01. 111,10
	253,54			
Triéster etílico	259,21;	257,15	213,28; 185,19; 167,10;	211,36; 110,91
	281,21			
Monoésteres $n$ -butílicos	231,10;	229,15	157,03; 139,01; 110,98	182,56; 110,91
	253,19			
Diésteres $n$ -butílicos	287,18;	285,15	156,97; 139,01; 111,04	211,10; 166,91; 139,01;
	309,30			
Triéster $n$ -butílico	343,35;	341,25	156,07; 138,94	287,03; 211,04; 139,13
	365,30;			
	381,34			

continua

Classes de ésteres	MS1 ( <i>m/z</i> )		MS/MS ( <i>m/z</i> )	
	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>	ESI <sup>+</sup>	ESI <sup>-</sup>
Diésteres <i>n</i> -octílicos	399,30; 421,36	397,31	156,97; 128,94; 113,09	267,03; 223,10; 195,07; 179,03
Triéster <i>n</i> -octílico	511,61; 533,48; 550,41	509,50	268,57; 156,97; 139,07; 112,96	276,72; 266,97

Piang-Siong et al. (2012) caracterizaram a formação de mono e diésteres dos ácidos *trans* e *cis*-aconíticos com o álcool isoamílico a partir dos picos dos íons moleculares e da redução de polaridade dos derivados formados. No presente estudo, as informações sobre os produtos formados também foram obtidas a partir dos picos dos íons das moléculas protonadas e desprotonadas, bem como de seus adultos. No modo positivo, foram obtidos adultos com sódio [M+Na<sup>+</sup>] para todos os derivados e adultos com potássio [M+K<sup>+</sup>] para os triésteres *n*-butílicos e *n*-octílicos com razão *m/z* de 381,34 e 550,51 U.M.A., respectivamente. Já no modo negativo se observou a formação de íons das moléculas desprotonadas.

A fragmentação correspondente à perda de 45 U.M.A., comum em ésteres e observada para alguns derivados, atribuída à descarboxilação, não fornece informações conclusivas sobre a estrutura do produto.

Não há relatos na literatura da caracterização química dos compostos sintetizados no presente trabalho. O triéster etílico está disponível comercialmente, mas os ésteres *n*-butílicos e *n*-octílicos são compostos inéditos. A literatura relata, de forma sucinta, caracterizações de algumas estruturas correlatas como ésteres etílicos do ácido cítrico e ésteres dos isômeros do ácido aconítico com álcool metílico e isoamílico; porém, não há descrição do perfil de fragmentação por ESI-MS. A literatura registra a análise de diversos ésteres por LC-ESI-MS, especialmente derivados lipídicos, analisadas no modo negativo de ionização. Pulfer & Murphy (2003) relatam que no processo de fragmentação de fosfolipídios ocorre a quebra da unidade esterificada. Já Shackleton et al. (1997) descrevem que no éster presente na estrutura da testosterona, ocorre fragmentação do carbono alfa ao oxigênio esterificado, eliminando a cadeia hidrocarbonada lateral do éster.

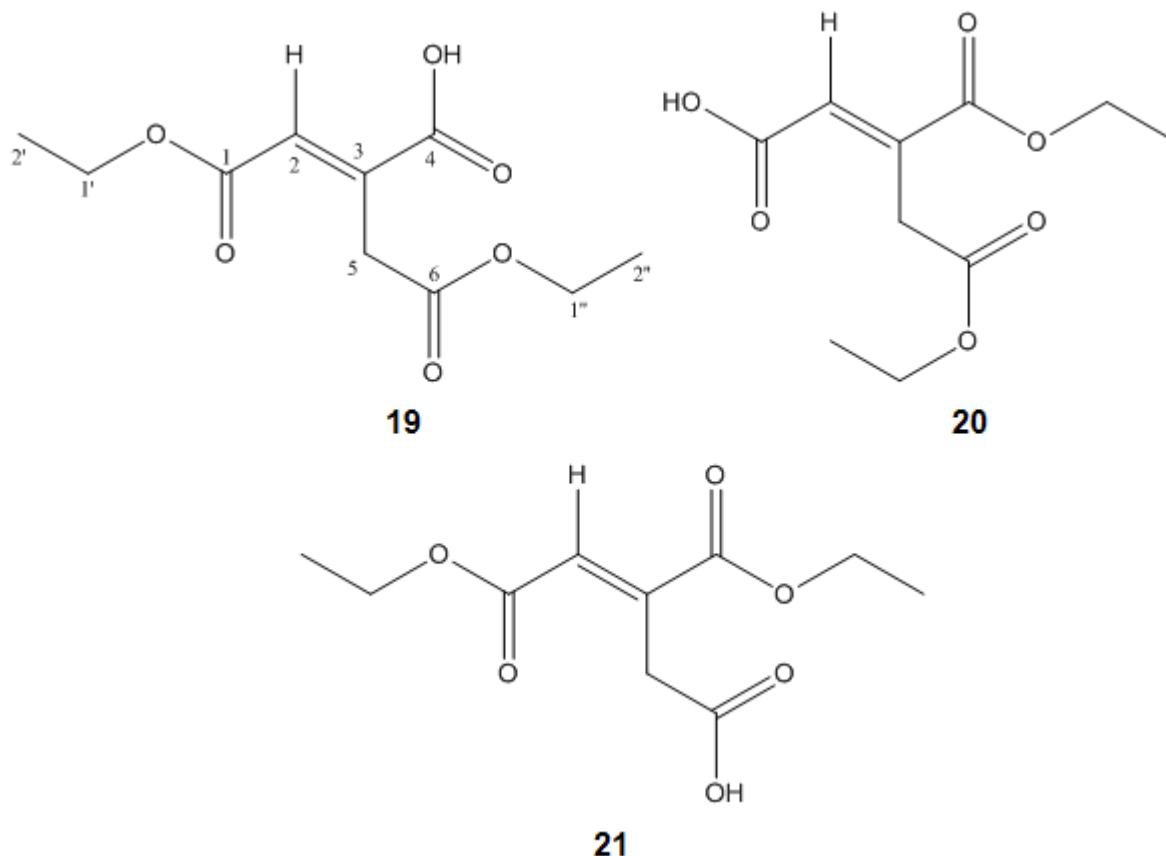
Outro exemplo de substâncias esterificadas caracterizadas por LC-ESI-MS na literatura são os isômeros do ácido clorogênico. Esta substância é proveniente da

esterificação de uma unidade de ácido quínico com uma unidade de ácido caféico. Análises no modo negativo levam a clivagem do éster em uma unidade cafeoil e outra de ácido quínico, indicando que estes fragmentos são estáveis para serem detectados mesmo em ionização por ESI (FANG, YU & PRIOR, 2002).

#### 5.4.4.4 Caracterização das misturas de diésteres por RMN

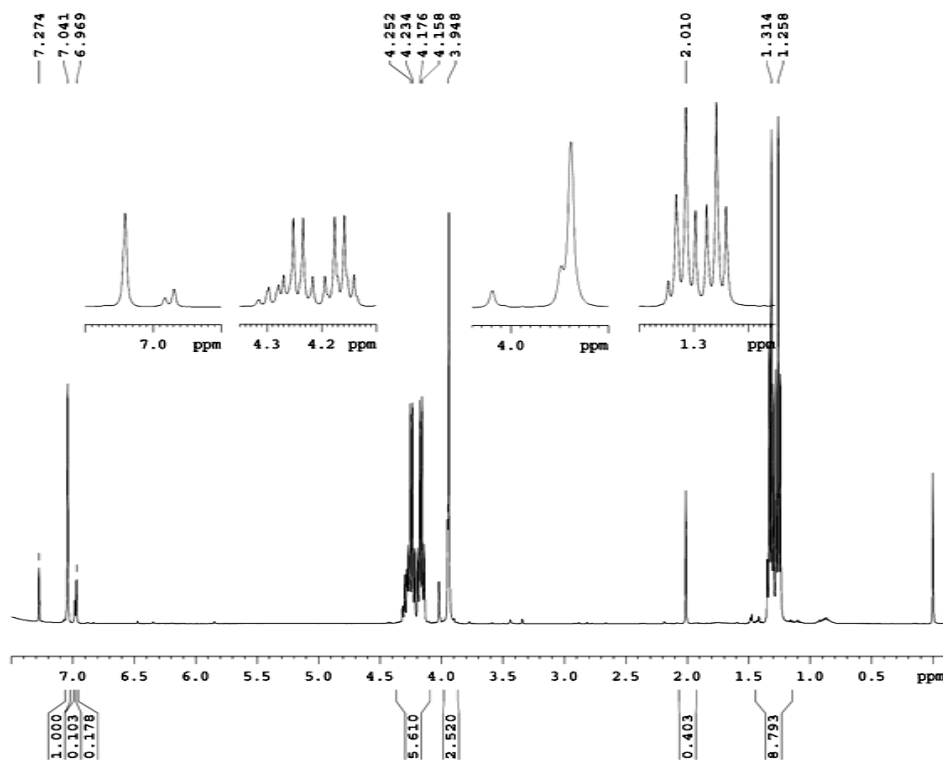
Foram obtidas misturas dos três isômeros diesterificados de cada classe sintetizada nas proporções de aproximadamente 70%, 25% e 5%. A elucidação estrutural do isômero majoritário presente em cada mistura foi realizada por experimentos de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D (HMBC). Devido às similaridades estruturais entre os diésteres presentes nas diferentes misturas obtidas, a mistura de diésteres etílicos (estruturas **19**, **20** e **21**) foi selecionada para descrição detalhada das análises realizadas para elucidar a estrutura química do constituinte majoritário. As atribuições dos espectros da mistura de isômeros de diésteres butílicos e diésteres octílicos estão dispostas na tabela 21 e os espectros nos apêndices.

A figura 45 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a mistura isomérica dos diésteres etílicos **19**, **20** e **21**.



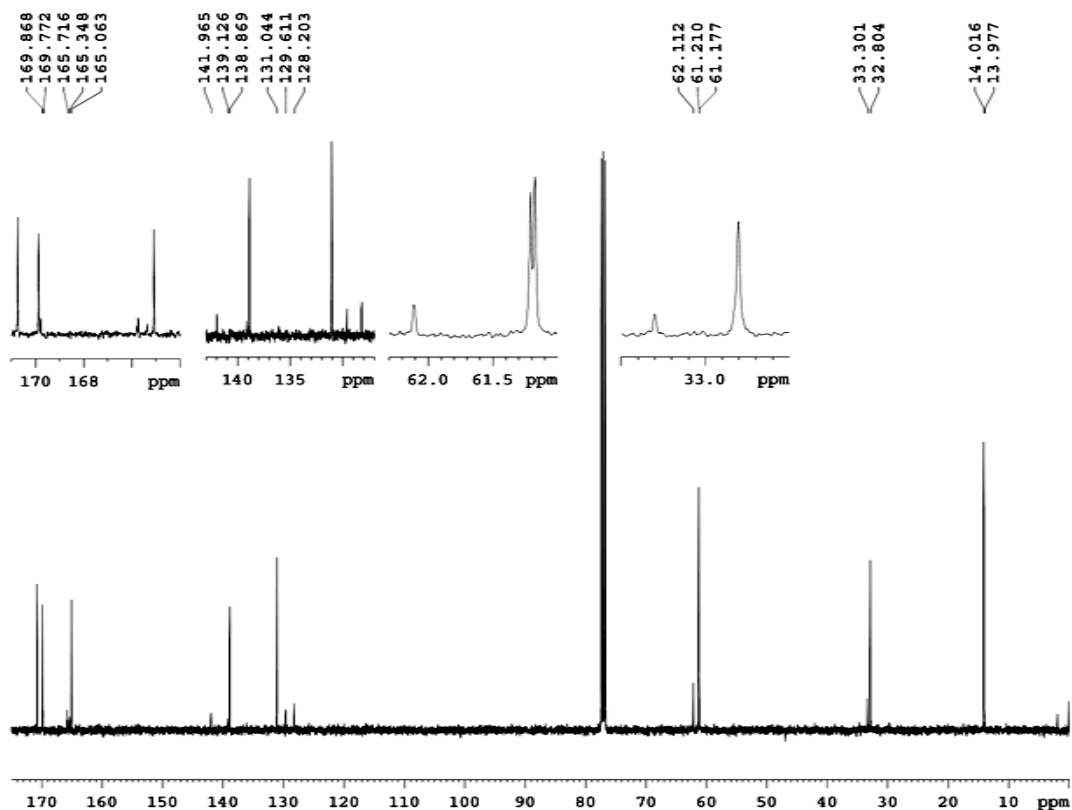


**Figura 45: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) e expansões (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



Observam-se no espectro três sinais na região de hidrogênios olefínicos ( $\delta \sim 7$  ppm) referentes aos três diferentes isômeros presentes na mistura, sendo o sinal de maior intensidade, em  $\delta$  7,27 ppm, atribuído à H2 do diéster majoritário na mistura (**19**). Os hidrogênios oximetilênicos em C1'' e C1' foram atribuídos aos dois quartetos centrados em  $\delta$  4,15 ppm ( $J = 7,2$  Hz) e 4,25 ppm ( $J = 7,2$  Hz), respectivamente, enquanto os hidrogênios metilênicos em C5, vizinhos à olefina, foram identificados como o simpleto em  $\delta$  3,94 ppm. Já os hidrogênios metílicos em C2' e C2'' foram atribuídos aos dois tripletos centrados em  $\delta$  1,25 ppm ( $J = 11,2$  Hz) e 1,31 ppm ( $J = 11,2$  Hz), respectivamente. A figura 46 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para a mistura isomérica de diésteres etílicos

**Figura 46 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) e expansões (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

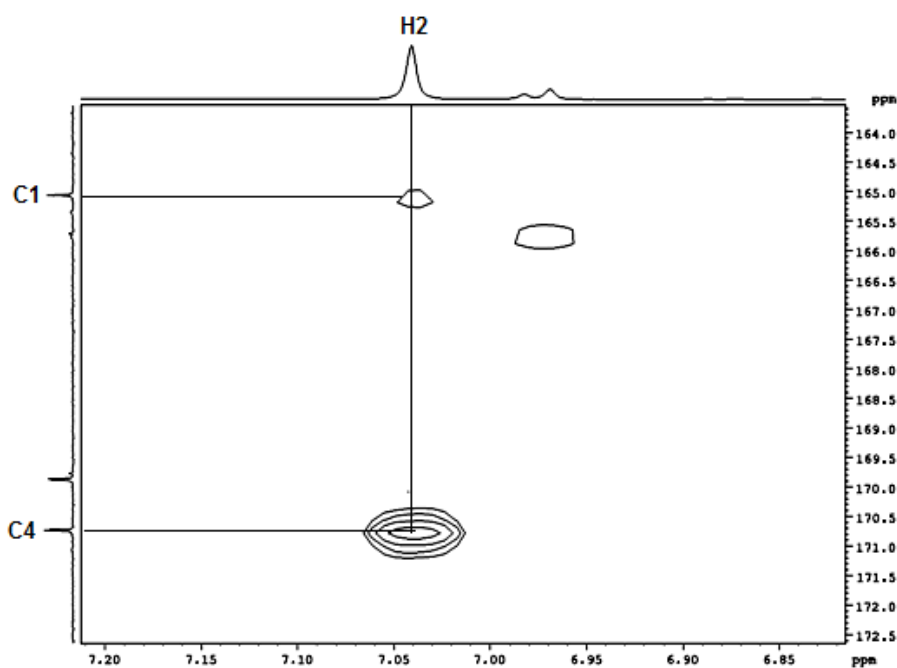


Os sinais em  $\delta$  165,06; 168,86 e 169,77 ppm foram atribuídos às carbonilas em C1, C4 e C6 respectivamente e aqueles em  $\delta$  139,12 e 141,96 ppm aos carbonos olefínicos C3 e C2. Os carbonos oximetilênicos (C1' e C1'') apresentaram valores de deslocamento químico de 61,21 e 6,17 ppm. Os carbonos metilênicos vizinhos à olefina (C5) apresentaram valores de  $\delta$  de 32,80 ppm, enquanto os carbonos metílicos (C2' e C2'') foram atribuídos aos sinais em  $\delta$  13,97 e 14,01 ppm.

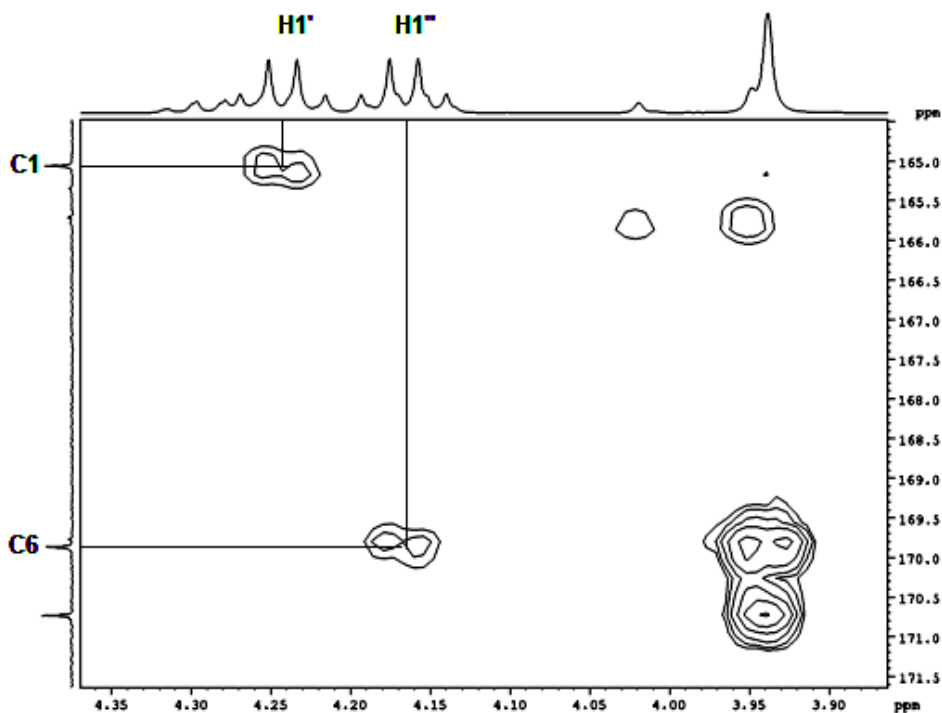
As atribuições realizadas a partir dos espectros monodimensionais não possibilitaram identificar qual o constituinte majoritário presente na mistura de isômeros. Para este propósito foi utilizado o mapa de contornos HMBC, sendo a análise centrada na região dos sinais de hidrogênios e carbonos olefínicos e oximetilênicos. Os mapas de correlação tiveram os sinais atenuados no momento do

processamento, a fim de evidenciar os sinais referentes ao constituinte majoritário na mistura. As figuras 47 e 48 apresentam, respectivamente, expansões do mapa de contornos HMBC na região de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  olefínicos e oximetilênicos.

**Figura 47- Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



**Figura 48: Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA (19, 20 e 21) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



Na figura 49 estão representadas as principais correlações evidenciadas no mapa de contornos HMBC referente ao diéster majoritário presente na mistura isomérica.

**Figura 49 - Correlações entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (representado pelas setas) observadas no mapa de contornos HMBC referente ao constituinte majoritário (19) na mistura isomérica de diésteres etílicos do ATA.**

A análise do mapa de contornos HMBC obtido para o constituinte majoritário da mistura isomérica de diésteres etílicos (Figura 49) mostrou uma mancha de

correlação entre os quartetos atribuídos aos hidrogênios oximetilênicos em C1' ( $\delta$  4,23 ppm) e a carbonila em  $\delta$  165,06 ppm, atribuída a C1. Por sua vez, os sinais dos hidrogênios oximetilênicos em C1'' ( $\delta$  4,15) apresentaram mancha de correlação com a carbonila C6 ( $\delta$  169,77), indicando que a esterificação ocorreu nessas duas posições da molécula. Outras correlações observadas no espectro HMBC confirmam essa proposta. Assim, o hidrogênio olefínico H2 ( $\delta$  7,04) apresentou manchas de correlação  $J_2$  com C1 ( $\delta$  165,06) e C3 ( $\delta$  139,12), além de sinais de correlação  $J_3$  com C4 ( $\delta$  168,86) e C5 ( $\delta$  32,80). Por sua vez, o multiplete atribuído aos hidrogênios metilênicos em C5 ( $\delta$  3,94) apresentou sinais de correlação com as carbonilas em C6 ( $\delta$  169,77) e C4 ( $\delta$  168,86), confirmando os sítios de esterificação.

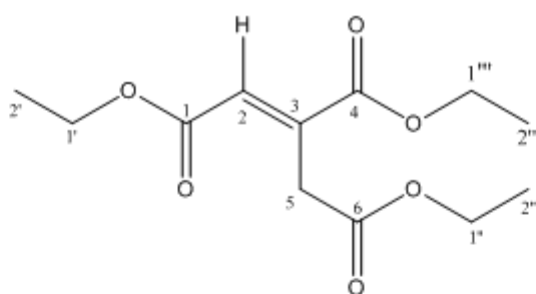
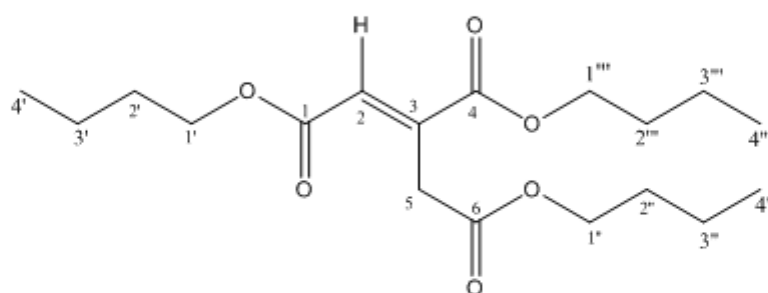
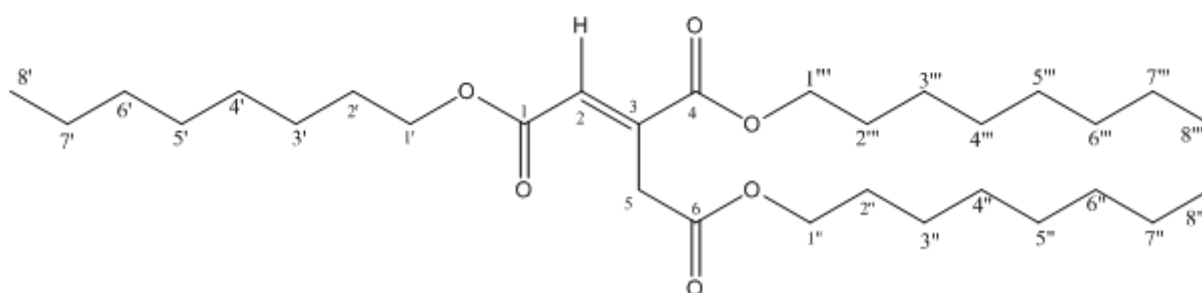
As misturas de diésteres *n*-butílicos e *n*-octílicos foram analisadas de forma semelhante e apresentaram o mesmo padrão de substituição, isto é, a esterificação do componente principal nas misturas correspondentes ocorreu nos grupos carboxílicos C1 e C6. A tabela 21 apresenta as correlações que permitiram a identificação do diéster majoritário em cada mistura.

**Tabela 21 - Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para o constituinte majoritário em cada mistura de diésteres ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

Diéster etílico		Diéster <i>n</i> -butílico		Diéster <i>n</i> -octílico	
$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm)	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm)	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm)
H5 (3,94)	C6 (169,77)	H5 (3,94)	C6 (170,7)	H5 (3,94)	C6 (170,78)
H5 (3,94)	C4 (168,86)	H5 (3,94)	C4 (169,79)	H5 (3,94)	C4 (169,79)
H1'' (4,15)	C6 (169,77)	H1'' (4,11)	C6 (169,91)	H1'' (4,09)	C6 (169,91)
H1' (4,23)	C1 (165,06)	H1' (4,19)	C1 (165,15)	H1' (4,16)	C1 (165,15)
H2 (7,04)	C1 (165,06)	H2 (7,03)	C1 (165,15)	H2 (7,04)	C1 (165,15)
H2 (7,04)	C3 (139,12)	H2 (7,03)	C3 (139,14)	H2 (7,04)	C3 (139,14)
H2 (7,04)	C4 (168,86)	H2 (7,03)	C4 (169,91)	H2 (7,04)	C4 (169,79)
H2 (7,04)	C5 (32,80)	H2 (7,03)	C5 (32,86)	H2 (7,04)	C5 (32,80)

#### 5.4.4.5 Caracterização dos triésteres por RMN

Todos os triésteres sintetizados (**22**, **23** e **24**) foram caracterizados por experimentos de RMN mono e bidimensionais.

**22****23****24**

Devido às similaridades estruturais dos triésteres, um dos derivados foi selecionado para descrição detalhada das análises por RMN. O acrilato de trietil foi escolhido devido à melhor resolução dos sinais. Os espectros do acrilato de tributila e acrilato de trioctila estão disponíveis no apêndice e as atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  constam das tabelas 22 e 23, respectivamente.

**Tabela 22 - Atribuições dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os triésteres sintetizados (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

H	aconitato de trietila			aconitato de tributila			aconitato de trioctila		
	$\delta(\text{ppm})$	M	J (hz)	$\delta(\text{ppm})$	M	J (Hz)	$\delta(\text{ppm})$	M	J (Hz)
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	6,86	s	-	6,89	s	-	6,85	s	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	3,87	s	-	3,92	s	-	3,87	s	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1'	1,24	t	$j_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 7,16$	4,14	t	$j_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 6,6$	0,8	t	$j_{\text{H}1'-\text{H}2'} = 5,96$
2'	4,15	q	$j_{\text{H}2'-\text{H}1'} = 7,16$	1,6	m	-	1,21	m	-
3'	-	-	-	1,36	m	-	1,21	m	-
4'	-	-	-	0,91	m	-	1,21	m	-
5'	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
6'	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
7'	-	-	-	-	-	-	1,59	m	-
8'	-	-	-	-	-	-	4,12	t	$j_{\text{H}8'-\text{H}7'} = 6,64$
1''	4,06	q	$j_{\text{H}1''-\text{H}2''} = 7,12$	4,05	t	$j_{\text{H}1''-\text{H}2''} = 6,68$	3,99	t	$j_{\text{H}1''-\text{H}2''} = 6,72$
2''	1,17	t	$j_{\text{H}2''-\text{H}1''} = 7,12$	1,6	m	-	1,53	m	-
3''	-	-	-	1,36	m	-	1,21	m	-
4''	-	-	-	0,91	m	-	1,21	m	-
5''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
6''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
7''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
8''	-	-	-	-	-	-	0,8	t	$j_{\text{H}8''-\text{H}7''} = 5,96$
1'''	4,19	q	$j_{\text{H}1'''-\text{H}2'''} = 7,08$	4,18	t	$j_{\text{H}1'''-\text{H}2'''} = 6,6$	4,12	t	$j_{\text{H}1'''-\text{H}2'''} = 8,28$
2'''	1,23	t	$j_{\text{H}2'''-\text{H}1'''} = 7,08$	1,6	m	-	1,59	m	-
3'''	-	-	-	1,36	m	-	1,21	m	-
4'''	-	-	-	0,91	m	-	1,21	m	-
5'''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
6'''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
7'''	-	-	-	-	-	-	1,21	m	-
8'''	-	-	-	-	-	-	0,8	t	$j_{\text{H}8'''-\text{H}7'''} = 5,96$

**Nota:**  $\delta$  (ppm): deslocamento químico em ppm; **M**: multiplicidade; **J (Hz)**: constante de acoplamento dada em Hertz (Hz). m: multipeto, t: triplete; q: quarteto.

**Tabela 23 - Atribuições dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os triésteres sintetizados (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

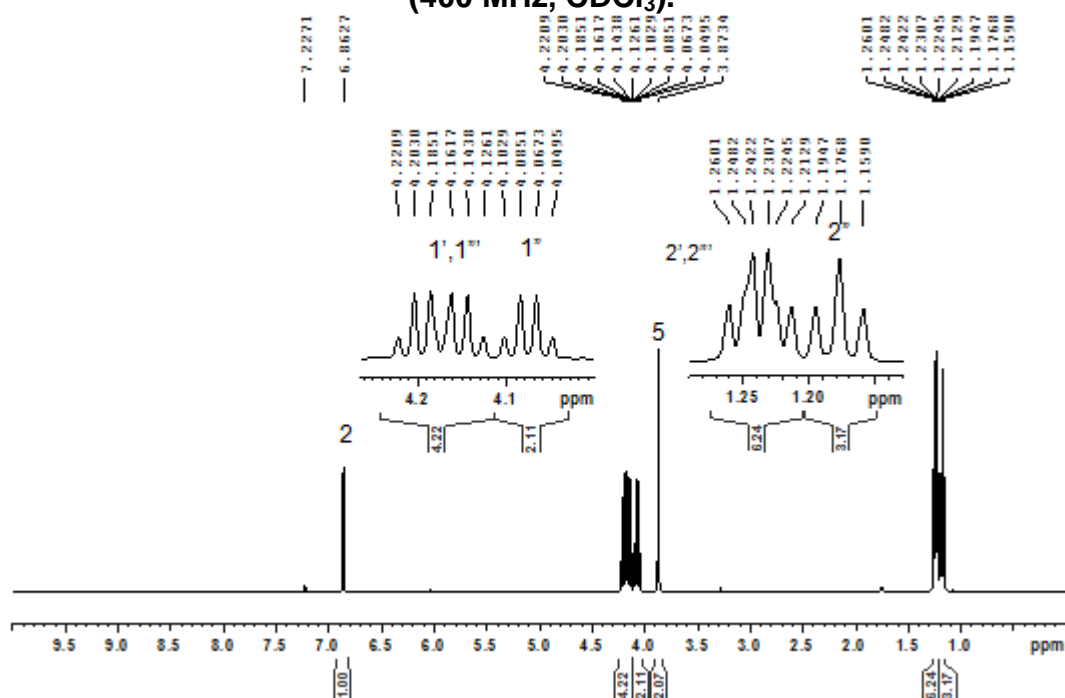
C	aconitato de trietila		aconitato de tributila		aconitato de trioctila	
	$\delta(\text{ppm})$	DEPT 135	$\delta(\text{ppm})$	DEPT 135	$\delta(\text{ppm})$	DEPT 135
1	166,12	C	166,02	C	166,21	C
2	129,22	CH	129,00	CH	129,11	CH
3	140,14	C	139,96	C	140,18	C
4	165,45	C	165,39	C	165,49	C
5	33,24	$\text{CH}_2$	33,10	$\text{CH}_2$	33,24	$\text{CH}_2$
6	169,99	-	169,82	C	169,91	C
1'	61,11	$\text{CH}_2$	65,67	$\text{CH}_2$	65,26	$\text{CH}_2$
2'	14,23	$\text{CH}_3$	30,54	$\text{CH}_2$	31,88	$\text{CH}_2$
3'	-	-	18,99	$\text{CH}_2$	31,88	$\text{CH}_2$
4'	-	-	13,58	$\text{CH}_3$	29,31	$\text{CH}_2$
5'	-	-	-	-	26,00	$\text{CH}_2$
6'	-	-	-	-	25,95	$\text{CH}_2$
7'	-	-	-	-	22,72	$\text{CH}_2$
8'	-	-	-	-	14,12	$\text{CH}_3$
1''	61,98	$\text{CH}_2$	64,81	$\text{CH}_2$	66,10	$\text{CH}_2$
2''	14,9	$\text{CH}_3$	30,47	$\text{CH}_2$	31,88	$\text{CH}_2$
3''	-	-	18,99	$\text{CH}_2$	29,31	$\text{CH}_2$
4''	-	-	13,58	$\text{CH}_3$	29,26	$\text{CH}_2$
5''	-	-	-	-	28,61	$\text{CH}_2$
6''	-	-	-	-	26,00	$\text{CH}_2$
7''	-	-	-	-	22,72	$\text{CH}_2$
8''	-	-	-	-	12,14	$\text{CH}_3$
1'''	61,07	$\text{CH}_2$	64,85	$\text{CH}_2$	65,22	$\text{CH}_2$
2'''	14,15	$\text{CH}_3$	30,54	$\text{CH}_2$	31,88	$\text{CH}_2$
3'''	-	-	19,05	$\text{CH}_2$	29,29	$\text{CH}_2$
4'''	-	-	13,58	$\text{CH}_3$	28,61	$\text{CH}_2$
5'''	-	-	-	-	26,01	$\text{CH}_2$
6'''	-	-	-	-	25,95	$\text{CH}_2$
7'''	-	-	-	-	22,72	$\text{CH}_2$
8'''	-	-	-	-	12,14	$\text{CH}_3$

**Nota:**  $\delta$  (ppm): deslocamento químico em ppm.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triéster etílico apresentou sinais com integral para oito hidrogênios (Figura 50).



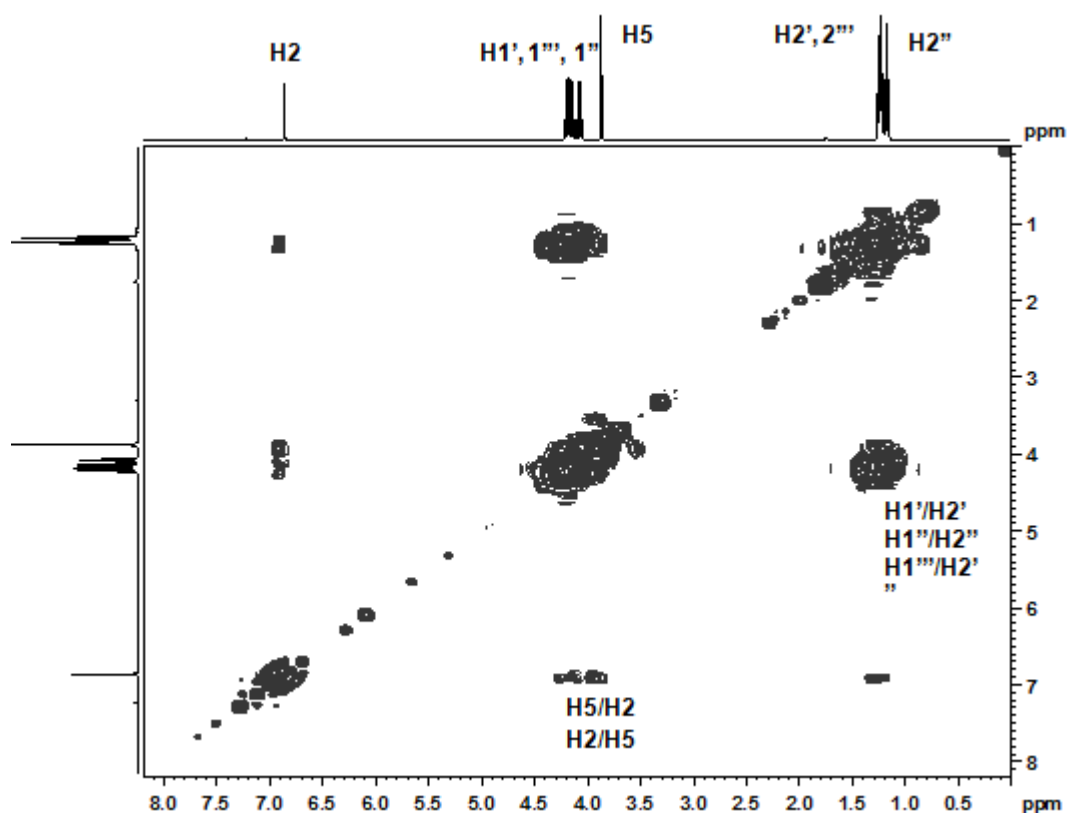
**Figura 50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do aconitato de trietila (22) e expansões (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



O espectro obtido indica que os hidrogênios ligados a um mesmo carbono possuem equivalência química, tanto para os hidrogênios metílicos quanto para os metilênicos, o que condiz com a estrutura esperada, uma vez que esta não apresenta hidrogênios diastereotópicos. O tripleto centrado em  $\delta$  1,17 ppm (3 H,  $J = 7,12$  Hz) foi atribuído aos hidrogênios metílicos  $\text{H}_2''$  e sua multiplicidade resulta do acoplamento com os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_8$ . Por sua vez, os sinais centrados em  $\delta$  1,24 ppm (3 H,  $J = 7,16$  Hz) e em  $\delta$  1,23 ppm (3 H,  $J = 7,08$  Hz) são dois tripletos parcialmente sobrepostos atribuídos aos hidrogênios metílicos nas posições  $2'$  e  $2''$ . Devido à similaridade no ambiente químico desses dois grupos metilas, associado à resolução do equipamento, não se observou o desdobramento completo do sinal em dois tripletos. O simpleto em  $\delta$  3,87 ppm (2 H) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos da posição 5 e o valor de deslocamento químico observado resulta da proximidade com a carbonila e com a insaturação vizinha. Já o quarteto centrado em  $\delta$  4,06 ppm (2 H,  $J = 7,12$  Hz) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos  $\text{H}_1''$ , enquanto os dois quartetos parcialmente sobrepostos centrados em 4,15 ppm (2 H,  $J = 7,16$  Hz) e 4,19 ppm (2 H,  $J = 7,08$  Hz) foram atribuídos aos grupos metilênicos nas posições  $1'$  e  $1''$ , respectivamente. Sua multiplicidade resulta do acoplamento com os grupos metila vizinhos. Por fim, o simpleto em  $\delta$  6,86 ppm (1 H) foi atribuído a  $\text{H}_2$ , com valor de deslocamento químico característico de hidrogênio olefínico.

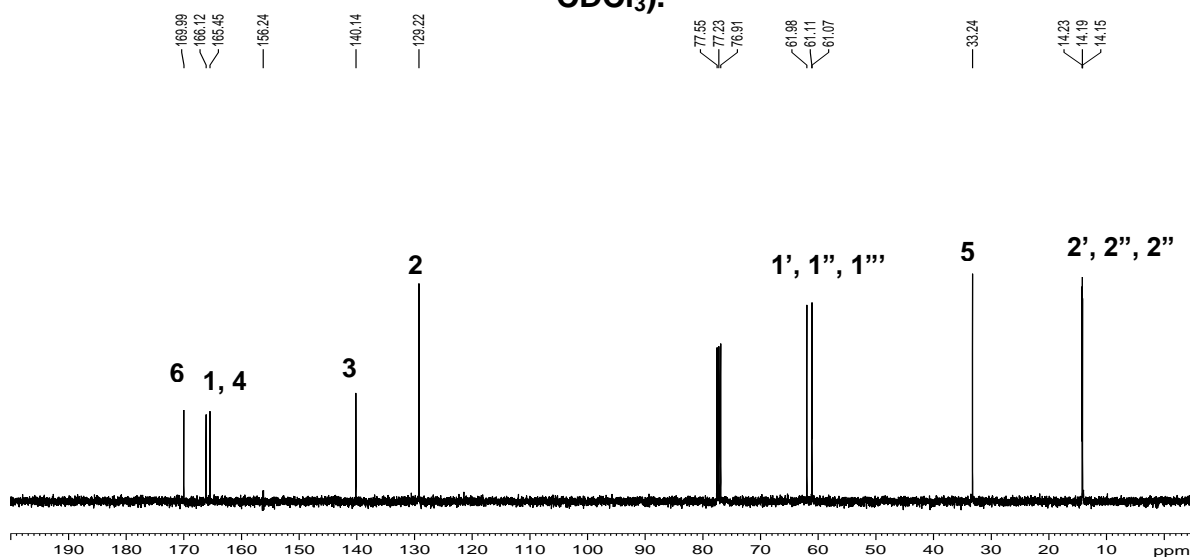
Essas atribuições foram confirmadas pela análise do mapa de contornos homonuclear COSY. É possível verificar manchas de correlação entre os hidrogênios metílicos e metilênicos, bem como para alguns acoplamentos alílicos a distância, como indicado pelas manchas de correlações na figura 51.

**Figura 51 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) obtido para o aconitato de trietila (22).**

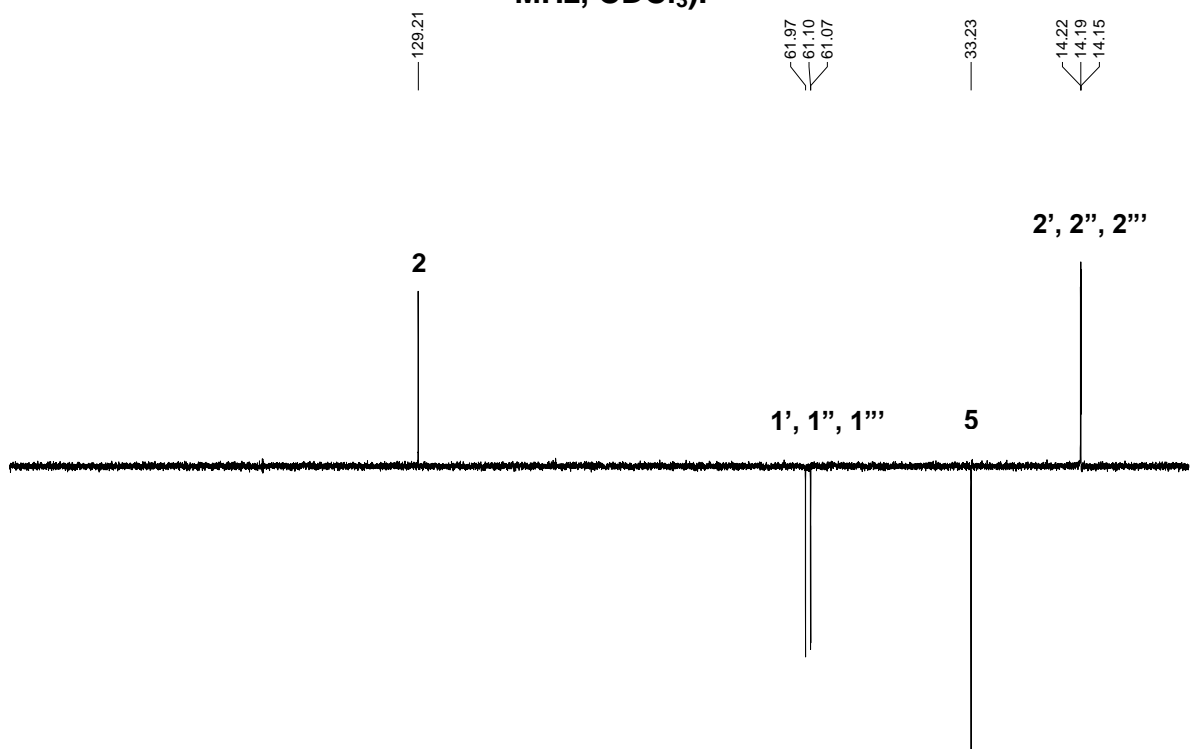


O espectro de RMN de <sup>13</sup>C do triéster etílico do ATA (figura 52) apresentou 15 sinais de carbono. O subspectro DEPT-135 (figura 53) permitiu identificar os sinais correspondentes aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos, bem como os carbonos não hidrogenados.

**Figura 52: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do aconitato de trietila (22) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



**Figura 53 - Subespectro DEPT-135 obtido para o aconitato de trietila (22) (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



Os sinais em  $\delta$  14,23; 14,19; 14,15 ppm foram atribuídos aos carbonos metílicos  $\text{C}2'$ ,  $\text{C}2''$  e  $\text{C}2'''$ , respectivamente, enquanto o sinal em  $\delta$  33,24 ppm, identificado como carbono metilênico no subespectro DEPT-135, foi atribuído a  $\text{C}5$ . A ressonância com a instauração vizinha promoveu a blindagem desse núcleo em relação aos outros carbonos metilênicos. Por sua vez, os sinais em  $\delta$  61,98; 61,11 e 61,07 ppm, valores compatíveis com o deslocamento químico de carbonos

oxigenados, foram atribuídos a C1', C1'' e C1''', respectivamente. O sinal em  $\delta$  129,21 ppm foi atribuído ao carbono metínico C2. Os demais sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  não apareceram no subespectro DEPT-135, indicando tratar-se de carbonos não hidrogenados: o sinal em  $\delta$  140,14 ppm foi atribuído a C3, visto que a conjugação entre a olefina e carbonila desblinda esse átomo, enquanto os sinais em  $\delta$  169,99; 166,12 e 165,45 ppm apresentam deslocamentos químicos característicos de carbonila de ésteres, sendo atribuídos a C6, C1 e C4, respectivamente. Os mapas de contorno bidimensionais heteronucleares HMQC e HSQC (Figuras 54 e 55) possibilitaram confirmar essas atribuições. As principais correlações observadas estão dispostas na tabela 24.

**Figura 54 - Mapa de contornos HMQC do aconitato de trietila (22) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

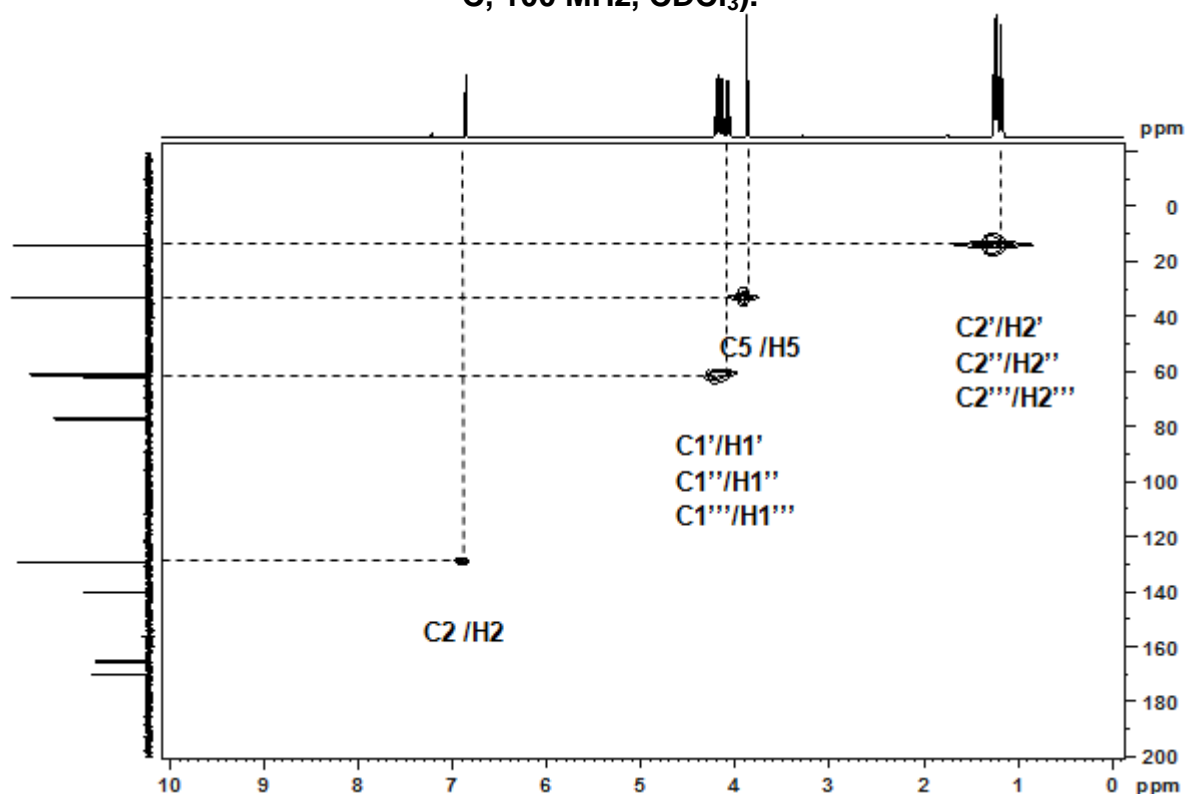


Figura 55 - Mapa de contornos HSQC do do aconitato de trietila (22) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

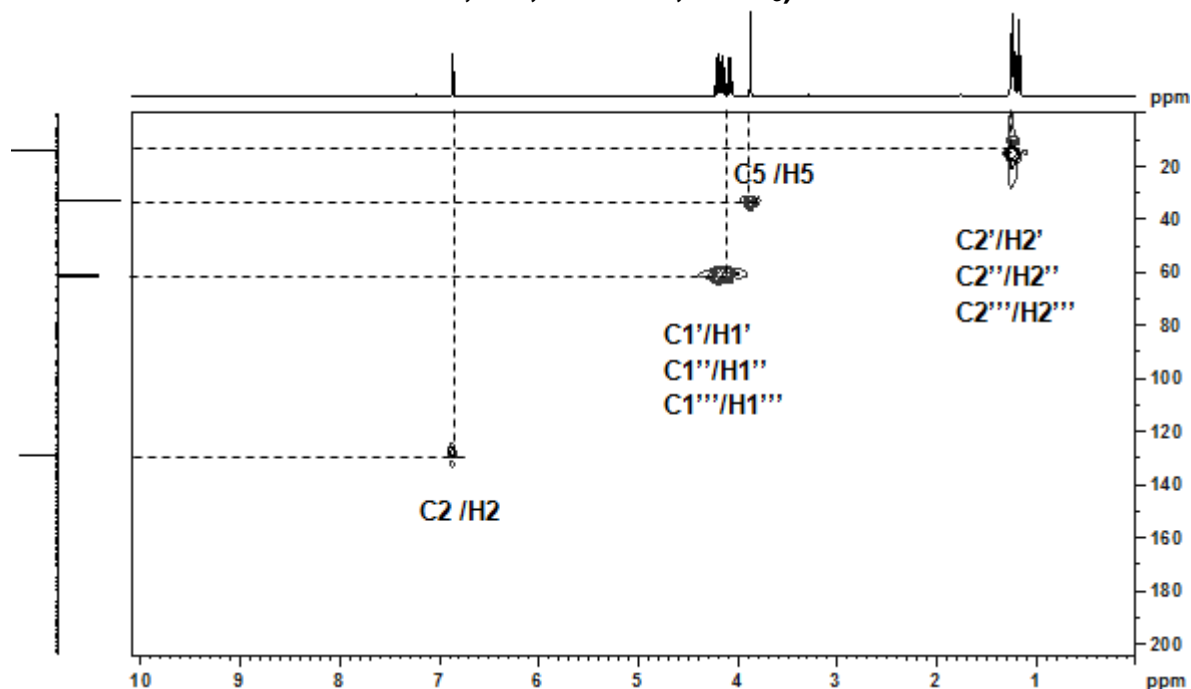
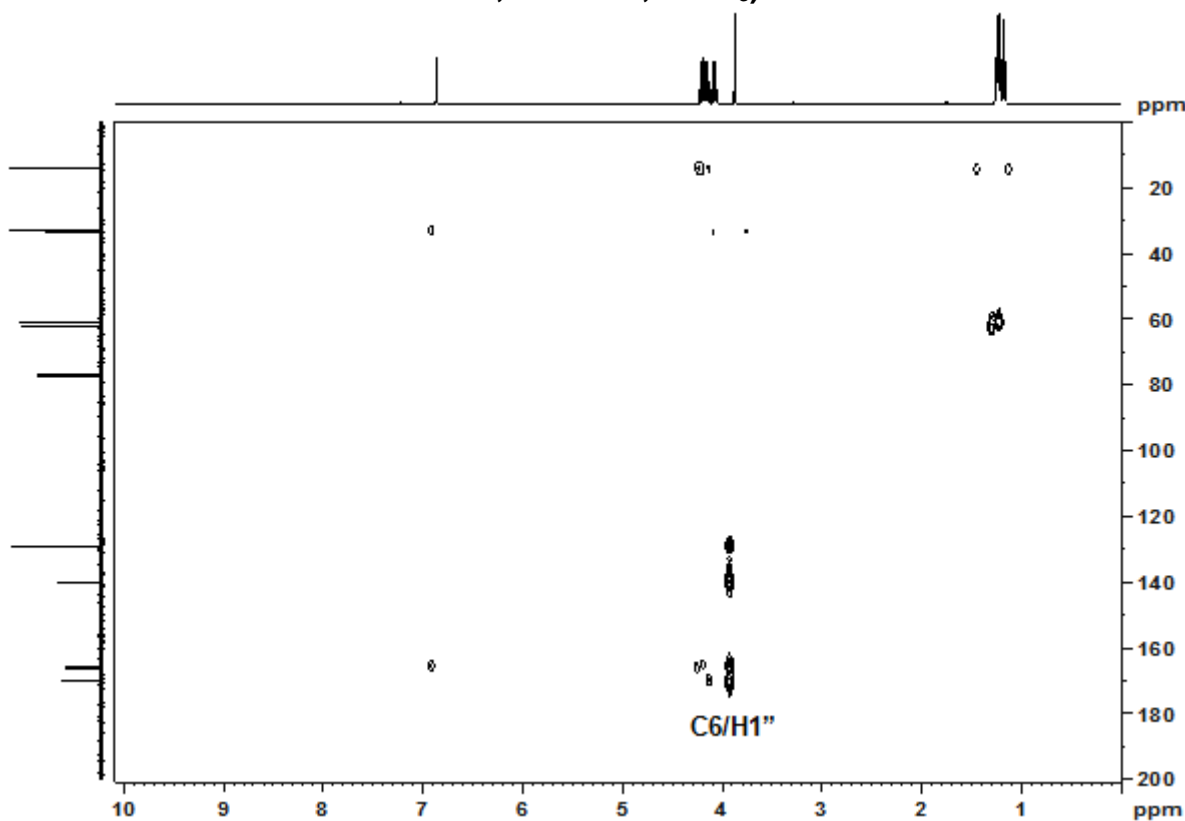


Tabela 24 - Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC, obtidos para o do aconitato de trietila (22) (Figuras 56 e 57).

$^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm)
H2'' (1,24)	C2'' (14,23)
H1'' (4,17)	C1'' (61,11)
H2 (6,86)	C2 (126,22)
H5 (3,87)	C5 (33,24)
H1' (4,06)	C1' (61,98)
H2' (1,17)	C2' (14,9)
H''' (4,17)	C1''' (61,07)
H2''' (1,24)	C2''' (14,15)

Os mapas de correlação possibilitaram confirmar as atribuições dos espectros monodimensionais. Adicionalmente, a atribuição dos carbonos não hidrogenados foi estabelecida a partir de correlações heteronucleares de longa distância ( $J^3$  ou superior) no mapa de correlação HMBC (figura 56), que revelou manchas de correlação entre os sinais da carbonila em C6 com os hidrogênios metilênicos H1''.

Figura 56 - Mapa de contornos HMBC do aconitato de trietila (22) ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Os experimentos de RMN permitiram confirmar a estrutura química do triéster etílico de ATA, com a atribuição inequívoca de todos os sinais de ressonância. Além disso, os dados de RMN possibilitaram atestar o alto grau de pureza dos triésteres sintetizados e isolados.

## 5.5 Ensaios de Atividade Biológica

### 5.5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA, dos ésteres de ATA e da formulação contendo ATA em modelo de artrite aguda induzida por LPS

O modelo de artrite induzida por LPS consiste na injeção direta do agente inflamatório na articulação, o que desencadeia uma inflamação aguda. O lipopolissacarídeo (LPS), ou endotoxina, é uma molécula derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, que apresenta toxicidade associada à virulência bacteriana. O LPS apresenta capacidade de se ligar aos receptores de membrana toll-like (TRL4), aumentando a transcrição e/ou ativação de NF- $\kappa$ B e,

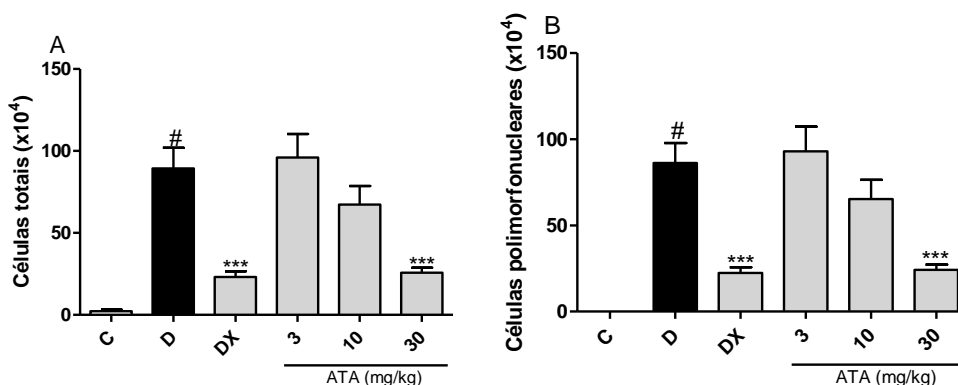
consequentemente, das citocinas pró-inflamatórias associadas (CRUZ-MACHADO, 2010).

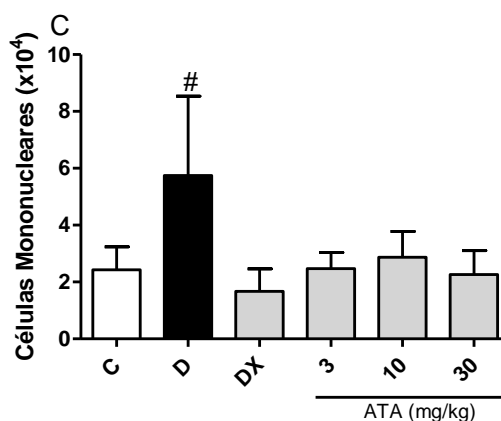
O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição central da resposta inflamatória em células do sistema imune, tanto as periféricas como macrófagos e neutrófilos, quanto em células do sistema nervoso central, como as células da glia. Quando estímulos inflamatórios como TNF- $\alpha$  ou LPS ativam este fator, ocorre, de forma organizada, a ativação da transcrição de genes associados ao processo inflamatório, que induzem as células a responder à injúria, e produzir proteínas capazes de controlar e em seguida finalizar o processo inflamatório (MEFFERT & BALTIMORE, 2005).

O ensaio de inflamação aguda induzida por LPS foi escolhido como teste de triagem para a atividade antiartrítica dos ésteres do ATA sintetizados em função da mimetização do quadro artrítico e da menor complexidade do modelo, quando comparado ao modelo de AIA. Os seguintes parâmetros foram avaliados nos experimentos: migração celular e quantificação de mieloperoxidase (MPO) e das citocinas CXCL1 e TNF- $\alpha$ .

Para realizar a transposição do modelo de AIA (item 5.5.2) para o de artrite induzida por LPS foram avaliados parâmetros de acúmulo celular nas doses de ATA de 3, 10 e 30 mg/kg, com os animais mantidos em jejum por 4 horas antes da administração do agente inflamatório. A eutanásia ocorreu 12 horas após o desafio em função do pico máximo de resposta provocada pelo LPS, enquanto no AIA esta ocorre 24 horas após o desafio. A figura 57 apresenta os resultados do acúmulo leucocitário do ATA nas doses citadas.

**Figura 57: Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA em modelo de artrite aguda induzida por LPS.**

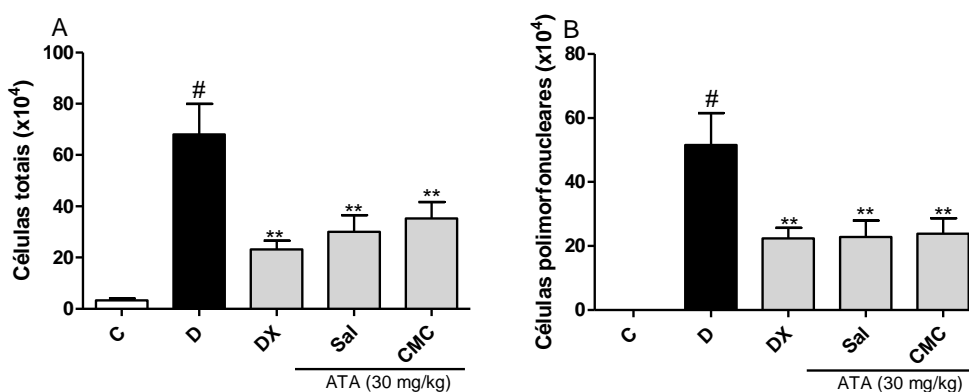




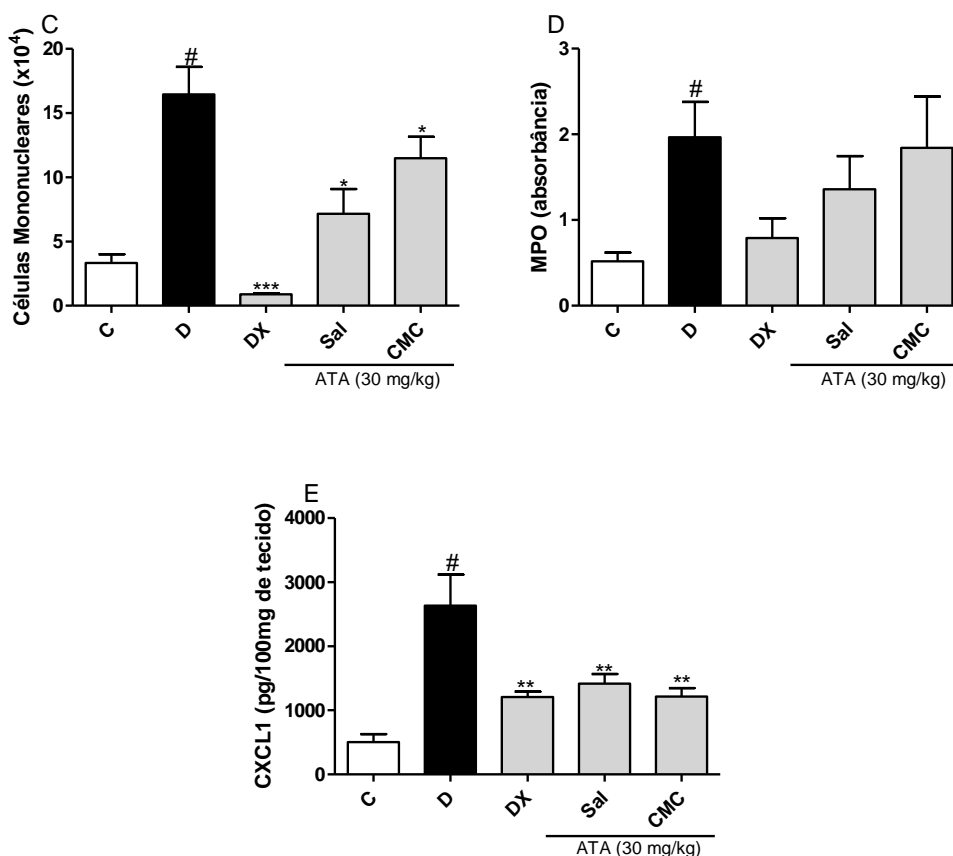
**Nota:** Efeito induzido em animais tratados com veículo ou com o ácido *trans*-aconítico (ATA) no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular, após o desafio com LPS (100 ng/cavidade). Controle (C): controle negativo (PBS); #: desafiado (D): controle positivo (LPS). Dexametasona (DX) (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Somente a dose de 30 mg/kg foi capaz de reduzir o acúmulo total de células e de polimorfonucleares, portanto esta dose foi definida como dose de trabalho para os testes posteriores. Como os derivados obtidos possuem polaridade variada, houve a necessidade de utilizar diferentes veículos para melhor dispersão destes derivados, avaliou-se o emprego de CMC (0,5%) e salina como veículo para o ATA e sua possível interferência nos parâmetros avaliados (figura 58).

**Figura 58 - Avaliação da interferência dos veículos salina e CMC sobre a atividade anti-inflamatória do ATA em modelo de artrite aguda induzida por LPS.**







**Nota:** Efeito induzido em animais tratados com veículo e com o ácido *trans*-aconítico (ATA) a 30 mg/kg, veiculado em salina ou CMC no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular e concentração de MPO (D) e KC/CXCL-1 (E) no tecido periarticular após o desafio com LPS (100 ng/cavidade). C: controle negativo (PBS); D: controle positivo (#: desafio com LPS). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Observa-se que o grupo tratado com salina reduziu de forma estatisticamente significativa o acúmulo de células mononucleares enquanto o grupo tratado com ATA veiculado em CMC não, ambos comparados ao grupo desafiado. Porém, na comparação entre os dois grupos não se verifica diferenças estatisticamente significativas para maioria dos parâmetros avaliados, o que leva a inferir que o veículo não influenciou de forma significativa a atividade biológica. A partir desta constatação os ésteres obtidos foram avaliados utilizando CMC como veículo, por permitir dispersão de moléculas com polaridade variada. Tendo em vista que os derivados obtidos a partir das reações de esterificação com o ATA possuem massa

molecular variável, estabeleceu-se trabalhar com as doses em concentração milimolar. A tabela 25 representa a correspondência das doses em mg/kg e  $\mu\text{mol/Kg}$ .

**Tabela 25 - Relação das doses administradas per os nos animais em milimolaridade ( $\mu\text{mol/kg}$ ) e mg/kg para as diferentes classes de ésteres do ATA sintetizados.**

Composto	Massa molar	Dose adm. ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Dose adm. (mg/kg)
ATA	174,11	172,30	30,00
M.E.	202,17	172,30	34,83
D.E.	230,22	172,30	39,67
T.E.	258,27	172,30	44,5
M.B.	230,22	172,30	39,87
D.B.	286,33	172,30	49,34
T.B.	342,44	172,30	59,01
M.O.	286,33	172,30	49,34
D.O.	398,54	172,30	68,67
T.O.	510,76	172,30	88,01
DX	392,46	129,45	10,00

**Nota:** ATA: ácido *trans*-aconítico; M.E.: monoésteres etílicos; M.B.: monoésteres butílicos; M.O.: monoésteres octílicos; D.E.: diésteres etílicos; D.B.: diésteres butílicos; D.O.: diésteres octílicos; T.E.: triéster etílico; T.B.: triéster butílico; T.O.: triéster octílico; DX: Dexametasona.

A Tabela 26 apresenta os resultados de acúmulo leucocitário e quantificação de citocinas nos ensaios de artrite aguda induzida por LPS realizados com os ésteres etílicos, butílicos e octílicos do ATA, testados na dose de 172,3  $\mu\text{mol/Kg}$ .

**Tabela 26 - Atividade anti-inflamatória do ácido *trans*-aconítico (ATA) e dos ésteres em modelo de artrite aguda induzida por LPS na dose de 172,3 µmol/Kg.**

Compostos	Células totais <sup>a</sup> (%)	Polimorfonucleares <sup>b</sup> (%)	Mononucleares <sup>c</sup> (%)	CXCL1 <sup>d</sup> (%)	MPO <sup>e</sup> (%)
Monoésteres etílicos <sup>1</sup>	69,2 ± 36,1	68,9 ± 31,1	91,7 ± 29,1	64,9 ± 21,7	81,35 ± 48,6
Diésteres etílicos <sup>1</sup>	33,2 ± 16,3***	33,3 ± 14,4***	40,3 ± 11,5 **	57,1 ± 24,9	33,76 ± 7,5
Triéster etílico <sup>1</sup>	64,4 ± 8,5	65,1 ± 9,7	70,4 ± 21,5	68,9 ± 44,7	129,3 ± 88,9
Monoésteres butílicos <sup>2</sup>	73,9 ± 28,3	85,2 ± 37,3	55,8 ± 19,7 *	42,46 ± 19,9	68,8 ± 33,8
Diésteres butílicos <sup>2</sup>	56,9 ± 23,7	61,62 ± 25,3	49,4 ± 23,4 **	61,7 ± 29,2	78,4 ± 50,8
Triéster butílico <sup>2</sup>	66,6 ± 40,5	78,0 ± 48,9	48,3 ± 27,3 *	101,3 ± 47,6	110,2 ± 60,6
Monoésteres octílicos <sup>3</sup>	63,2 ± 18,8*	56,6 ± 27,1 **	83,9 ± 57,2	66,9 ± 39,5	86,0 ± 61,4
Diésteres octílicos <sup>3</sup>	28,9 ± 11,9***	25,5 ± 13,3 ***	39,7 ± 13,3	67,8 ± 21,1	58,0 ± 31,1
Triéster octílicos <sup>3</sup>	60,3 ± 35,0 *	49,6 ± 26,9 **	93,8 ± 73,0	58,7 ± 25,4	60,4 ± 34,7
ATA	75,9 ± 42,8	73,0 ± 45,8	84,0 ± 24,9	48,6 ± 19,8	90,4 ± 52,1
Dexametasona	26,9 ± 9,9 ***	28,6 ± 11,6 ***	49,4 ± 13,8 *	48,5 ± 25,0	62,3 ± 34,4
Controle positivo <sup>1</sup>	100 ± 30,1	100 ± 37,5	100 ± 29,5	100 ± 64,7	100 ± 96,2
Controle positivo <sup>2</sup>	100 ± 29,5	100 ± 38,9	100 ± 28,5	100 ± 24,2	100 ± 38,8
Controle positivo <sup>3</sup>	100 ± 43,1	100 ± 47,3	100 ± 32,1	100 ± 45,0	100 ± 51,4
Controle negativo	5,1 ± 1,8	0 ± 0	23,5 ± 8,9	17,3 ± 4,8	21,6 ± 5,6

**Nota:** Acúmulo total de células (a), acúmulo de células polimorfonucleares (b) e acúmulo de células mononucleares (c) na cavidade fêmur-tibial mensurados 12 horas após a indução da inflamação com LPS. A concentração de CXCL1 (d) foi analisada por ELISA e a atividade de MPO por ensaio enzimático do tecido periarticular. Todos os resultados foram normalizados e expressos em porcentagem (%), Os números 1, 2 e 3 indicam dias diferentes de experimento. Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6 animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado (p < 0,05\*, p < 0,01\*\* e p < 0,005\*\*\*, ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Como a massa molar dos compostos sintetizados é distinta, variando de 202 a 510 g/mol, foram empregadas doses na razão molar. A dose de 30 mg/kg de ATA equivale a 172,3  $\mu\text{mol/Kg}$ ; assim, para os ensaios iniciais foi estabelecida como dose de trabalho 172,3/Kg  $\mu\text{mol}$ . Nesta conversão, a dexametasona a 10 mg/kg corresponde a 129,46  $\mu\text{mol/Kg}$ .

Em nenhum dos experimentos executados foi possível quantificar ou mesmo detectar TNF- $\alpha$  no sobrenadante obtido através do processamento do tecido periarticular e no líquido extrator de citocinas, o que indica que o teor desta citocina no tecido periarticular está abaixo do limite de detecção do kit no tempo pós indução avaliado.

Dentre os derivados etílicos, somente os diésteres reduziram significativamente a migração celular quando comparados ao controle positivo (Tabela 26). Em relação à quantificação de CXCL-1, somente o grupo tratado com ATA reduziu de forma a liberação desta quimiocina. Por sua vez, nenhum grupo reduziu a atividade da mieloperoxidase (MPO). Os ésteres butílicos reduziram de forma estatisticamente significativa apenas o recrutamento de células mononucleares. Os monoésteres e diésteres apresentaram menores teores de MPO e CXCL-1 de forma igual ou superior à dexametasona, no entanto, estes resultados não apresentaram significância estatística. Os derivados octílicos demonstraram capacidade de reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa, em especial os diésteres. Quanto aos outros parâmetros, não houve redução estatisticamente significativa.

Os resultados apresentados demonstram que os diésteres etílicos, butílicos e octílicos apresentaram atividade mais pronunciada na redução do acúmulo celular em comparação às outras classes de ésteres correlatas. Com finalidade de verificar o comportamento dose/resposta destes diésteres, foram realizados experimentos com faixas de doses variando de 0,017 a 173,2  $\mu\text{mol/Kg}$ . A tabela 27 relaciona a equivalência entre as doses em  $\mu\text{mol/Kg}$  e mg/kg administradas aos animais dos diferentes grupos avaliados

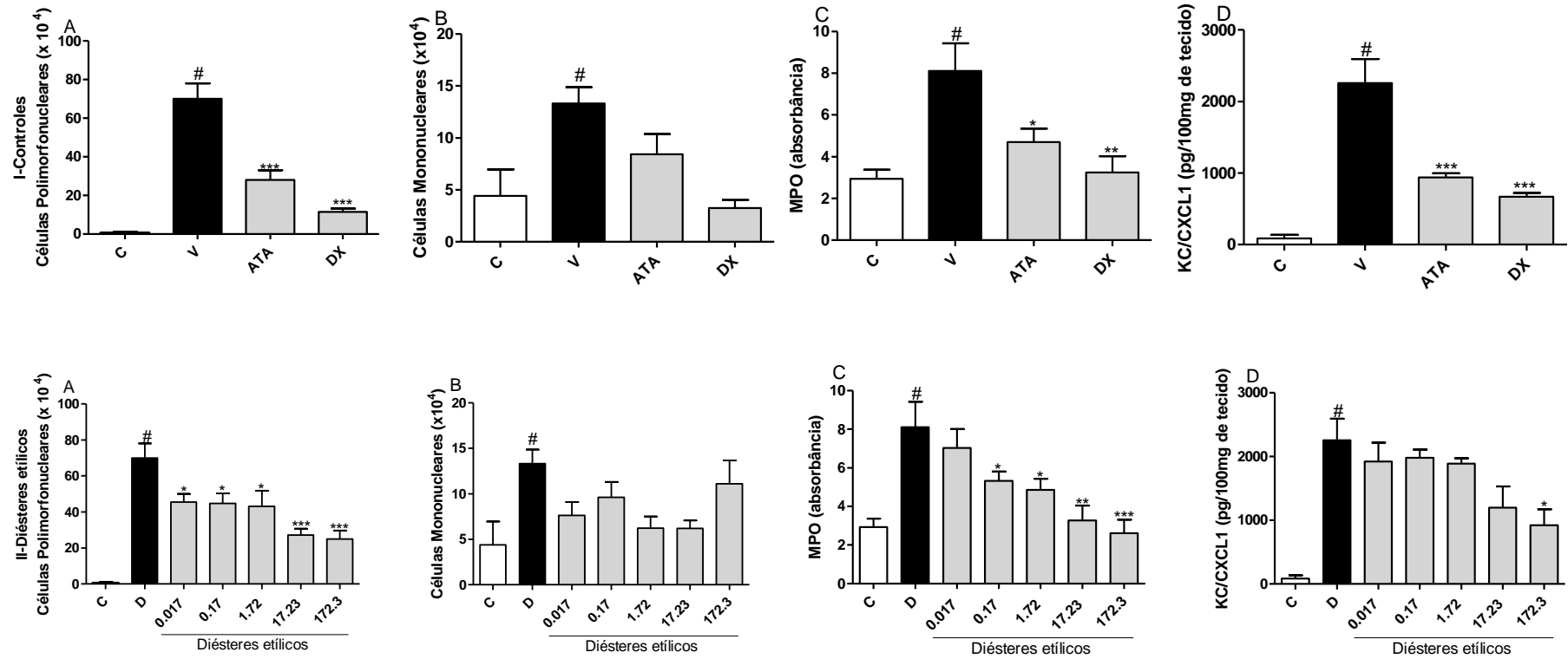
**Tabela 27 - Relação das doses administradas *per os* nos animais em  $\mu\text{mol/Kg}$  e  $\text{mg/kg}$  nos ensaios de avaliação dose-resposta dos diésteres sintetizados.**

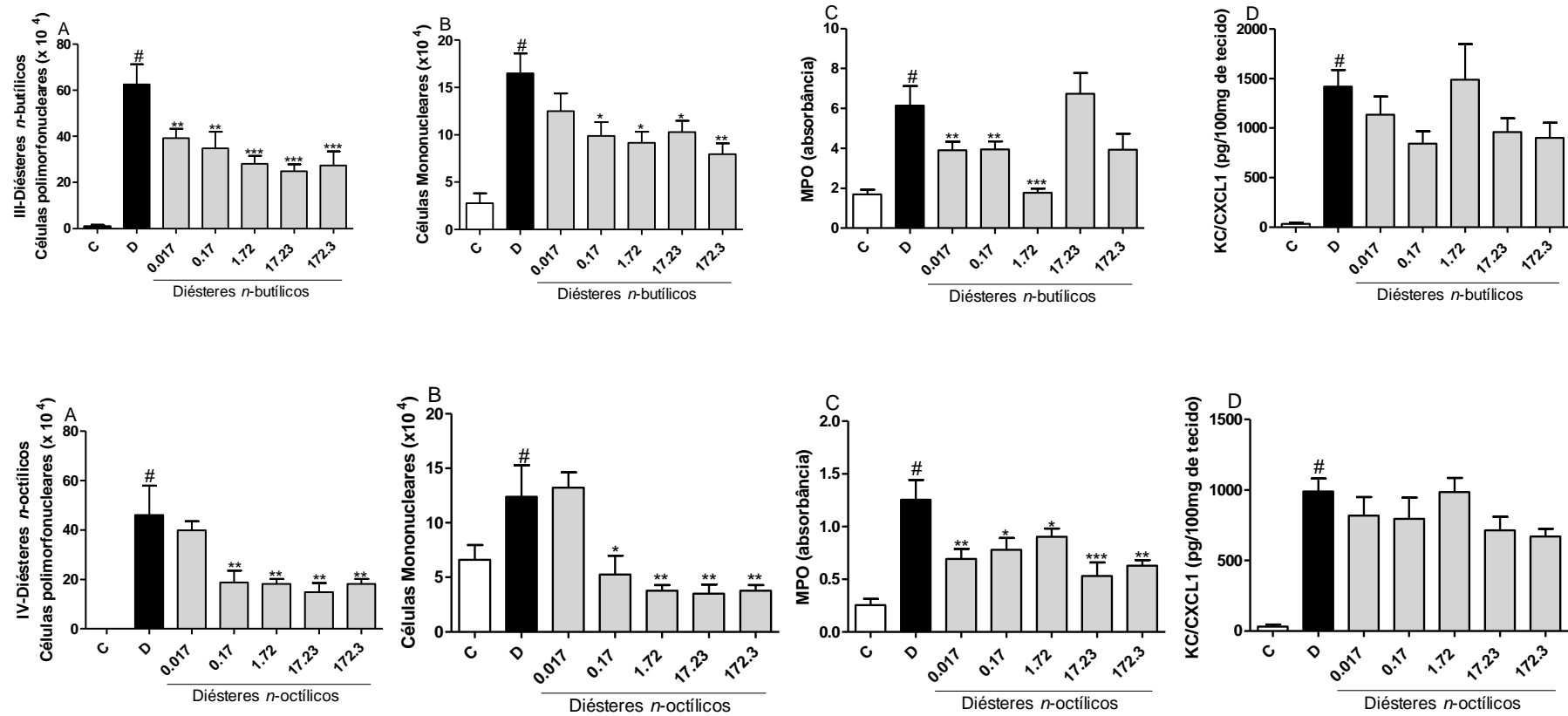
Composto	Massa molar	Dose adm. ( $\mu\text{mol/Kg}$ )	Dose adm. ( $\text{mg/kg}$ )
ATA	174,11	172,3	30
D.E.	230,22	172,3	39,67
		17,23	3,97
		1,723	0,4
		0,1723	0,04
		0,01723	0,004
D.B.	286,33	172,3	49,34
		17,23	4,93
		1,723	0,49
		0,1723	0,05
		0,01723	0,005
D.O.	398,54	172,3	68,67
		17,23	6,87
		1,723	0,69
		0,1723	0,07
		0,01723	0,007

**Nota:** ATA: ácido *trans*-aconítico; D.E.: diésteres etílicos; D.B.: diésteres butílicos; D.O.: diésteres octílicos;

Os resultados obtidos para os diésteres etílicos, butílicos e octílicos nos ensaios dose-resposta estão apresentados na figura 59.

Figura 59 - Perfil dose-resposta da atividade antiartrítica dos diésteres em modelo de artrite aguda induzida por LPS.



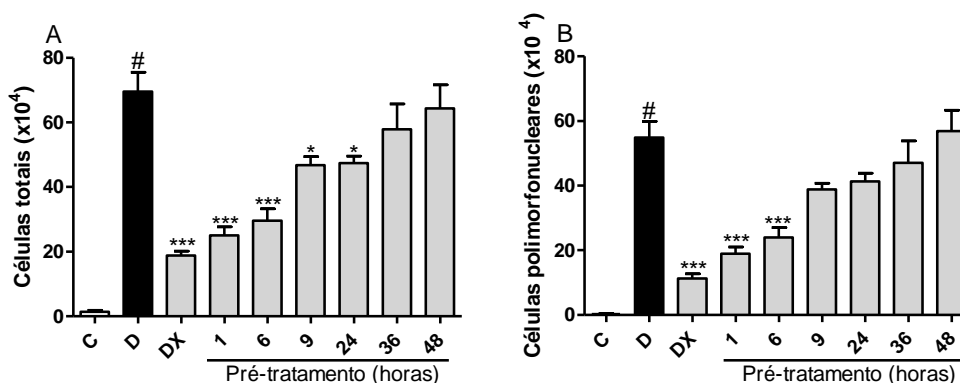


**Nota:** Efeito induzido em animais tratados com veículo, ácido *trans*-aconítico (ATA 173,2  $\mu\text{mol/kg}$ ) e com os diésteres na faixa de dose de 0,017 a 173,2  $\mu\text{mol/Kg}$ , veiculadas em CMC, no acúmulo de células polimorfonucleares e células mononucleares na cavidade articular, KC/CXCL-1 e concentração de MPO no tecido periarticular após o desafio com LPS (100 ng/cavidade). Controles: (C) controle negativo (PBS); (D: #) desafiado: controle positivo (LPS). (DX) Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

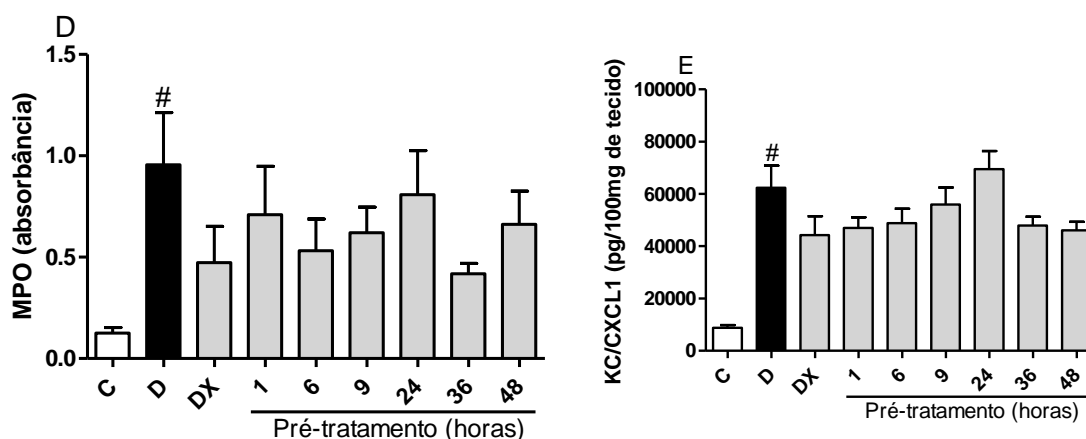
Todos os diésteres avaliados reduziram a contagem de células polimorfonucleares de forma estatisticamente significativa, na maioria das doses avaliadas. Somente a mistura de diésteres octílicos, avaliada na dose de 0,0017  $\mu\text{mol/Kg}$ , não reduziu o número de polimorfonucleares. Esse resultado indica a efetividade do tratamento, mesmo em baixas doses, sendo a maior atividade observada para doses de até 1,723  $\mu\text{mol/Kg}$ . Como observado em todos os experimentos, o ATA é ativo na dose de 30 mg/kg, equivalente a 172,3  $\mu\text{mol/Kg}$ ; porém, na dose de 3 mg/kg (17,23  $\mu\text{mol/Kg}$ ) ele foi inativo, o que indica maior potência dos ésteres sintetizados. É factível supor que esses derivados exerçam atividade como pró-fármacos, uma vez que sua hidrólise gera o ATA.

Outra estratégia empregada no presente trabalho com finalidade de aprimorar a atividade anti-inflamatória do ATA, foi a incorporação desta molécula em microesferas mucosadesivas com capacidade de promover a liberação sustentada do ATA, permitindo desta forma o prolongamento da atividade anti-inflamatória do mesmo comparado à molécula livre. Com este propósito, avaliou-se a cinética de atividade do ATA livre com tempos de pré-tratamento de 1, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas antes da aplicação do estímulo inflamatório (Figura 60) visando avaliar em quanto tempo o ATA permanece em concentração plasmática suficientemente efetiva para diminuição dos parâmetros inflamatórios, em especial o acúmulo leucocitário.

**Figura 60 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA (30 mg/kg) em modelo de artrite aguda induzida por LPS administrado em pré-tratamento no intervalo de 1 a 48 horas.**





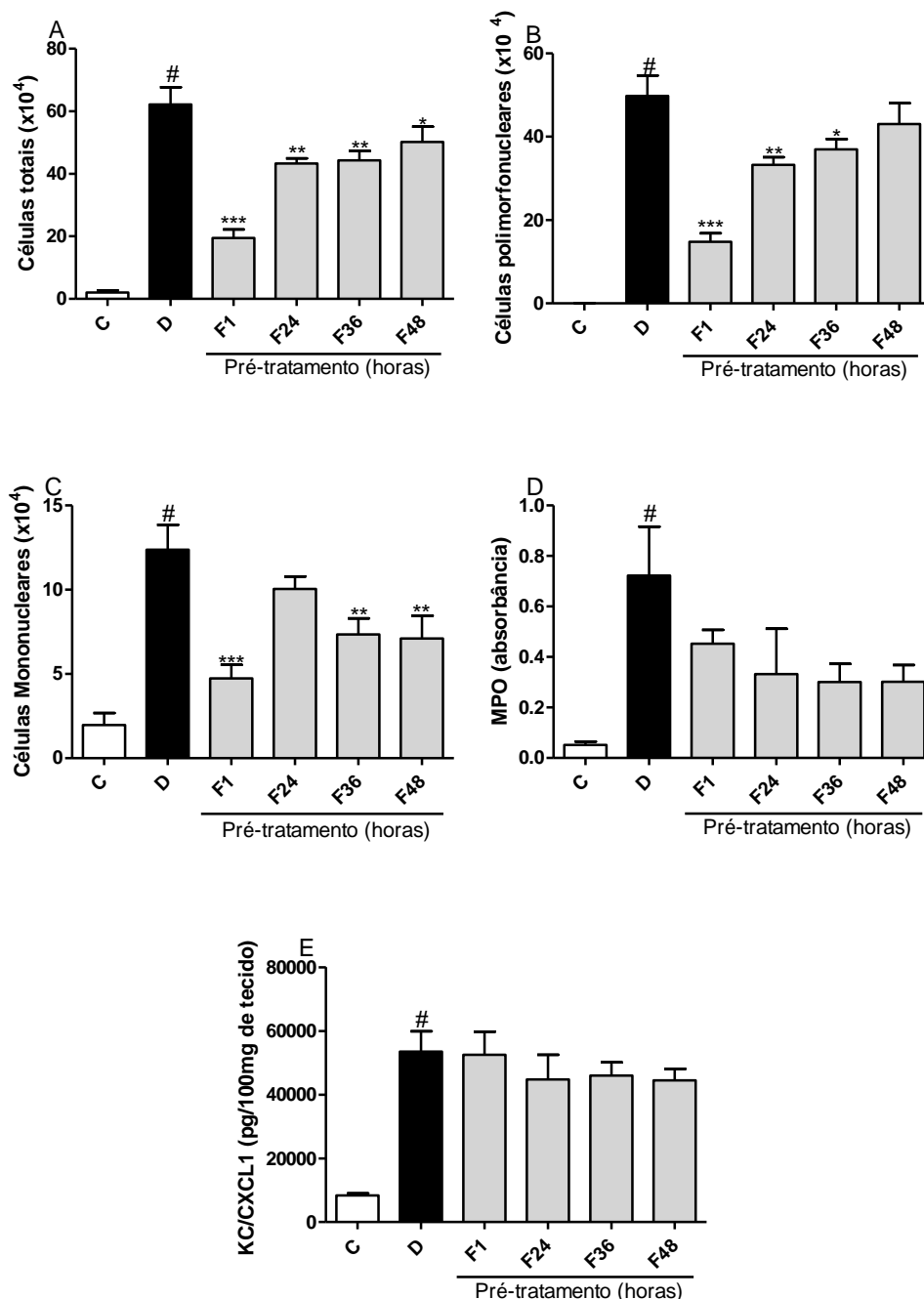


**Nota:** Efeito induzido em animais tratados com veículo, ácido *trans*-aconítico (ATA 30 mg/kg, no intervalo de 1 a 48 horas de pré-tratamento), veiculado em CMC, no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular, concentração de MPO (D) e KC/CXCL-1 (E) no tecido periarticular 12 após desafio com LPS (100 ng/cavidade). Controle (C: #): controle negativo (PBS); desafiado (D): controle positivo (LPS). Dexametasona (DX, 10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência nos ensaios administrada *p.o.* 1h antes do desafio. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

O ATA reduziu o acúmulo total de leucócitos e de células polimorfonucleares (neutrófilos) em até 24 e 6 horas de pré-tratamento, respectivamente. A redução do acúmulo de monócitos na cavidade articular foi observada em todos os intervalos de pré-tratamento, exceto 36 horas, e não foi observada diminuição do teor de CXCL1 em nenhum dos pré-tratamentos avaliados. A maior atividade anti-inflamatória, em especial a redução de neutrófilos, foi observada em até 6 horas de pré-tratamento, o que permite inferir que o ATA livre encontra-se em concentração plasmática efetiva em até 18 horas após a administração oral.

A formulação F3c foi selecionada para avaliação da atividade anti-inflamatória por apresentar maior eficiência de encapsulação comparada com as outras formulações. Portanto, avaliou-se a atividade da formulação F3c (30 mg/kg de ATA) administrada em regime de pré-tratamento nos tempo de 1, 24, 36 e 48 horas antes da aplicação do estímulo inflamatório (Figura 61), visando avaliar o efeito da incorporação do ATA nas microesferas mucoadesivas sobre a redução dos parâmetros inflamatórios avaliados.

**Figura 61 - Avaliação da atividade anti-inflamatória da formulação F3c (30 mg/kg de ATA) em modelo de artrite aguda induzida por LPS em sistema de pré-tratamento no intervalo de 1 a 48 horas.**



**Nota:** Efeito induzido em animais tratados com veículo, formulação F3c (contendo 30 mg/kg de ATA) no intervalo de 1 a 48 horas de pré-tratamento, veiculado em CMC, no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular, concentração de MPO (D) e KC/CXCL-1 (E) no tecido periarticular 12 após desafio com LPS (100 ng/cavidade). Controle: controle negativo (C; PBS); desafiado (#): controle positivo (D: LPS). Os resultados estão

expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

A formulação F3c foi capaz de prolongar a redução do acúmulo total de leucócitos e polimorfonucleares (neutrófilos) por até 48 e 36 horas de pré-tratamento, respectivamente. Apenas o pré-tratamento de 24 horas não foi capaz de reduzir o acúmulo de monócitos de forma estatisticamente significativa e nenhum tratamento foi capaz de reduzir a concentração de CXCL-1 no tecido periarticular de forma estatisticamente significativa como observado para o ATA livre. Com base nestes resultados, infere-se que a incorporação do ATA nas microesferas mucoadesivas proporcionou concentrações plasmáticas efetivas de ATA por um maior intervalo de tempo, quando comparado à molécula livre. Como consequência, a formulação F3c promoveu redução do acúmulo leucócito total e de neutrófilos respectivamente até 60 e 48 horas após sua administração oral. Isso representa uma extensão de atividade de 24 e 30 horas em comparação ao ATA livre.

As microesferas mucoadesivas são empregadas como um sistema de liberação sustentada de fármacos devido ao fenômeno da mucoadesão, que consiste na interação por forças interfaciais entre uma rede polimérica e o meio biológico. Esta interação entre a mucosa do trato gastro-intestinal e o dispositivo de liberação sustentada permite a liberação gradual da molécula encapsulada, favorecendo a biodisponibilidade da mesma (SMART 2005; KHUTORANSKIY, 2011). As matrizes poliméricas compostas por polímeros aniônicos, como o carbopol, apresentam alta capacidade mucoadesiva devido à presença de grupos carboxila, o que gera carga negativa elevando os valores de pH até excederem os valores de pKa do polímero (SINGLA et al, 2000, MIDHA, NAGPAL e ARORA, 2015; PREM, SWAPNIKA, BABU., 2017). Por outro lado, a HPMC atua como agente doador de viscosidade, suspensor, estabilizador, agente de revestimento e como agente de controle da taxa de liberação de fármaco (SIEPMANN & PEPPAS, 2001; AKHATAR et al., 2012, LIU et al., 2005). Portanto, o uso concomitante desses dois polímeros em uma matriz polimérica, descrita no presente estudo, aumentou o potencial mucoadesivo da formulação e contribuiu para sua estabilização.

Conforme abordado na revisão de literatura, leucócitos polimorfonucleares, especificamente neutrófilos, representam a primeira linha de defesa da imunidade inata. Entre as células fagocíticas esta é a prevalente na corrente sanguínea; porém,

a migração em excesso destas células para o sítio atingido pode exacerbar a resposta pró-inflamatória, lesionando o tecido associado. Assim, o papel patológico de neutrófilos em doenças inflamatórias já foi demonstrado, como observado em modelos experimentais de artrite. Os neutrófilos promovem a ativação e liberação de diversas citocinas que desempenham papel importante nos quadros inflamatórios (MARTINS, 2010; BARSANTE et al., 2008; TANAKA et al., 2006).

Doenças inflamatórias crônicas caracterizam-se pela interação entre variados fatores, sejam celulares como os polimorfonucleares, em especial os neutrófilos, e/ou moleculares como as citocinas e sistema do complemento. É sabido que espécies reativas de oxigênio contribuem para a acentuação da patogenia associada. Como a causa destas doenças é multifatorial, e está associada à migração de neutrófilos para a cavidade articular e ao aumento de elementos moleculares como as citocinas, terapias que atinjam múltiplos alvos, como os produtos naturais, configuram importante alternativa no desenvolvimento de novos tratamentos para a AR (PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015).

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes em pacientes com quadro de AR. Assim, esses tipos celulares estão associados a danos e perda de função das articulações, observados nas manifestações clínicas da patologia, seja resultante da função fagocítica ou do desencadeamento da cascata inflamatória. Já as células mononucleares estão frequentemente associadas à fase resolutive do processo inflamatório (BRADFORD et al., 2015; COELHO et al., 2008; GRESPLAN et al., 2008; LEMOS et al., 2009; SACHS et al., 2011). Dessa forma, a diminuição do influxo neutrofilico para a cavidade articular está associada com a melhora significativa do quadro de artrite reumatóide. Esta característica pode ser observada para todos os diésteres sintetizados.

A mieloperoxidase, mensurada pelo ensaio de atividade de MPO, é uma hemeproteína presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (cerca de 5% de sua composição seca). Esta é secretada no meio extracelular e fagolisossomal e compõe o sistema enzimático microbicida, que é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (BARSANTE et al., 2008, SACHS et al., 2011; PODREZ et al., 2000). Evidências experimentais sugerem que a MPO desempenhe um papel relevante na patogenia, severidade e extensão das lesões em quadros de AR. Desta forma, é importante a observação de altas concentrações de MPO em fluído sinovial (STAMP et al., 2012).

Nos experimentos aqui descritos foram obtidas respostas variadas de concentração de MPO, independente das amostras e doses avaliadas. Sugere-se que esta variação seja decorrente do local em que se encontram os neutrófilos, pois a redução do acúmulo celular na cavidade fêmur-tibial não está diretamente relacionada com a redução do acúmulo no tecido periarticular, uma vez que ainda não há descrição na literatura como estes compostos atuam na migração celular. Portanto, altas concentrações de MPO podem estar associadas a não migração dos neutrófilos do tecido periarticular para a articulação.

Citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 estimulam neutrófilos, os quais liberam substâncias pró-inflamatórias como prostaglandinas, leucotrienos, COX-2, moléculas de adesão, elastases, proteases, incluindo metaloproteinases de matriz (MMP) e enzimas lisossomais, e ROS, os quais degradam as proteoglicanas presentes na camada superficial de cartilagem (YELIN; WANKE, 1999; PAUL et al., 2006). A inibição da produção de TNF- $\alpha$  foi demonstrada em vários estudos como capaz de reduzir a inflamação e o dano tecidual (SHEALY et al., 2002). Portanto, o bloqueio de citocinas, especialmente o bloqueio de TNF- $\alpha$ , é uma estratégia anti-inflamatória válida no tratamento da artrite (BARSANTE et al., 2005). Por estes fatores buscou-se mensurar as concentrações de TNF- $\alpha$ ; porém, não foi possível detectar ou quantificá-lo, provavelmente porque as concentrações não atingiram o limite de detecção do método, ou a janela temporal empregada no ensaio não foi adequada para mensurar esta citocina, conforme demonstrado em trabalho anterior de nosso grupo (HENRIQUES et al., 2016).

Já a citocina CXCL-1, como outras quimiocinas da classe CXC, apresentam atividade quimioatrativa, ou seja, liberam mediadores químicos que atraem neutrófilos para o sítio lesionado. Portanto, a redução na concentração de CXCL1 apresenta relação direta com a diminuição da migração de neutrófilos para o tecido periarticular (ROLLINS, 1997).

Produtos naturais contribuem em grande extensão para o tratamento da artrite reumatoide: no período de 1981 a 2014, 22 novos fármacos antiartríticos foram introduzidos no mercado mundial, desses 11 (50%) têm relação com produtos naturais, compreendendo produto natural inalterado (1), preparação botânica (1), derivados de produtos naturais (3), síntese baseada em protótipo de origem natural (6) e síntese baseada em protótipo de origem natural com novo sítio farmacofórico (1) (NEWMAM & CRAGG, 2016). Este fato também é evidenciado pelo número de

pesquisas com produtos naturais com atividade antiartrítica, desde extratos brutos a substâncias isoladas.

Como citado na revisão de literatura, o diterpeno kirenol (4 mg/kg) foi ativo em modelo de artrite induzida por colágeno (WANG, et al.; 2011) e o diterpeno andrografolídeo (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) apresentou atividade frente a sinoviócitos isolados de pacientes com AR (YAN et al., 2011). Estudos clínicos com um fitoterápico a base de *Andrographis paniculata* (Paractin<sup>®</sup>), administrado na dose de 30 mg/kg, 3 vezes ao dia, reduziu a concentração de citocinas pró-inflamatórias e as manifestações clínicas da doença (HIDALGO et al., 2013). No presente trabalho, todos os diésteres foram capazes de reduzir de forma estatisticamente significativa o acúmulo celular total na faixa dose de 0,017 a 173,2  $\mu\text{mol/Kg}$  (ou 0,004 a 68,67 mg/Kg). Tendo em vista que o modelo mediado por LPS é mais agudo que o modelo mediado por colágeno, pode-se inferir que os diésteres do ATA reduziram os parâmetros inflamatórios em menores doses que o kirenol. Quanto ao andrografolídeo, o ensaio com sinoviócitos constitui uma metodologia *in vitro* de avaliação de efeito anti-inflamatório; portanto, desconsidera toda a etapa envolvida na farmacocinética da substância. Cabe destacar que a administração dos ésteres de ATA no presente trabalho foi feita por via oral, tendo se obtido resposta anti-inflamatória em doses semelhantes às concentrações avaliadas *in vitro* para o andrografolídeo.

Henriques et al. (2016) avaliaram a atividade anti-inflamatória das frações aquosa e orgânica de *Stryphnodedron adstringens* em modelo de artrite aguda induzida por LPS constatando a redução o acúmulo total de leucócitos em doses mais elevadas que dos ésteres do ATA (10, 100 e 1000 mg/kg). Os autores atribuíram a atividade observada à presença de polifenóis como ácido gálico e prodelfinidinas nestas frações.

Em trabalhos recentes do nosso grupo, diferentes extratos e frações de *Echinodorus grandiflorus* reduziram a produção de TNF- $\alpha$  em linhagens de células THP-1 estimuladas com LPS. Extratos hidroetanólico a 50%, aquoso e diclorometânico, bem como uma fração rica em flavonoides mostraram respostas potentes em termos de inibição da produção de TNF- $\alpha$ , quando avaliados na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  (100%, 67,2%, 59,8% e 82,3% de inibição, respectivamente). ATA e isoorientina foram os compostos majoritários na maioria dos extratos, e análise de regressão polinomial possibilitou correlacionar o efeito inibitório de TNF- $\alpha$  com os teores de swertijaponina, swertisina, ATA e ácido

chicórico. Por sua vez, os compostos isolados não apresentaram percentuais de inibição de TNF- $\alpha$  comparáveis aos dos extratos e frações, sugerindo um efeito sinérgico dos compostos presentes nessas matrizes (GARCIA et al., 2016a).

A utilização de produtos naturais como protótipos para síntese de análogos otimizados é uma estratégia corrente no desenvolvimento de fármacos. Um destes produtos é o ácido boswélico, isolado de *Boswellia serrata*, espécie utilizada tradicionalmente para tratar doenças inflamatórias, em especial doenças artríticas. O ácido cinâmico foi utilizado para obter ésteres do ácido boswélico e do ácido 11-cetoboswélico, bem como para esterificar fármacos anti-inflamatórios em uso clínico (ácido acetilsalicílico, naproxeno e ibuprofeno). Os ésteres obtidos foram avaliados em modelo de edema induzido por carragenina em camundongos e ratos, previamente imunizados com *Mycobacterium*. Os autores observaram que os ésteres do naproxeno (10 mg/kg) apresentaram significativa atividade anti-inflamatória, com taxas de inibição de 56,1% a 88,3%, de acordo com o tempo avaliado após a injeção de carragenina e que os ésteres inibiram o edema de forma mais significativa que o naproxeno ou o ácido bowsélico de forma isolada (CHATURVEDI, et al., 2015). No presente estudo observou-se um resultado similar, uma vez que as reações de esterificação potencializaram a atividade do ATA, sendo necessário menor dose do éster para observação da redução dos parâmetros inflamatórios avaliados em comparação ao precursor.

Cunha et al. (2016) avaliaram a atividade antiartrítica do éster etílico do ácido ferúlico (50 e 100 mg/kg) em modelo de edema induzido por carragenina em ratos previamente imunizados com CFA. Os autores observaram que a substância foi capaz de reduzir a migração celular e as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e óxido nítrico. Adicionalmente, observou-se aumento nos teores de mieloperoxidase, superóxido dismutase e atividade da catalase, indicando atividade frente a AR e redução de eventos associados às manifestações clínicas desta. Os autores concluíram que a atividade antioxidante dos compostos sintetizados pode estar associada com a atividade antiartrítica observada. Porém, os autores não relatam a atividade do ácido felúrico e dessa forma não é possível concluir se as modificações químicas realizadas potencializaram a atividade antiartrítica. No presente estudo foi verificado que os ésteres apresentaram atividade antiartrítica em menores doses comparados ao precursor (ATA) em doses inferiores aquelas empregadas para o ensaio com ácido felúrico em modelo mediado por carragenina.

### **5.5.2 Avaliação da atividade antiartrítica do ATA e dos diésteres octílicos em modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA)**

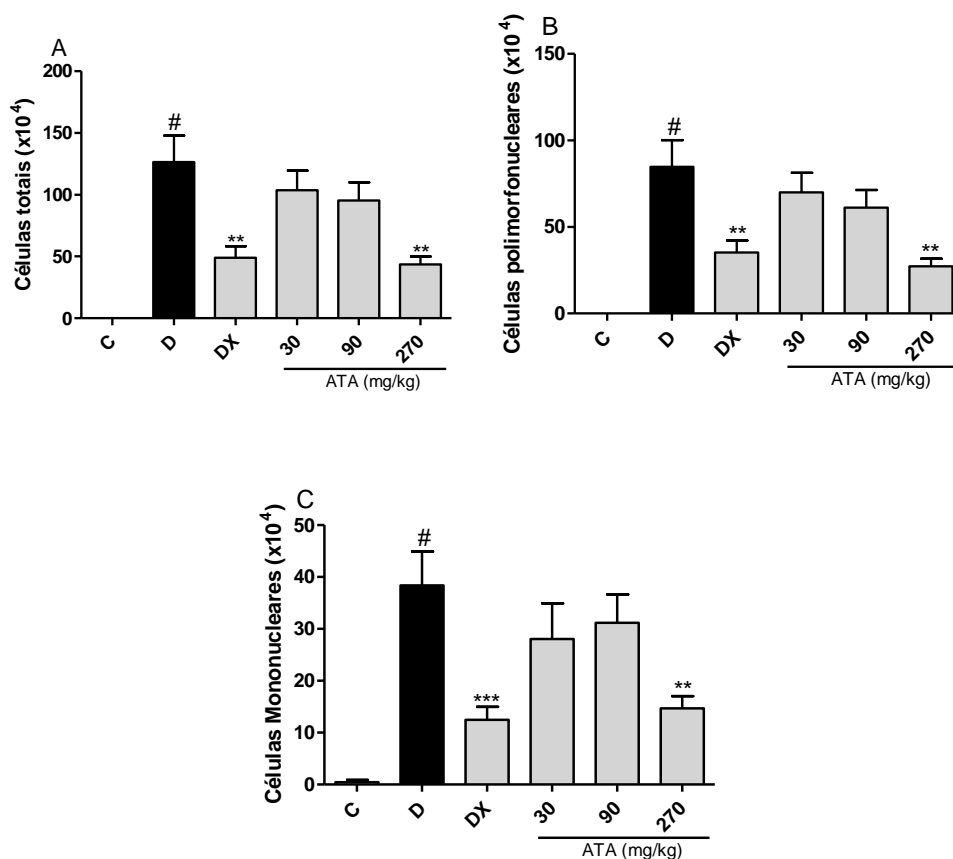
O modelo de AIA caracteriza-se por exibir uma resposta fisiopatológica semelhante à observada em pacientes portadores de artrite reumatoide. A administração de albumina bovina metilada associada ao adjuvante completo de Freund (emulsão contendo fragmentos inativos de *Mycobacteria*) promove uma resposta inflamatória por ativação de linfócitos Th1, desencadeando recrutamento e acúmulo leucocitário, sinovíte, erosão da cartilagem e óssea, ou seja, um quadro semelhante à fisiopatologia da artrite reumatoide observada em humanos (POHLERS et al., 2004; WONG et al., 2006 e COELHO, 2007). Devido sua complexidade e maior tempo de execução, a utilização deste modelo para a triagem de compostos é inviável.

Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, o ATA foi ativo em modelo de AIA nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg, sendo a maior atividade observada na dose de 30 mg/kg, quando administrado por via oral, 1 hora antes do desafio com mBSA (GARCIA, 2011). No presente trabalho, o primeiro ensaio avaliou a atividade do ATA (*per os*, 30 mg/kg) foi inicialmente avaliada em modelo de artrite induzida por LPS com a administração da substância em diferentes intervalos de tempo prévios ao desafio com LPS (12h, 6h, 3h e 1h). Não se observou atividade anti-inflamatória em nenhum dos intervalos de tempo avaliados, determinada a partir da contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade fêmur-tibial.

Assim, na etapa seguinte do trabalho buscou-se ampliar a faixa de doses de ATA avaliadas (30, 90 e 270 mg/kg) em modelo de artrite induzida por mBSA conforme descrito por Garcia (2011), sendo a substância administrada 1 hora antes do desafio com mBSA. Os resultados obtidos nesse ensaio estão representados na figura 62.



**Figura 62 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado (p.o.) em animais sem jejum em modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda).**

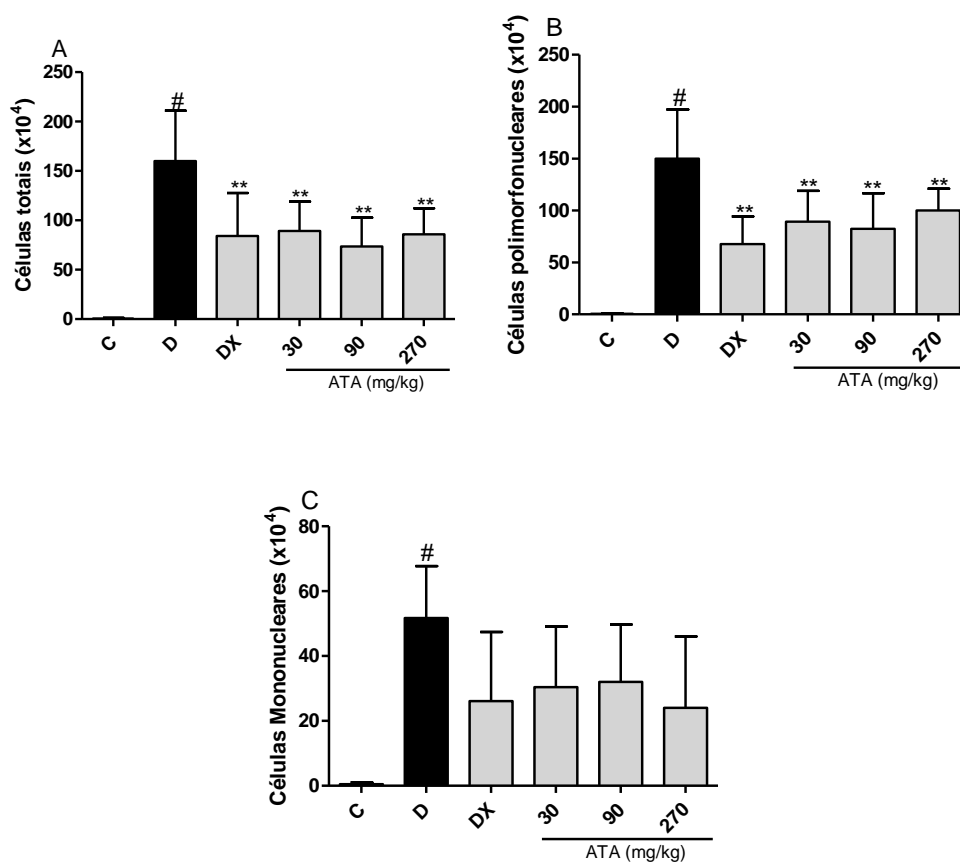


**Nota:** Efeito induzido nos animais sem jejum, tratados com veículo ou com o ácido *trans*-aconítico (ATA) no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular 24 horas após desafio com mBSA (10 µg/cavidade). Controles: controle negativo (C) (PBS); Desafiado (#): controle positivo (D. mBSA). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Apenas a dose de 270 mg/kg apresentou atividade inibitória do acúmulo leucocitário. Esses ensaios, e aqueles realizados com administração do ATA em diferentes intervalos de tempo, foram realizados sem que os animais estivessem em jejum. Assim, conjecturou-se que a baixa atividade do ATA aqui observada, em comparação aos resultados relatados por Garcia (2011), deveu-se à influência de constituintes da dieta dos animais.

A fim de avaliar essa hipótese, foi realizado novo ensaio no qual os animais foram mantidos em jejum por 4 horas antes da administração do ATA e 1 hora após o desafio com mBSA. A figura 63 apresenta os resultados referentes ao ensaio.

**Figura 63 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado (p.o.) em animais com jejum prévio ao tratamento de 4 horas no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda).**

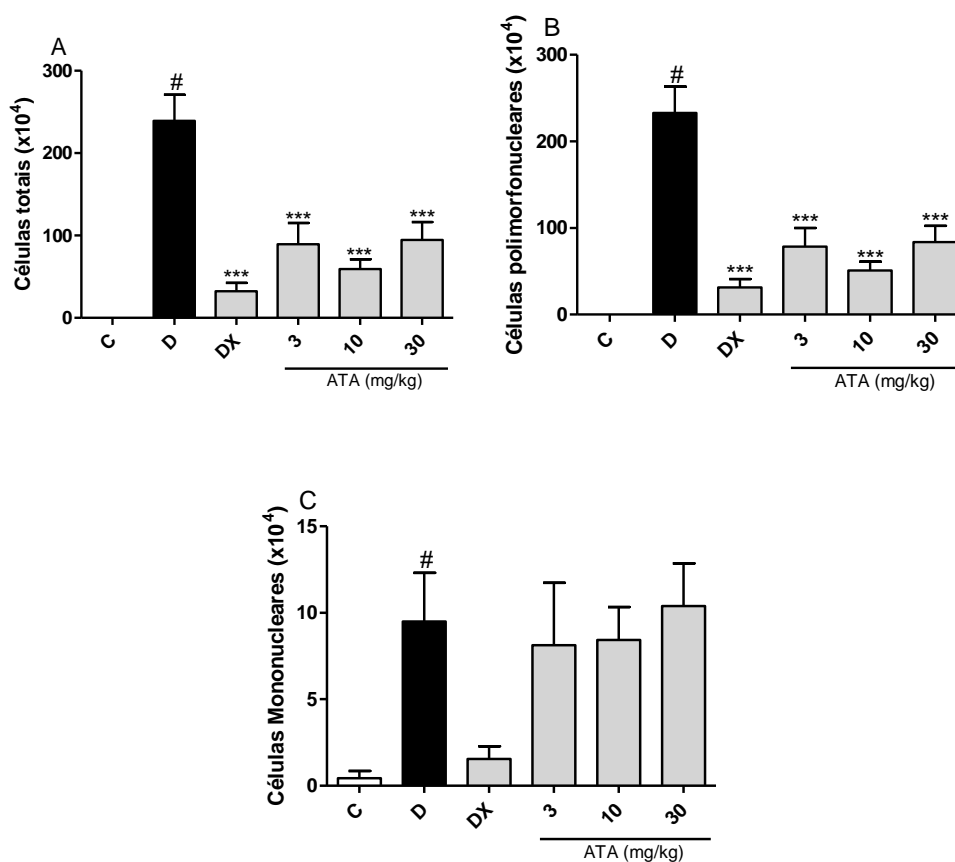


**Nota:** Efeito induzido nos animais em jejum, tratados com veículo ou com o ácido *trans*-aconítico (ATA) no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular 24 horas após desafio com mBSA (10 µg/cavidade). Controles: controle negativo (C) (PBS); Desafiado (#): controle positivo (D. mBSA). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

No ensaio com os animais em jejum, observou-se que todas as doses testadas reduziram o acúmulo leucocitário de forma estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo desafiado (não tratado). Para estabelecer uma dose

de trabalho do ATA, o ensaio foi repetido nas condições supracitadas, porém empregando doses inferiores (3, 10 e 30 mg/kg) e os resultados obtidos estão descritos na figura 64.

**Figura 64 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA administrado (p.o.) em animais com jejum prévio ao tratamento de 4 horas no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda).**



**Nota:** Efeito induzido nos animais em jejum, tratados com veículo ou com o ácido *trans*-aconítico (ATA) no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular 24 horas após desafio com mBSA (10 µg/cavidade). Controles: controle negativo (C) (PBS); Desafiado (#): controle positivo (D. mBSA). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Os resultados apontam que o jejum desempenha papel importante na atividade anti-inflamatória do ATA, uma vez que todas as doses avaliadas nos experimentos em que foi instituído o jejum reduziram o acúmulo de células na

cavidade articular. Nos experimentos onde os animais foram ensaiados sem jejum, observou-se redução da migração celular de forma significativa apenas na maior dose ensaiada (270 mg/kg). Desta forma, o emprego do jejum potencializou a atividade do ATA cerca de 90 vezes quando comparado ao experimento sem esse procedimento. É importante ressaltar que nos experimentos pilotos citados, não foi realizada a quantificação de citocinas. Utilizou-se como parâmetros de análise o acúmulo celular total e diferencial.

Esses resultados corroboram os dados relatados por Garcia (2011) empregando o mesmo modelo, onde se observou uma significativa redução da migração celular induzida pelo ATA nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg.

Para que um fármaco exerça sua função terapêutica no organismo é necessário que este passe por três etapas: a fase farmacêutica ou biofarmacêutica, que consiste em disponibilizar o fármaco através de dissolução ou desintegração da forma farmacêutica, deixando-o livre para a etapa farmacocinética, que inclui processos de absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção. Concomitante a estes processos ocorre a fase farmacodinâmica, onde o fármaco interage com seu alvo e exerce sua função terapêutica, seja de natureza agonista ou antagonista (MOURA; REYES, 2002; HAKEN, 2002; REIS, 2004).

Quando os medicamentos são administrados com alimentos podem ocorrer alterações na etapa farmacodinâmica ou farmacocinética devido a interações entre fármacos e nutrientes. Alterações na fase farmacodinâmica são menos observadas comparadas às alterações farmacocinéticas. A biodisponibilidade depende diretamente da absorção e do metabolismo de primeira passagem. A principal interação farmacocinética entre fármaco e alimento é a modificação na etapa de absorção, seja por reações químicas ou por alterações fisiológicas desencadeadas pela ingestão alimentar (SILVA; CYSNEIROS; EMIM, 2007).

Em nível químico, os constituintes da dieta podem reagir com o fármaco através de interações diretas, determinadas pela natureza química dos mesmos, e por complexação. Já em nível fisiológico, os nutrientes levam a modificações no valor de pH do trato gastrointestinal e na velocidade de esvaziamento gástrico, bem como ao aumento da atividade peristáltica intestinal, competição com sítios de absorção e fluxo sanguíneo visceral. Estes fatores isolados ou associados podem diminuir, retardar, aumentar ou não afetar a absorção. Desta forma é justificada a importância de jejum antes da administração do fármaco, uma vez que a via oral é a

mais utilizada na prática clínica (FONSECA, 2000; HAKEN, 2002; MOURA; REYES, 2002).

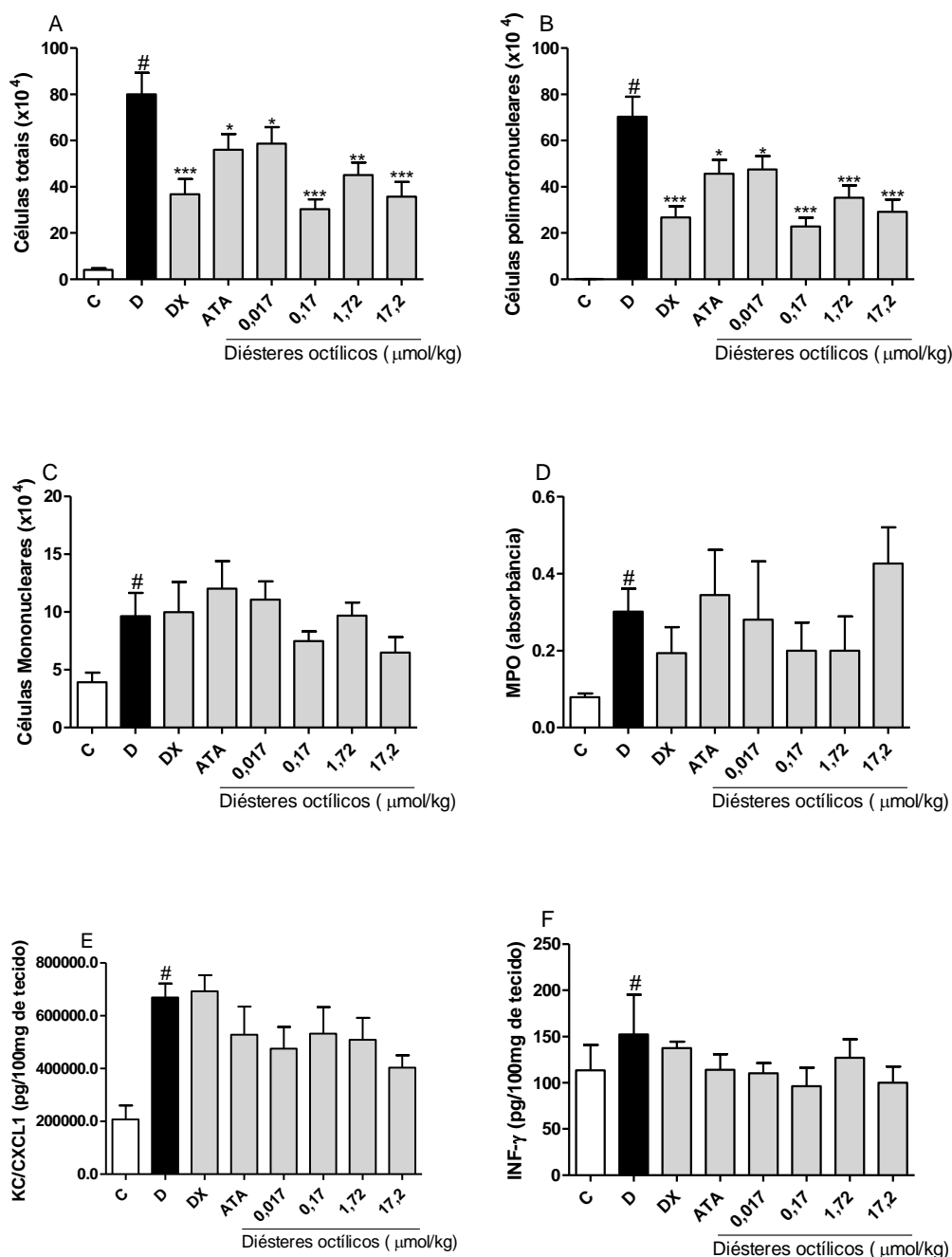
Welling (1977) relata a diminuição de absorção de diferentes fármacos de administração oral pela ingestão de alimentos, incluindo antibióticos e anti-inflamatórios com variada polaridade. O autor cita que a administração concomitante destes medicamentos com refeições como café da manhã e almoço levaram a diminuição da absorção dos fármacos de acordo com sua natureza, seja por alteração de pH ou competição por um sítio de absorção; porém, o autor não discute a relação entre a estrutura química dos fármacos e a diminuição de atividade.

Outro parâmetro farmacocinético que sofre grande influência de alimentos é o metabolismo de fármacos. As enzimas pertencentes ao citocromo P450 presentes no fígado configuram o principal sítio metabolizador do corpo humano. Neste contexto, fármacos e produtos da dieta podem tanto inibir a atividade destas enzimas, como o caso da cimetidina ou quinidina, ou induzir uma maior atividade, caso do fenobarbital. Além disso, dietas desbalanceadas tendem a alterar condições metabólicas do indivíduo, afetando também fatores como concentração plasmática de fármacos e clearance renal (WALTER-SACK & KLOTZ, 1996)

O ATA é uma micromolécula de caráter ácido, determinado pela presença de três grupos de ácido carboxílico, resultando em elevada polaridade. Estas peculiaridades contribuem para o aumento da sua velocidade de excreção no organismo. A presença de alimentos no estômago tende a diminuir a acidez deste órgão; como consequência, moléculas ácidas tendem a permanecer na forma ionizada, sendo mais rapidamente excretadas (HÖTER & DRESSMAN, 2001). O ajuste do jejum por um tempo maior, leva o pH do estômago a ficar mais ácido e, assim, moléculas ácidas não se desprotonam com tanta facilidade, permanecendo por mais tempo no organismo, em comparação com sua forma desprotonada ou ionizada.

Verificou-se que, entre os ésteres sintetizados, os diésteres octílicos apresentaram maior atividade anti-inflamatória no modelo de artrite aguda induzida por LPS (vide item 5.5.1). Devido à maior complexidade da resposta inflamatória desenvolvida no modelo de AIA, avaliou-se o perfil dose resposta dos diésteres octílicos no presente modelo (figura 65).

**Figura 65 - Avaliação da atividade anti-inflamatória do ATA (17,2  $\mu\text{mol/Kg}$ ) e do perfil dose/resposta dos diésteres octílicos no modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA aguda).**



**Nota:** Efeito induzido nos animais em jejum, tratados com veículo, ácido *trans*-aconítico (ATA) e diésteres octílicos em diferentes doses no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular, concentração de MPO (D), KC/CXCL-1 (E) e INF- $\gamma$  (F) no tecido periarticular 24 horas após desafio com mBSA (10  $\mu\text{g}$ /cavidade). Controles: controle negativo (C) (PBS); Desafiado (#): controle positivo (D. mBSA). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi

utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Os diésteres octílicos foram capazes de reduzir o acúmulo total de leucócitos e de células polimorfonucleares de forma estatisticamente significativa em todas as doses avaliadas, resultado semelhante ao observado para o perfil dose/resposta no ensaio de artrite aguda induzida por LPS (Figura 60). Nenhuma das amostras ensaiadas foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa os outros parâmetros inflamatórios avaliados, incluindo a dexametasona, o que evidencia que tanto o ATA quanto os diésteres octílicos apresentam desempenho semelhante à dexametasona na redução de polimorfonucleares. Portanto, o ensaio de AIA agudo permite inferir que a atividade anti-inflamatória do ATA e da mistura de diésteres octílicos está especialmente associada à redução de um tipo celular específico, os neutrófilos.

Os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio e mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e CXCL-1, todos relacionados à progressão do quadro de AR e ao dano tissular. Conseqüentemente, a redução do acúmulo de neutrófilos nas articulações acometidas apresenta íntima relação com a atenuação do quadro fisiopatológico da doença (WALDBURGER & FIRESTEIN, 2009; KOLACZKOWSKA & KUBES 2013).

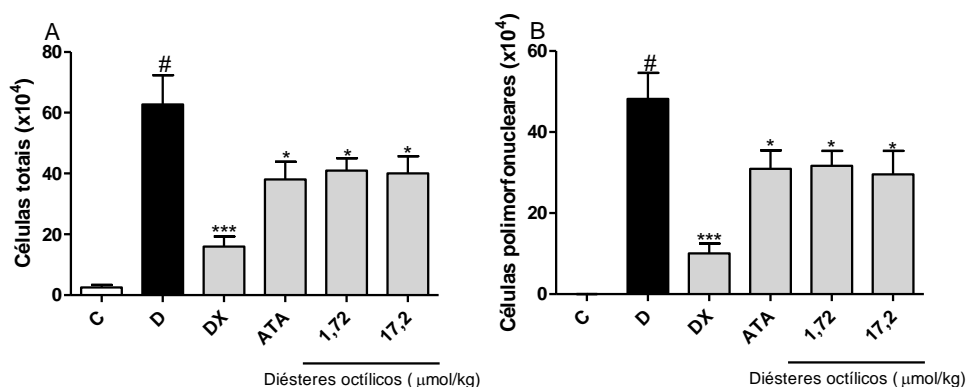
Garcia et al. (2016b) avaliaram a atividade antiartrítica do extrato hidroetanólico a 70% de *E. grandiflorus*, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg em modelo de AIA. O extrato foi ativo em todas as doses ensaiadas, promovendo redução do acúmulo celular e de citocinas pró-inflamatórias. A análise química do extrato revelou a presença de quantidades expressivas de ATA (7,41% m/m no extrato hidroetanólico 70%). Tendo em vista a atividade observada do extrato e o alto teor de ATA nesta preparação, sugere-se que presença do ATA e a atividade antiartrítica estão correlacionadas, fato que corrobora os dados observados no presente estudo uma vez que doses de 3 mg/kg foi capaz de reduzir o acúmulo de leucócitos total e de células polimorfonucleares em modelo de AIA (Figura 65).

### **5.5.3 Avaliação da atividade antiartrítica do ATA em modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA)**

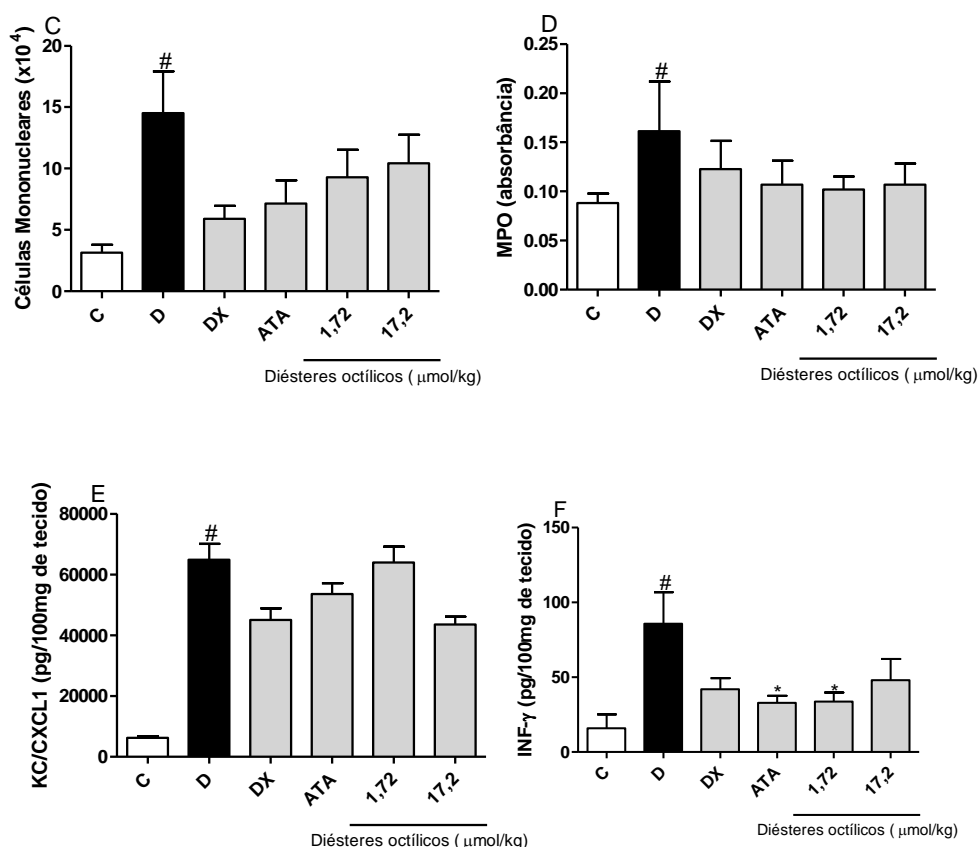
O modelo de artrite crônica induzida por antígeno consiste em duas imunizações seriadas, seguidas de dois desafios com mBSA, e o tratamento é realizado a partir do segundo desafio. Esta sequência de imunizações associadas ao duplo desafio leva o camundongo a desenvolver uma artrite de maior severidade, com fisiopatologia semelhante a quadro de artrite reumatoide em estágio avançado uma vez que além do aumento do acúmulo celular e de citocinas pró-inflamatórias, é possível observar características histopatológicas peculiares como destruição da membrana sinovial, reabsorção de neutrófilos para o tecido ósseo e erosão óssea (Wengner et al., 2007; Queiroz-Junior et al., 2011).

A mistura de diésteres octílicos (17,2 e 1,72  $\mu\text{mol/Kg}$ ) e o ATA (172,2  $\mu\text{mol/Kg}$ ) foram avaliados quanto a atividade antiartrítica em modelo de artrite crônica induzida por antígeno. As doses foram definidas de acordo com a atividade observada nos ensaio de AIA aguda (vide item 5.5.20). Os resultados sobre o acúmulo celular, concentração de MPO e citocinas estão apresentados na figura 66.

**Figura 66 - Avaliação da atividade antiartrítica do ATA (172  $\mu\text{mol/Kg}$ ) e de diésteres octílicos (17,2 e 1,72  $\mu\text{mol/Kg}$ ) em modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA crônica).**







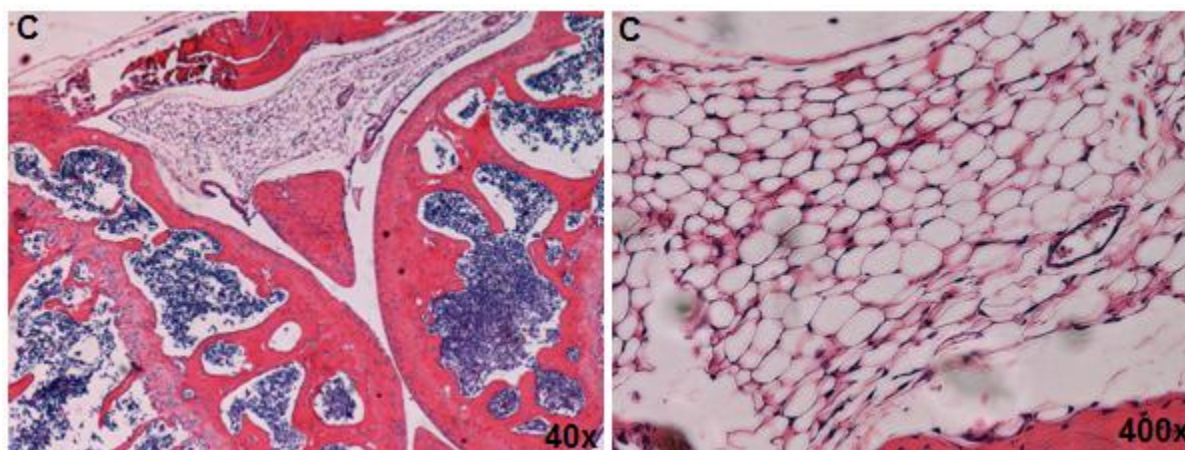
**Nota:** Efeito induzido nos animais em jejum, tratados com veículo, ácido *trans*-aconítico (ATA) e diésteres octílicos em diferentes doses no acúmulo de células totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) para a cavidade articular, concentração de MPO (D), KC/CXCL-1 (E) e INF-γ (F) no tecido periarticular 24 horas após desafio com mBSA (10 μg/cavidade). Controles: controle negativo (C) (PBS; #); Desafiado: controle positivo (D; mBSA). DX: Dexametasona (10 mg/kg) foi utilizada como fármaco de referências nos ensaios. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média ( $n=6$  animais por grupo). (\*): diferença significativa em relação ao desafiado ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

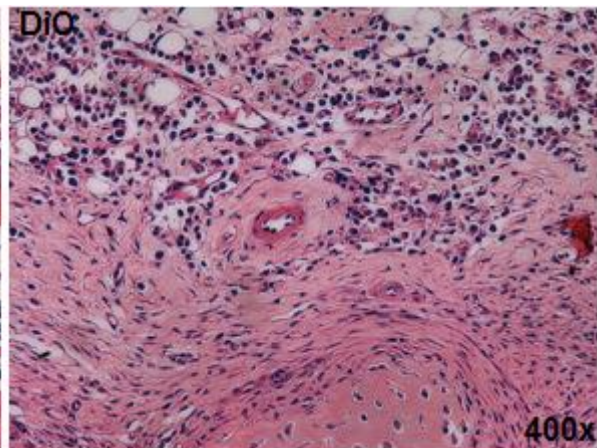
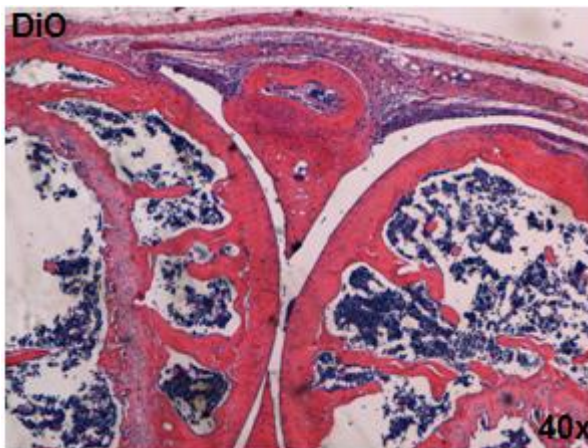
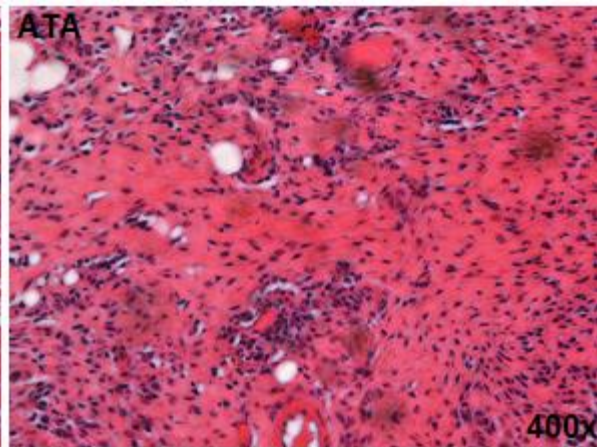
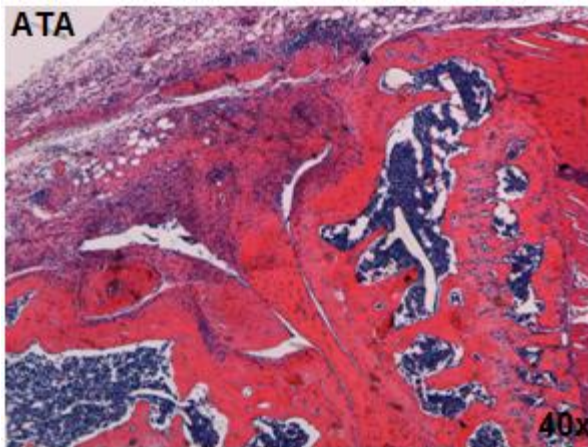
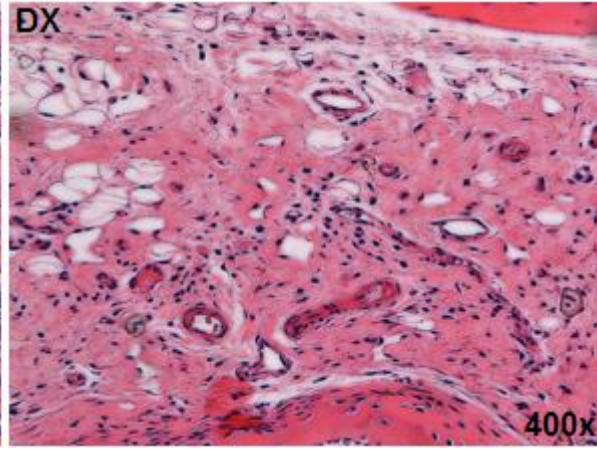
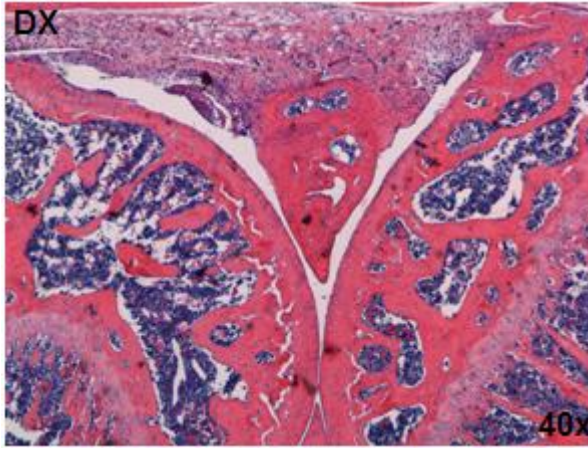
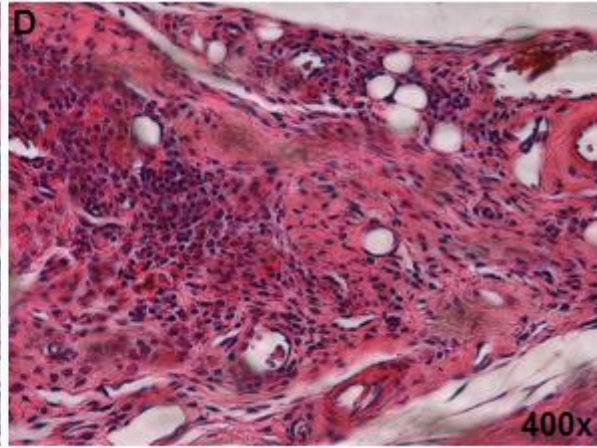
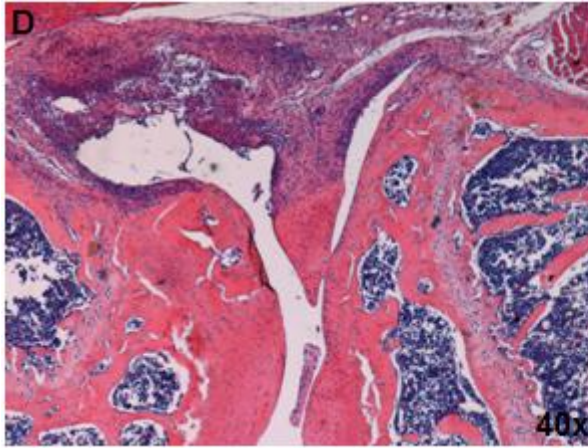
O ATA e a mistura de diésteres octílicos reduziram o acúmulo de leucócitos totais e de células polimorfonucleares de forma estatisticamente significativa, atividade não observada na redução de células mononucleares. Como no experimento crônico ocorre duplo desafio com mBSA, sugere-se que as células mononucleares presentes se subdividem em monócitos e macrófagos, uma vez que este último tipo celular ocorre de forma mais tardia na inflamação com objetivo de atuar na fase de resolução do processo inflamatório (NATHAN & DING, 2010). O ATA e os diésteres octílicos (1,72 μmol/Kg) reduziram a concentração de INF-γ no

tecido periarticular. Este interferon é produzido principalmente por linfócitos Th1 e células NK, e atua na ativação de macrófagos, expressão de HLA de classe II e ativação de células NK, promovendo a diferenciação de células Th em Th1 (JACOB et al., 1989; ANGIOLILLI et al., 2016). Portanto sua diminuição atenua a resposta mediada principalmente por macrófagos e linfócitos.

Em seguida foram realizadas análises histopatológicas (Figura 67) com finalidade de avaliar os parâmetros inflamatórios no tecido da articulação injuriada.

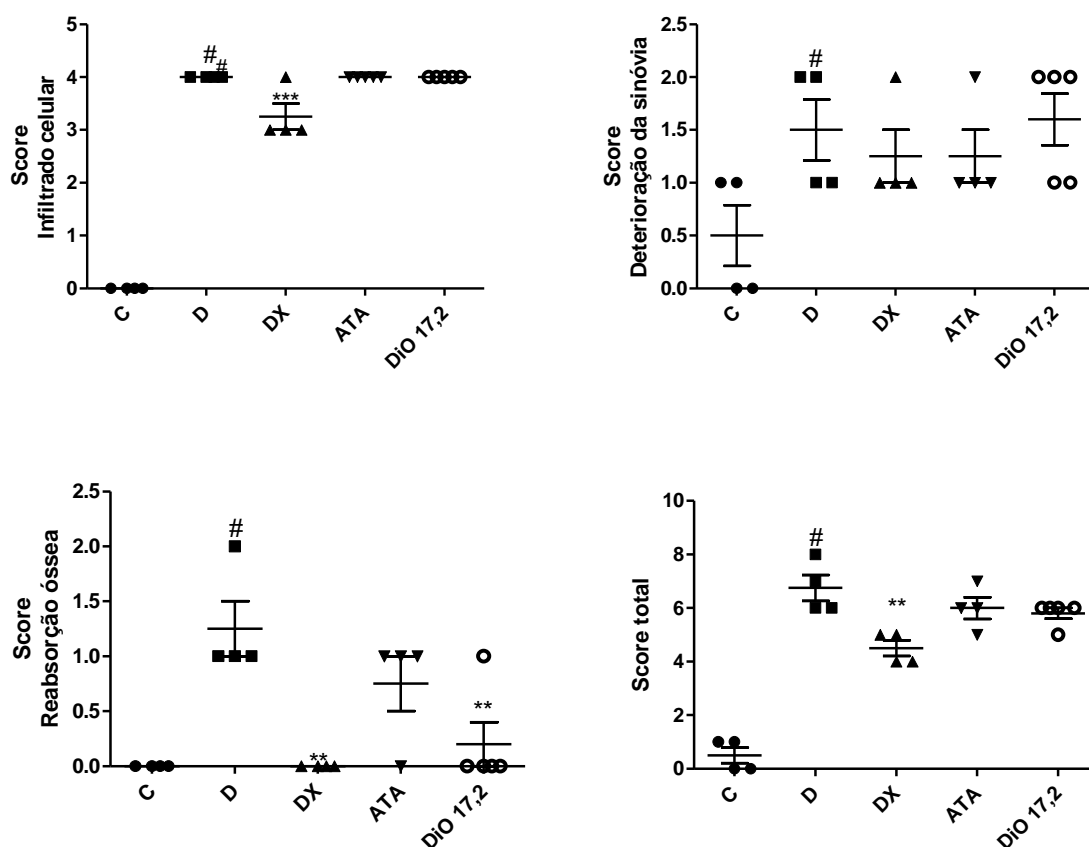
**Figura 67 - Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial (aumento de 40 e 400 vezes) de animais tratados com veículo (CMC) desafiados com PBS (controle negativo; C) e desafiados com antígeno (controle positivo; D), tratados com dexametasona (10 mg/kg; DX), com ácido *trans*-aconítico (172  $\mu\text{mol/Kg}$ ; ATA) e com os diésteres octílicos (17,2  $\mu\text{mol/Kg}$ ; DiO) no modelo de artrite crônica induzida por antígeno (AIA crônica).**





Estes resultados foram avaliados e classificados em um score histopatológico, considerando os principais aspectos relacionados à integridade da articulação acometida (infiltrado celular, integridade da sinóvia e reabsorção óssea). A figura 68 apresenta o score relacionado a cada parâmetro avaliado de forma isolada e o score total.

**Figura 68 - Avaliação da score de artrite determinado histologicamente para o veículo (CMC), dexametasona (10 mg/kg), ATA (172  $\mu$ mol/Kg) e para a mistura de diésteres octílicos (17,2  $\mu$ mol/Kg; DiO)**



**Nota:** Controle negativo (C; PBS). Controle positivo (D; #); Controle positivo dexametasona (DX; 10 mg/kg). (\*): Diferença significativa em relação ao grupo desafiado (D) ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,005^{***}$ , ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls).

Nenhuma das substâncias avaliadas foi capaz de reduzir a deterioração da sinóvia. Os diésteres octílicos diminuíram a reabsorção óssea e a dexametasona diminuiu o infiltrado celular, a reabsorção óssea e o score total de forma estatisticamente significativa. A partir desses resultados, associados à análise

histopatológica, pode-se concluir que o ATA e os diésteres octílicos proporcionaram uma discreta melhora do quadro inflamatório crônico e que os diésteres octílicos diminuíram o dano ósseo provocado pelo quadro inflamatório. Sugere-se que esta menor atividade observada no modelo crônico em comparação ao modelo agudo se deva ao tipo celular afetado pelos tratamentos. Conforme citado anteriormente, no modelo agudo há prevalência de neutrófilos, enquanto no modelo crônico observou-se mononucleares sugestivos da presença de macrófagos.

Garcia (2011) relatou que o tratamento com ATA (90 mg/kg) em modelo de AIA aguda reduziu o infiltrado leucocitário no tecido periarticular, avaliado por análises histopatológicas, bem como promoveu a melhora no score total de artrite. Este fato que reforça a hipótese de que o ATA e seus derivados atuam primariamente em células polimorfonucleares, em especial neutrófilos, uma vez que este tipo celular é o polimorfonuclear prevalente no modelo de AIA, reforçando a hipótese levantada.

Shi et al. (2014) avaliaram a atividade antiartrítica do flavonoide luteolina nas doses de 10 e 20 mg/kg em ratos, em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). A administração da luteolina se deu a partir do 18º dia da imunização previa com o CFA, até o 24º dia. Os autores verificaram redução das manifestações clínicas, melhora do quadro inflamatório pela análise histopatológica e supressão da produção de citocinas como IL-6, IL-17, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , não havendo diferenças significativas entre a atividade nas doses avaliadas. O ATA foi capaz de reduzir o acúmulo de leucócitos totais e de neutrófilos na dose de 3 mg/kg em modelo de AIA, em camundongos previamente imunizados com CFA (figura 67). Destaca-se, ainda, que o ATA foi administrado em dose única, enquanto o estudo com a luteolina se deu em tratamentos múltiplos em intervalos de 6 dias. Apesar das diferenças entre os modelos impedirem uma comparação direta, pode-se inferir que o ATA apresenta maior potência.

Os resultados obtidos indicam que o ATA e a mistura de diésteres octílico apresentam atividade anti-inflamatória associada principalmente à redução do acúmulo neutrofílico na cavidade articular injuriada, exercendo pouco efeito nas células residentes e resolutivas como os macrófagos.

## 6 CONCLUSÕES

Foram obtidos sete lotes de microesferas mucoadesivas com diferentes proporções de ATA e dos polímeros HPMC e carbopol. Um método de CLAE-DAD foi desenvolvido e empregado para quantificação de ATA nos diferentes lotes de microesferas obtidos. A formulação F3c apresentou maior taxa de encapsulação de ATA e foi caracterizada quanto suas características morfológicas e físico-químicas.

A formulação F3c, contendo HPMC, carbopol e ATA na mesma proporção (m/m), induziu uma resposta anti-inflamatória mais prolongada em modelo de artrite aguda induzida por LPS, em comparação ao ATA administrado na forma livre.

Foram sintetizados mono-, di- e triésteres do ATA com etanol, *n*-butanol e *n*-octanol pela reação de esterificação de Fisher. Os mono- e diésteres de cada álcool foram obtidos como misturas de isômeros constitucionais, enquanto os triésteres foram obtidos puros. Todos os produtos (puros e misturas isoméricas) foram caracterizados por técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Os ésteres de diferentes classes, bem como o ATA, apresentaram atividade em modelo murino de artrite aguda induzida por LPS, sendo os diésteres *n*-octílicos os derivados mais ativos. Estes diésteres e o ATA apresentaram atividade em modelos agudo e crônico de AIA, sendo o efeito anti-inflamatório associado à redução do acúmulo neutrofílico na cavidade fêmur-tibial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N.; KUMAR, V. *Robbins Basic Pathology*. 9° ed, Elsevier Health Sciences, 2008.
- AHMAD, R.; RAINA, D.; MEYER, C.; KHARBANDA, S.; KUFÉ, D. Triterpenoid CDDO-Me blocks the NF- $\kappa$ B pathway by direct inhibition of IKK $\beta$  on Cys-179. *J Biol Chem*, v. 281, n. 47, p.35764-35769, 2006.
- AKHTAR, M.J.; JACQUOT, M.; JASNIEWSKI, J.; JACQUOT, C.; IMRAN, M.; JAMSHIDIAN, M.; PARIS C.; DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydr Polym*, v.89, p 1150-1158, 2012.
- ANGIOLILLI, C.; GRABIEC, A. M.; FERGUSON, B. S.; OSPELT, C.; FERNANDEZ, B. M.; VAN ES, I. E.; BAARSEN, L. G. M.V.; GAY, S.; MCKINSEY, T. A.; TAK, P. P.; BAETEN, D. L.; REEDQUIST, K. A. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. *Ann Rheum Dis*, v. 75, n. 2, p. 430-438, 2016.
- ANDERSEN, P.H.; JENSEN, N.J. Mutagenic investigation of flavourings: dimethyl succinate, ethyl pyruvate and aconitic acid are negative in the Salmonella/mammalian-microsome test. *Food Addit Contam*, v.1, n.3, p.283-288, 1984.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, Jr. L. V. *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6 ed. São Paulo: Ed Premier, 2000. p.548.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. <[http://www.aoac.org/Official\\_Methods/slv\\_guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf)>
- BARSANTE, M.M.; CUNHA, T.M.; ALLEGRETTI, M.; CATTANI, F.; POLICANI, F.; BIZZARRI, C. TAFURI, W.L.; POOLE. S.; CUNHA, F.Q.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, M.M. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, v. 153, p. 992-1002, 2008.
- BARSANTE, M.M.; ROFFE, E.; YOKORO, C.M.; TAFURI, W.L.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; CASTRO, M.S.A.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol*, v. 516, p. 282-289, 2005.
- BENREZZOUK, R.; TERCENIO, M.C.; FERRANDIZ, M.L.; SAN FELICIANO, A.; GORDALIZA, M.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; DE LA PUENTE, M.L.; ALCARAZ, M.J. Inhibition of humans PLA2 and 5-lipoxygenase activities by two neo clerodane diterpenoids. *Life Sci*, v.64, n.19, p.205-211, 1999.
- BERDEAUX, O.; FONTAGNÉ, S.; SÉMON, E.; VELASCO, J.; SÉBÉDIO, J. L.; DOBARGANES, C. A detailed identification study on high-temperature degradation

products of oleic and linoleic acid methyl esters by GC–MS and GC–FTIR. *Chem Phys Lipids*, v. 165, n. 3, p. 338-347, 2012.

BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; LOPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLAN, R. L. E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. *Arch.Chem. Life Sci.*, v. 338, p. 87-95, 2005.

BOND, L.; ALLEN, S.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C. J.; SHIVJI, A. P.; TENDLER, S. J.; WILLIAMS, P. M.; ZHANG, J. Differential scanning calorimetry and scanning thermal microscopy analysis of pharmaceutical materials. *Int J Pharm*, v. 243, n. 1, p. 71-82, 2002.

BRADFORD, B. J.; YUAN, K.; FARNEY, J. K.; MAMEDOVA, L. K.; CARPENTER, A. J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J Dairy Sci*, v. 98, n.10, p. 6631-6650, 2015.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, 02.06.03.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166 de 24.07.17. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos”. *Diário Oficial da União*, 25.07.17.

BRASIL. Ministério da saúde. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS - CONITEC - 12. 2012

BRUSCHI ML, FREITAS O. Oral bioadhesive drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 31, p. 293-310, 2005.

BURDOCK G.A. Safety assessment of hidroxipropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*, v. 45, p 2341-2351, 2007.

BURNS, C. M.; WORTMANN, R. L. Gout therapeutics: new drugs for an old disease. *The Lancet*, v. 377, n. 9760, p. 165-177, 2011.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta médica da Bahia*, v. 78, n.1, 2008.

CAO, H.; ZHENG, Y.; ZHOU, J.; WANG, W.; PANDIT, A. A novel hyperbranched polyester made from aconitic acid (B3) and di(ethylene glycol) (A2). *Polym Int*, v. 60, p. 630–634. 2011.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Int J Pharmaceutics*, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.



CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Cham e Schl. Mitch, Alismataceae). *Rev Bras Farm*, v.84, n.1, p.5-7, 2003.

CARVALHO, J. C.; SILVA, M. F.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med*, v.62, n.5, p. 402-404, 1996.

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics*, v.75, p.4207–4231, 2012.

CHAMPAGNE, C. P. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol*, v. 149, p. 185-193, 2011.

CHANDRAKALA, V.; SARAL, A. M. Quality by design approach in formulation of bioadhesive levodopa microspheres. *Int J of Pharmacy and Pharm Sci*, v. 5, n. 4, p. 172-178, 2013.

CHANG, S. K.; GU, Z.; BRENNER, M. B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev*. v. 233, p. 256–266, 2010.

CHATURVEDI, D.; DWIVEDI, P. K.; CHATURVEDI, A. K.; MISHRA, N.; SIDDIQUI, H. H.; MISHRA, V. Semisynthetic hybrids of boswellic acids: a novel class of potential anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Med Chem Res*, v. 24, n. 7, p. 2799-2812, 2015.

CLEMENTE, G. Estudo comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para cálculo da lipofilia molecular. *Saúde Tecnologia*, p. 29-34, 2011.

COELHO, F. M. Efeito do antagonista do receptor CXCR2, repertaxina, na resposta inflamatória em modelo experimental de artrite. Dissertação, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A.; SACHS, D.; COSTA, V.V.; RORIGUES, D.H.; VIEIRA, A.T.; SILVA, T.A.; SOUZA, D.G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced 187 arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum*. v. 58, p. 2329-2337, 2008.

COIMBRA, P. M. A. Preparação e Caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural. Coimbra, 2010. Dissertação (Doutorado: Engenharia química). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; PICHAVANT, F. H.; DESCHAMPS, A. Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate polymers*, v. 51, n.3, p. 265-271, 2003.

Convention USP. The United States Pharmacopeia 38. National formulary 33. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2015

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. *Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica*. 6. ed. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, p. 110-111, 1998.

CORREA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. v.2. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p 205 e p 214-215, 1931.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim et Biophys Acta*, v. 1830, n. 6, p.3670-3695, 2013.

CROFT, M.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nature Rev*, v. 12, p.1647-1668, 2013.

CRUZ, G.L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 3ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira S.A. p.229, 1985.

CRUZ, G.L. *Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil*. 1ed. Belo Horizonte, p.314-315, 1965.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e Regulador da Transcrição Gênica Via Fator de Transcrição NFKB. *Revista da Biologia*, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUNHA, F. V. M.; DE SOUSA GOMES, B.; DE SOUSA NETO, B.; FERREIRA, A. R.; DE SOUSA, D. P.; DE ASSIS OLIVEIRA, F. Ferulic acid ethyl ester diminished Complete Freund's Adjuvant-induced incapacitation through antioxidant and anti-inflammatory activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 389, n. 1, p. 117-130, 2016.

DAHL, T.; LING, T.; YEE, J.; BORMETH, A. Effects of various granulating systems on the bioavailability of naproxen sodium from polymeric matrix tablets. *J Pharm Sci*, n.79, p. 389-392, 1990.

DAVIS, A. M.; RILEY, R. J. Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities. *Curr Opin Chem Biol*, v. 8, n.4, p. 378-386, 2004.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Princípios e Aplicações de Análise Térmica. Curso teórico/prático. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. São Carlos – SP, 2012.

DUARTE, M.G.R.; SOARES, I.A.A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R.L.R.P.; FERREIRA, M.D.; SILVA, C.R.F.; OLIVEIRA, A.B. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. *Rev Lecta*, v.20, n.2, p.177-182, 2002.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; & CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*, v.112, p. 4-29, 2016.

EL-HAMEED, M. A., & KELLAWAY, I. W. Preparation and in vitro characterisation of mucoadhesive polymeric microspheres as intra-nasal delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 44; n.1, p.53-60, 1997.

FANG, Z. & BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Sci Technol*, v. 21, n.10, p. 510-523, 2010.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J Agric Food Chem*, v. 50, n. 12, p. 3579-3585, 2002.

FELDMANN M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Rev Immunol*. v.2, n.5, p. 364-371, 2002.

FERNANDES, J.P.S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A.C.G.; SOUSA, M.R.; SILVA, G.R.; CIANCIULLI, M.E.; FERRARINI, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. *Quim. Nova*. 2013; v. 36, n. 6, p.890-893, 2013.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEUGA, F. Sistemas mucoadesivos de administração de Fármacos na cavidade oral: Mecanismo de mucoadesão e polímeros mucoadesivos. *Rev. Lusófona de ciências e Tecnologias da saúde*. v. 4, p. 216-233, 2007.

FISCHER E, SPEIER A. *Chemische Berichte* 1895, 28, 3252; March, J, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons: New York, 1992.

FONSECA, A.L. *Interações Medicamentosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas Ltda, 2000.

FROMMER, K. W.; ZIMMERMANN, B.; MEIER, F. M.; SHRODER, M. H.; SHAFFLER A.; BUCLER, C.; STEINMEYER, J. BRENTANO, F.; GAY, STEFFEN.; LADNER, U. M.; NEUMANN, E. Adiponectin-Mediated Changes in Effector Cells Involved in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 62, n. 10, p. 2886–2899, 2010.

GARCIA, E. F. Quantificação de Marcadores Químicos e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória de *Echinodorus Grandiflorus* (Cham & Schltdl) Micheli (Chapéu-De-Couro). Belo Horizonte: 2011. 316f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2011.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; CANDIDO, L. C.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; BOFF, D.; AMARAL, F. A.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. Effect of the Hydroethanolic Extract from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and a Fraction Enriched in Flavone-C-Glycosides on Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Planta Med*, v.82, n.05, p.407-413, 2016b.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; DOURADO, L. P. A.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. *In vitro* TNF- $\alpha$  inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. *Planta Med*, v.82, n.04, p.337-343, 2016a.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; BASTOS, L. F.; COELHO, M. M.; BRAGA, F. C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*. v. 18, p. 80–86, 2010.

GARUD, N. & GARUD, A. Preparation and in-vitro evaluation of metformin microspheres using non-aqueous solvent evaporation technique. *Trop J Pharm Res*, v. 11, n.4, p. 577-583. 2012.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biophar*, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. (2008). Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *Eur J Pharm Biophar*, v. 68, n. 2, p.245-252, 2008.

GAVINI, V.; KONIJETI, S. R.; NAGARAJU, T. S. FORMULATION AND INVITRO EVALUATION OF VESICULAR DRUG DELIVERY SYSTEM ENCAPSULATED WITH ZIDOVUDINE. *World J Pharmacy Pham Sci*, 2015.

GOMEZ-CARRACEDO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C.; GOMEZ-AMOZA, J. L.; CONCHEIRO, A. Glass transitions and viscoelastic properties of Carbopol® and Noveon® compacts. *Int J Pharm*, v. 274, n. 1, p. 233-243, 2004.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, v.29, p. 415–445, 2011.

GRESPLAN, R.; FUKADA, S.Y.; LEMOS, H.P.; VIEIRA, S.M.; NAPIMOGA, M.; TEIXEIRA, M.M., FRASER, A.R.; LIEW, F.Y.; MCINNIS, I.B.; CUNHA, F.Q. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. v. 58, p. 2030-2045, 2008.

GUERREIRO R.; SANTOS-COSTA Q.; AZEVEDO-PEREIRA J. M. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. *Acta Med Port*, v.4, p.967-76, 2011.

HAKEN, V. *Interações entre drogas e nutrientes*. In: MAHAN, L.K. ESCOTT-STUMP, S. Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 386-400.

HARDENIA, S. S.; JAIN, A.; PATEL, R.; KAUSHAL, A. Formulation and evaluation of mucoadhesive microspheres of ciprofloxacin. *J Adv Pharm Ed Res*, v. 1, n.4, p. 214-224, 2011.

HARDING, L.; QI, S.; HILL, G.; READING, M.; CRAIG, D. Q. M. The development of microthermal analysis and photothermal microspectroscopy as novel approaches to drug–excipient compatibility studies. *Int J Pharm*, v. 354, n. 1, p. 149-157, 2008.

HARRIS, R.; LEUCUMBERRI, E.; APARICIO, I. M.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydr Polym*. v. 84, p. 803–806, 2011.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm*, v. 166, n. 1, p. 75-88, 1988.

HENRIQUES, B.O.; CORRÊA, O.; AZEVEDO, E.P.C.; PÁDUA, R.M.; OLIVEIRA V.L.S.D.; OLIVEIRA, T.H.C.; BOFF, D.; DIAS, A.C.F.; SOUZA, D.G.; AMARAL, F.A.; TEIXEIRA, M.M.; CASTILHO, R.O.; BRAGA, F.C. *In Vitro* TNF-inhibitory activity of brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis Model. *Evid Based Complem Alternat Med*. 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9872598>.

HERAS, B.; ABAD, M. J.; SILVÁN, A. M.; PASCUAL, R.; BERMEJO, P.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A. M. Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sci*, v. 70, n.3, p. 269-278, 2001.

HIDALGO, M. A.; HANCKE, J. L.; BERTOGLIO, J. C.; BURGOS, R. A. Andrographolide a New Potential Drug for the Long Term Treatment of Rheumatoid Arthritis Disease. *Innovative Rheum*. Intech. <http://dx.doi.org/10.5772/55642>. 2013.

HIRATA, A.N.; BRUSCHI, M. L.; Development and characterisation of semisolid systems to deliver propolis in the oral cavity. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 31, n. 1, p. 33-39, 2010.

HÖTER, D., & DRESSMAN, J. Influence physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 46, p. 75-87, 2001.

ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H.; OKUYAMA, S.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; MOTIDOME, M.; ITOKAWA, H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: antiinflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Med*, v. 58, n.6, p. 549-551, 1992.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.

ISOBE Y.; KATO T.; ARITA M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Front Immunol*, v.3, 2012.

JANA, R. N., NANDO, G. B., & KHASTGIR, D. Compatibilised blends of LDPE and PDMS rubber as effective cable insulants. *Plastics, Rubber Composites*. 2013.

JACOB, C. O.; HOLOSHITZ, J.; VAN DER MEIDE, P.; STROBER, S.; MCDEVITT, H. O. Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis. *J Immunol*, v. 142, n. 5, p. 1500-1505, 1989.

JOSÉ, N. M.; SOUZA, C. M. L.; YOSHIDA, I. V. P.; FELISBERTI, M. I. Síntese de redes à base de PDMS e reticulantes dendríticos. In :*Congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais*. 14. São Pedro, 2000.

KAWADKAR, J.; CHAUHAN, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Eur J Pharm Biophar*, v. 81, n. 3, p. 563-572, 2012.

KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesin and Mucoadhesive Polym *Macromol Biosci*, v. 11, p. 748–764, 2011.

KIM, H. J.; KIM, T. H.; KANG, K. C.; PYO, H. B.; JEONG, H. Microencapsulation of rosmarinic acid using polycaprolactone and various surfactants. *Int J Cosmetic Sci*, v. 32, p. 185–191, 2010.

KIRBY, B. J.; HASSELBRINK, E. F. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis*, 25(2), 203-213.

KOCKISCH, S.; REES, G. D.; TSIBOUKLIS, J.; & SMART, J. D. (2005). Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 59, n. 1, p. 207-216, 2005.

KOLACZKOWSKA, E., & KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev Immunol*, 13(3), 159-175, 2013.

KOLAH, A. K.; ASTHANA, N. S.; VU, D. T.; LIRA, C. T.; MILLER, D. J. Reaction Kinetics of the Catalytic Esterification of Citric Acid with Ethanol. *Ind. Eng. Chem.*, v. 46, p. 3180-3187, 2007.

KUMBAR, S. G., KULKARNI, A. R., & AMINABHAVI, T. M. (2002). Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. *J Microencap*, v. 19, n.2, p. 173-180, 2002.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR,S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*, v. 1, p. 147–168, 2012.

LEMONS, H.P.; GRESPAN, R.; VIEIRA, S.M.; CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; FERNANDES, K.S.S.; SOUTO, F.O.; MCINNES, I.B.; FERREIRA, S.H.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q. Prostaglandin mediate IL-23/IL-17-induced neutrophils migration in inflammation by inhibiting IL-12 INFg production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, p. 5954-5959, 2009.

LESSA, M.A.; ARAÚJO, C.V.; KAPLAN, M.A.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M.R.; TIBIRIÇA, E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundamen Clin Pharmacol*, v.22, n. 2, p.161-168, 2008.

LEWIS, R.J. SR. (ed) Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 11th Edition. Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 2004., p. 72

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. v. 23, n 1, p. 4-17, 1997.

LIU, Y.; LOTERO, E.; GOODWIN, J. G. Effect of carbon chain length on esterification of carboxylic acids with methanol using acid catalysis. *J Catal*, v. 243, n. 2, p. 221-228, 2006.

LIU, Z.; LU, W.; QIAN, L.; ZHANG, X.; ZENG, P.; PAN, J. *In vitro* and *in vivo* studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin. *J Control Release*, v. 102, p. 135–144, 2005.

LORENZI, H. *Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.43, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p.39-40.

LOW, T.; RODD, T.; BERESFORD, R. (Ed.). Segredos e virtudes das plantas medicinais. Rio de Janeiro: Reader's Digest do Brasil, p.172, 1999.

LU, Y.; XIAO, J.; WU, Z. WANG, Z. HU, J.; FU, H.; CHEM, Y.; QIAN, R. Q. Kireinol exerts a potent anti-arthritic effect in collagen-induced arthritis by modifying the T cells balance. *Phytomedicine*, v.19, n. 10; p. 882-889, 2012.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J, L.; BRASILEIRO, M. T.; DE LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas matriciais hidrofílicos emucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Latin American J Pharmacy*, v.26, n. 5, p. 784-93, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F.; COLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol*, v.70, n. 1, p.41-55, 2000.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex. *Eur J Pharm Sci*, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.

MANNS, D.; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Med*, v.59, n. 5, p.465-466, 1993.

MANSK, R. G.; WILSON, M.; FLEISHMAN, R.; OLSEN, N.; SILVERFILD, J.; KEMPF, P.; KIVITZ, A.; SHERRER, Y.; PUCINO, F.; CSAKO, G.; COSTELLO, R.; PHAM, T. H.; SNYDER, C.; HEIJDE, D. V. D.; TAO, X.; WELSLEY, R.; LIPSKY, P. E. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F Versus Sulfasalazine in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med.* v. 151, n.4, p.229-240, 2009.

MARINA, K.; ANSU, J.; PRABHAKARA, P.; GIRISH, S. N. Mucoadhesive microspheres of famotidine for gastro retentive drug delivery. *Int J Drug Development and Res.* 2012

MARTEL, B.; DEVASSINE, M.; CRINI, G.; WELTROWSKI, M.; BOURDONNEAU, M.; MORCELLET, M. Preparation and sorption properties of a  $\beta$ -cyclodextrin-linked chitosan derivative. *J Polym Sci A: Polym Chem*, v. 39, n.1, p. 169-176, 2001.

MARTINS, A.B. Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas. Dissertação, Universidade Estadual "Julio Mesquita Filho" campus de Araraquara, Araraquara, 2010.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas Mediciniais*. Viçosa: Editora UFV, 1998. p.106.

MATOS, C.S.; BURLINI, L.S.; PIMENTA, D.; FIGUEIREDO, M.R.; TIBIRIÇA, E. Estudo dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-hipertensivo de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus*. In: Latinamerican Congress of Pharmacology, 16, 2000, Águas de Lindóia. *Anais São Paulo: ALF*, 2000. p.222.

MCNULTY, J.; CHEEKOORI, S.; NAIR, J. J.; LARICHEV, V.; CAPRETTA, A.; ROBERTSON, A. J. A mild esterification process in phosphonium salt ionic liquid. *Tetrahedron Letters*, v.46, p. 3641–3644, 2005.

MEFFERT, M. K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF- $\kappa$ B. *Trends Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 37-43, 2005.

MIDHA, K.; NAGPAL, M.; & ARORA, S. MICROSPHERES: A RECENT UPDATE. *Int J Recent Sci Res*, v. 6, n. 8, p. 5859-5867, 2015.

MISHARIN A. V.; HAINES K. T.; ROSE S.; GIERUT A.; HOTCHKISS R. S., PERLMAN H. Development of a new humanized mouse model to study acute inflammatory arthritis. *J Transl Med*, v.10, n.1, p.1, 2012.

MISRA, S.; SANYAL, T.; SARKAR, D.; BHATTACHARYA, P.K.; GHOSH, D.K. Evaluation of antileishmanial activity of *trans*-aconitic acid. *Biocheml Med Metabolic Biology*, v.42, n.3, p.171-178, 1989.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*, 2010.

MORCILLO, S. P.; CIENFUEGOS, L. A.; MOTA, A. J.; JUSTICIA J.; ROBLES, R. Mild Method for the Selective Esterification of Carboxylic Acids Based on the Garegg-Samuelsson Reaction. *J Org Chem*, v. 76, p. 2277–2281, 2011.



MOURA, M. R. L., & REYES, F. G. R. Drug-nutrient interaction: a review. *Revista de Nutrição*, v. 15, n.2, p. 223-238, 2002.

NALLASAMY, V. & RAMANATHAN, S. Role of novel drug delivery systems in stomach specific anti-helicobacter pylori therapy. *J Pharm Res*, v.5, n.2, p. 1165-1168, 2012.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, n.6, p. 871-882, 2010.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci*, v.1, p.1806-1815, 2011.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, v.79, n.3, p.629-661, 2016.

NUNES, I. K. C. A Importância do Estudo do Metabolismo nos Estágios Iniciais de desenvolvimento de Fármacos. *Rev Virtual Quím*, v.7, n.2, p.649-662, 2015.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. *Rev Virtual Química*, v. 6, n.1, p. 152-167, 2013.

O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev*, v.28, p. 25-42, 1997.

OCHIUZ, L.; POPA, G.; STOLERIU, I.; TOMOIAGĂ, A. M.; POPA, M. Microencapsulation of metoprolol tartrate into chitosan for improved oral administration and patient compliance. *Industrial Eng Chem Res*, v.52, n.49, p.17432-17441, 2013.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. *Einstein*, v. 13, n.3, p.469-473, 2015.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int J Pharm*, v. 201, p. 131–150. 2000.

PANIZZA, S. *Plantas que curam: cheiro de mato*. 28. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p.79-80.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Revs*, v. 55, n.3, p. 329-347, 2003.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B.; MARCHI, L. F.; ANDRADE, M. F. D.; KABEYA, L. M.; DONADI, E. A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis:

Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. doi: 10.1155/2015/429878.

PARMAR, A.; MISHRA, A.; PATHAK, A. Preparation and evaluation of mucoadhesive microspheres of repaglinide for treatment of diabetes mellitus type II. *J Adv Pharm*, v.4, n.5, p. 72-82, 2015.

PATIL, S. B. & SAWANT, K. K. Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, v. 84, n. 2, p. 384-389, 2011.

PAUL, A.T.; GOHIL, V.M.; BHUTANI, K.K. Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products. *Drug Discov. Today*, v. 11, p. 725-732, 2006.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas Farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Rev Bras Ciênc Farm*, v. 43, n. 4, 491-502, 2007.

PIANG-SIONG, W.; CARO, P.; LACAZE-DUFAURE, C.; SING, A. S. C.; HOAREAU, W.; Effect of catalytic conditions on the synthesis of new aconitate esters. *Ind Crops Prod*, v. 35 203– 210. 2012.

PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R. KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltld.) Micheli (chapéu de couro) II- Análise por CLAE-UV de extratos aquosos e etanólicos de folhas coletadas sazonalmente. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 17, 2002, Cuiabá. *Anais*. Cuiabá: SPMB, 2002. p. Q1100.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *Int J Pharm*, v. 395, p. 44-52, 2010.

PODREZ, E. A.; ABU-SOU, H. M.; HAZEM, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, v.28, p. 1717-1725, 2000.

POHLERS, D.; NISSLER, K.; FREY, O.; SIMON, J.; PETROW, P.K.; KINNE, R.W.; BRÄUER, R. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigeninduced arthritis:influence on T helper cell activation. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 135, p. 409-415, 2004.

PREM, P.; SWAPNIKA, K.,; BABU, S. M. GENERAL METHODS USED IN FORMULATION OF MUCOADHESIVE MICROSPHERES AS NOVEL DRUG CARRIERS IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS-A REVIEW. *Mintage J Pharm Med Sci*, p. 1-6, 2017.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydr Polym*. v. 113, n. 0, p. 286-295, 2014.

PULFER, M.; MURPHY, R. C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev*, v. 22, n. 5, p. 332-364, 2003.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F. M.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; BESSONI, R. L. C.; DA CUNHA SOUSA, L. F.; GARLET, G. P.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; DA SILVA, T. A. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- $\alpha$  and the oral microbiota. *J Immunol*, v. 187, n. 7, p. 3821-3830, 2011.

RAMAZANI, F.; CHEN, W.; VAN NOSTRUM, C. F.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; HENNINK, E.; KOK, R. J. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges. *Int J Pharm*, v. 499, n.1, p. 358-367. 2016.

RANJHA, N. M.; KHAN, H.; NASEEM, S. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. *J Mater Sci: Materi Med*, v. 21, n. 5, p. 1621-1630, 2010.

REDDY, N.; JIANG, Q.; YANG, Y. Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. *Ind Crops Prods*, v. 39, p. 26-30, 2012.

REIS, N. T. *Nutrição Clínica Interações*. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Rubio Ltda, 2004. p. 138-163.

REKHI, G.G.; NELLORE, R.V.; HUSSAIN, A.S.; TILMAN, L.G.; MALINOWSKI, H.J.; AUGSBURGER, L.L. Identification of critical formulation and processing variables for metoprolol tartrate extended-release (ER) matrix tablets. *J Control Release*, v. 59, p. 327-342. 1999.

RIBEIRO-COSTA, R.; CUNHA, M.R.R.D.; GONGORA-RUBIO, M.; MICHALUART-JUNIOR, P.; RE, M. Preparation of protein-loaded-PLGA microspheres by an emulsion/ solvent evaporation process employing LTCC micromixers. *Powder Technol*, v. 190, p. 107–111, 2009.

ROLLINS, B.J. Chemokines. *Blood*, v. 90, p. 909-928, 1997.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; & WELLER, P. J. Handbook of pharmaceutical excipients. 6<sup>th</sup> ed. Pharmaceutical Press, London, England, 2009. *Hypromellose*. P. 438. Carbomer p 19

SACHS, D.; COELHO, F.M.; COSTA, V.V.; LOPES, F.; PINHO, V., AMARAL, F.A, SILVA, T.A.; TEIXEIRA, A.L.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Cooperative role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and neutrophils in a novel behavioral model that concomitantly evaluates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br. J. Pharmacol.*, v. 162, p. 72-83, 2011.

SAKAGUCHI, S., & SAKAGUCHI, N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Current Opinion Immunol*, v.17, n.6, p. 589-594, 2005.

SCHNITZLER, M. Phytochemische Untersuchungen der traditionellen brasilianischen Arzneipflanze *Echinodorus grandiflorus* ssp. aureus. Münster: 2005. 122f. Tese

(Doutorado em Ciências Naturais), Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms, Universität Münster, Münster, 2005.

SCHNITZLER M, PETEREIT F, NAHRSTEDT A. *Trans*-aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. aureus, a Brazilian medicinal plant. *Rev Bras Farmacog*, v. 17, n.2, p. 149–154, 2007.

SERHAN, C. N., WARD, P. A., & GILROY, D. W. *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press. 2010.

SHACKLETON, C. H.; CHUANG, H.; KIM, J.; DE LA TORRE, X.; SEGURA, J. Electrospray mass spectrometry of testosterone esters: potential for use in doping control. *Steroids*, v. 62, n. 7, p. 523-529, 1997.

SHEALY, D. J., WOOLEY, P. H., EMMELL, E., VOLK, A., ROSENBERG, A., TREACY, G XIAO-YU, R. S. Anti-TNF- $\alpha$  antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res Therap*, v. 4, n. 5, p. 1, 2002.

SHI, F.; ZHOU, D.; JI, Z.; XU, Z.; & YANG, H. Anti-arthritic activity of luteolin in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats by suppressing P2X4 pathway. *Chem Biol Interact*, v. 226, p. 82-87. 2015.

SHIMIZU, M.; TOMOO, T. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. *Biol Pharm Bulletin*, v.17, n. 5, p. 665-667, 1994.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*, v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA, A.M.; CYSNEIROS, R.M.; EMIM, J.A.S. Medicamentos e Aspectos Nutricionais. In: SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. *Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia*. São Paulo: Roca Ltda, 2007. p. 115-127

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Braz J Pharm Sci*, v. 39, p. 1-9, 2003.

SILVA, C.J.; BASTOS, J.K., TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol*, v.127, n.2, p.445-50, 2010.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F.; & DE OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *J Food Eng*, v. 117, n. 4, p. 538-544, 2013.

SILVA, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. *Revista Virtual de Química*, v.5, n.5, p.921-933, 2013.

SINGH, J. A.; SAAG, K. G.; BRIDGES, S. L.; AKL, E. A., BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; VAYSBROT, E.; MCNAUGHTON, C.; OSANI, M.; SHMERLING, R. H.; CURTIS, J. R.; FURST, D. E.; PARKS, D. KAVANAUGH, A.; O'DELL, J.; KING, C.; LEONG, A.; MATTESON, E. L.; SCHOUSBOE, J. T.; DREVLLOW, B.; GINSBERG, S.; GROBER, J.; ST.CLAIR, E. W.; TINDALL, E.; MILLER, A. M.; MCALINDON, T. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 68, n.1, p. 1-26, 2016.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M.; SINGH, A. Potential Applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: A review. *Drug Develop Ind Pharm*, v. 26, n. 9, p. 913-924, 2000.

SMART, J.D. The basis and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*, v.2, n. 6, p. 473-488. 2003.

SOUZA, D.G.; CARA, D.C.; CASSALI, G.D.; COUTINHO, S.F.; SILVEIRA, M.R.; ANDRADE, S.P.; POOLE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, v. 131, p. 1800-1808, 2000.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 90, n.1, p.135-143, 2004.

STAMP, L. K.; KHALILOVA, I.; TARR, J. M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER, R.; HAIGH, R. C.; WINYARD, P. G.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheum*, v. 51, n. 10, p. 1796-1803, 2012.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

TANAKA, C. M. A. *Constituintes químicos de cinco espécies de Echinodorus e avaliação do beta-pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados*. 202f. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TANAKA, D.; KAGARI, T.; DOI, H.; SHIMOZATO, T. Essential role of neutrophils in antitype II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunol*, v. 119, p. 195-202, 2006.

TIBIRIÇA, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.; KAPLAN, M.A.; LESSA, M.A.; FIGUEIREDO, M.R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol*, v. 111, n.1, p.50-55, 2007.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Therap*, v.117, n.2, p. 244-279, 2008.

VALENCIA, X.; STEPHENS, G.; GOLDBACH-MANSKY, R.; WILSON, M.; SHEVACH, E. M.; LIPSKY, P. E. TNF down modulates the function of human CD4+ CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, v.108, n.1, p.253-261, 2006.

VENSON, R.; WIENS, A.; CORRER, C. J.; OTUKI, M. F.; GROCHOCKI, M. G.; PONTAROLLI, D. R. S.; PONTAROLO, R. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná. *Rev Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 21, n, 2, p. 359-376, 2011.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química moderna. *Quim. Nova*, v. 29, N. 2, p. 326-337, 2006.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L. & CUNHA, A. S. (2010). Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, 20(1), 51-64.

WADE, A.; WELLER, P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. *The American Pharmaceutical Association*, p. 71, 2 ed., 1994a.

WALDBURGER, J.M.; FIRESTEIN, G.S. Garden of therapeutic delights: new targets in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.*, v. 11, p. 206-217, 2009.

WALTER-SACK, I.; KLOTZ, U. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet*, v. 31, n. 1, p. 47-64, 1996.

WALKE, S.; SRIVASTAVA, G.; NIKALJE, M.; DOSHI, J.; KUMAR, R.; RAVETKAR, S.; DOSHI, P. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. *Carbohydr Polym*, v. 128, p. 188-198, 2015.

WANG, Z.; ZHU, S.; WU, Z.; LU, Y.; FU, H.; QIAN, R. Kirenol upregulates nuclear Annexin-1 which interacts with NF- $\kappa$ B to attenuate synovial inflammation of collagen-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol*, v. 137, p. 774– 782, 2011.

WANG, X.; WANG, Y.; WEI, K.; ZHAO, N.; ZHANG, S.; CHEN, J. Drug distribution within poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and in vitro release. *J Mater Process Technol*, v. 209, n. 1, p. 348-354, 2009.

WELLING, P.G. Influence of food and diet on gastrointestinal drug absorption: a review. *J Pharmacokinet Biophar*, v. 5, n. 4, p. 291-334, 1977.

WENIGNER, A. M.; HÖPKEN, U. E.; PETROW, P. K.; HARTMANN, S.; SCHURIGT, U.; BRÄUER, R.; LIPP, M. CXCR5-and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, n. 56, v.10, p. 3271-3283, 2007.

WOERTZ, C.; PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; KLEINEBUDDE, P. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: an overview. *Eur J Pharm Biophar*, v. 85, n.3, p. 843-853, 2013.

WONG, P.K.K.; QUINN, J.M.W.; SIMS, N.A.; NIEUWENHUIJZE, A.; CAMPBELL, I.K.; WICKS, I.P. Interleukin-6 modulates production of T Lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum.* v. 54, p.158-168, 2006.

WRIGHT, C.I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C.I.; KONING, M.M.G. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *J Ethnopharmacol*, v. 114, n.1, p. 1-31, 2007.

WYRZYKOWSKI, D.; HEBANOWSKA, E., NOWAK-WICZK, G.; MAKOWSKI, M.; CHMURZYŃSKI, L. (2011). Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. *J Thermal Anal Calorim*, v. 104, n. 2, p. 731-735, 2011.

XAVIER, L. L.; VIACAVA, P. R.; TEIXEIRA, V. O.M.; MUNHOZ, M. R.; LORA, P. S.; OLIVEIRA, P. G.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos DBA/1J entre os gêneros. *Rev HCPA*. v. 32, n.4, 2012.

YAN, J.; CHEN, Y.; HE, C.; YANG, Z.; LU, C.; CHEN, X. Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biol Toxicol*, v. 28, p. 47–56, 2012.

YANG, C. Q.; WANG, X.; & KANG, I. S. Ester crosslinking of cotton fabric by polymeric carboxylic acids and citric acid. *Textile Res J*, v. 67, n. 5, p. 334-342, 1997.

YELIN, E.; WANKE, L.A. An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis: the impact of poor function and functional decline, *Arthritis Rheum.*, v. 42, p. 1209-1218, 1999.

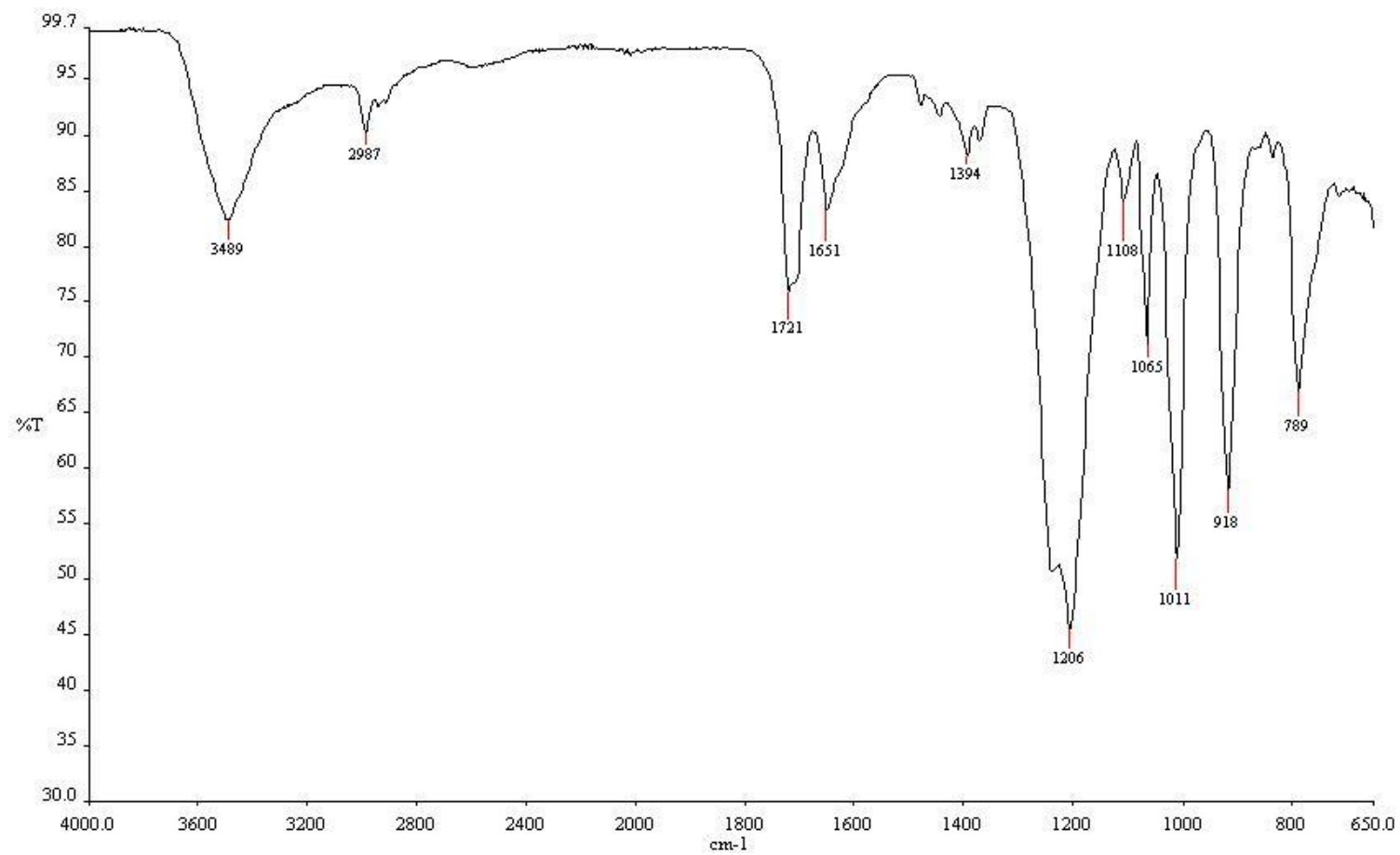
YOON, J. H.; BAEK, S. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.*, v. 46, n. 5, p. 585-96, 2005.

ZHOU, L.; WANG, Y.; LIU, Z.; HUANG, Q. Characteristics of equilibrium, kinetics studies for adsorption of Hg (II), Cu (II), and Ni (II) ions by thiourea-modified magnetic chitosan microspheres. *Jf Hazard Mater*, v. 161, n. 2, p. 995-1002, 2009.

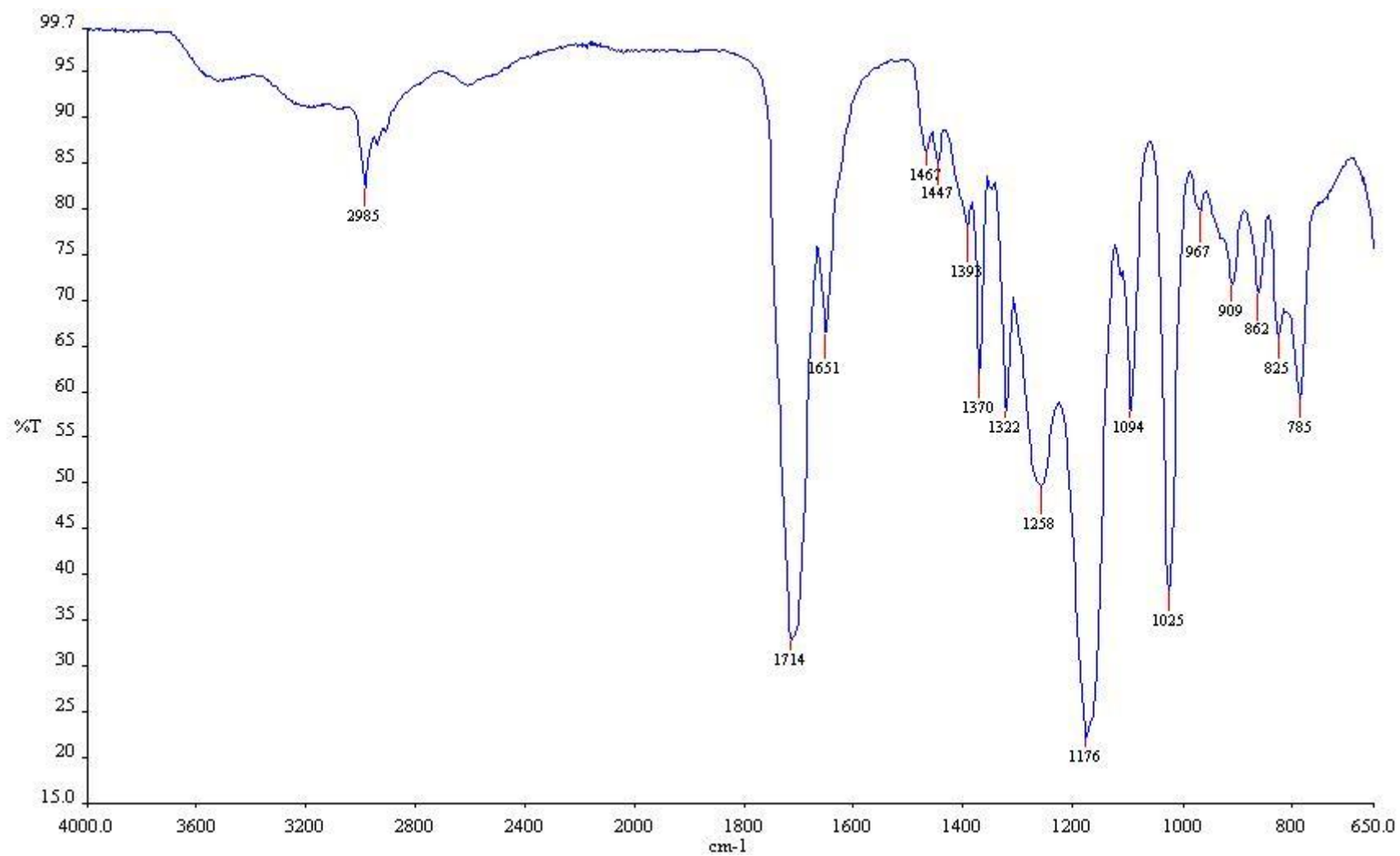
## APÊNDICES

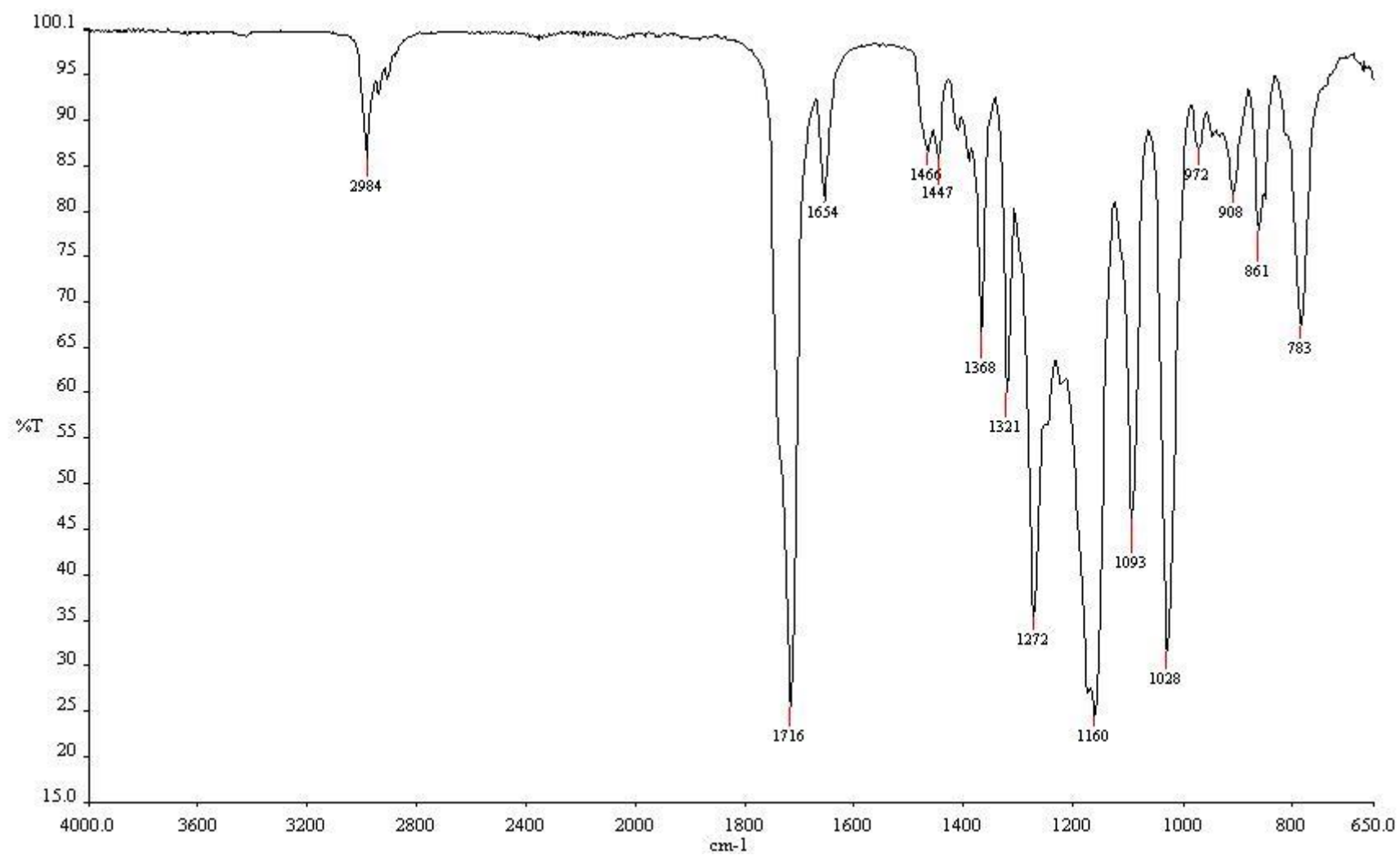
### Apêndice 1 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

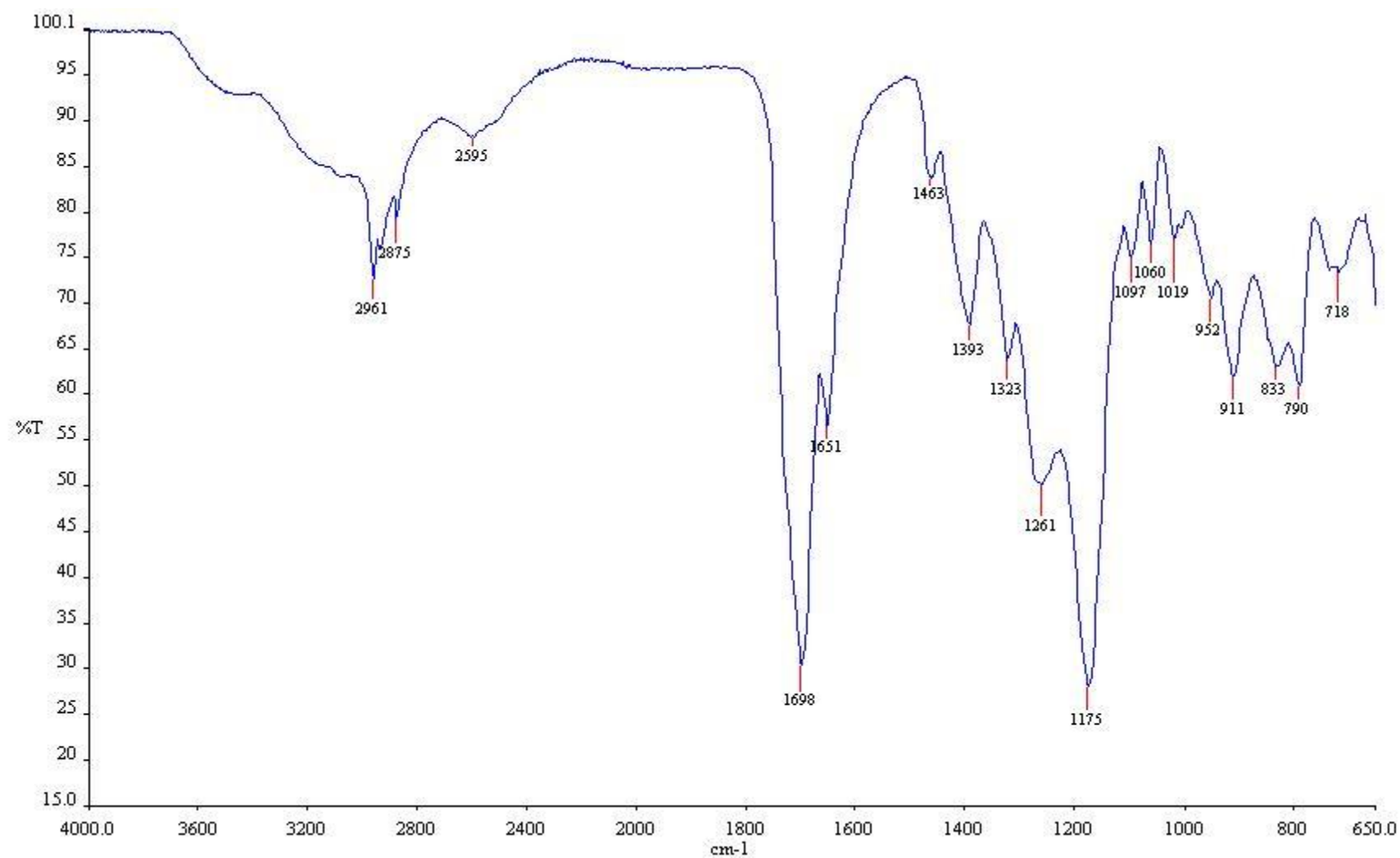
Mistura de monoésteres etílicos do ácido *trans*-aconítico

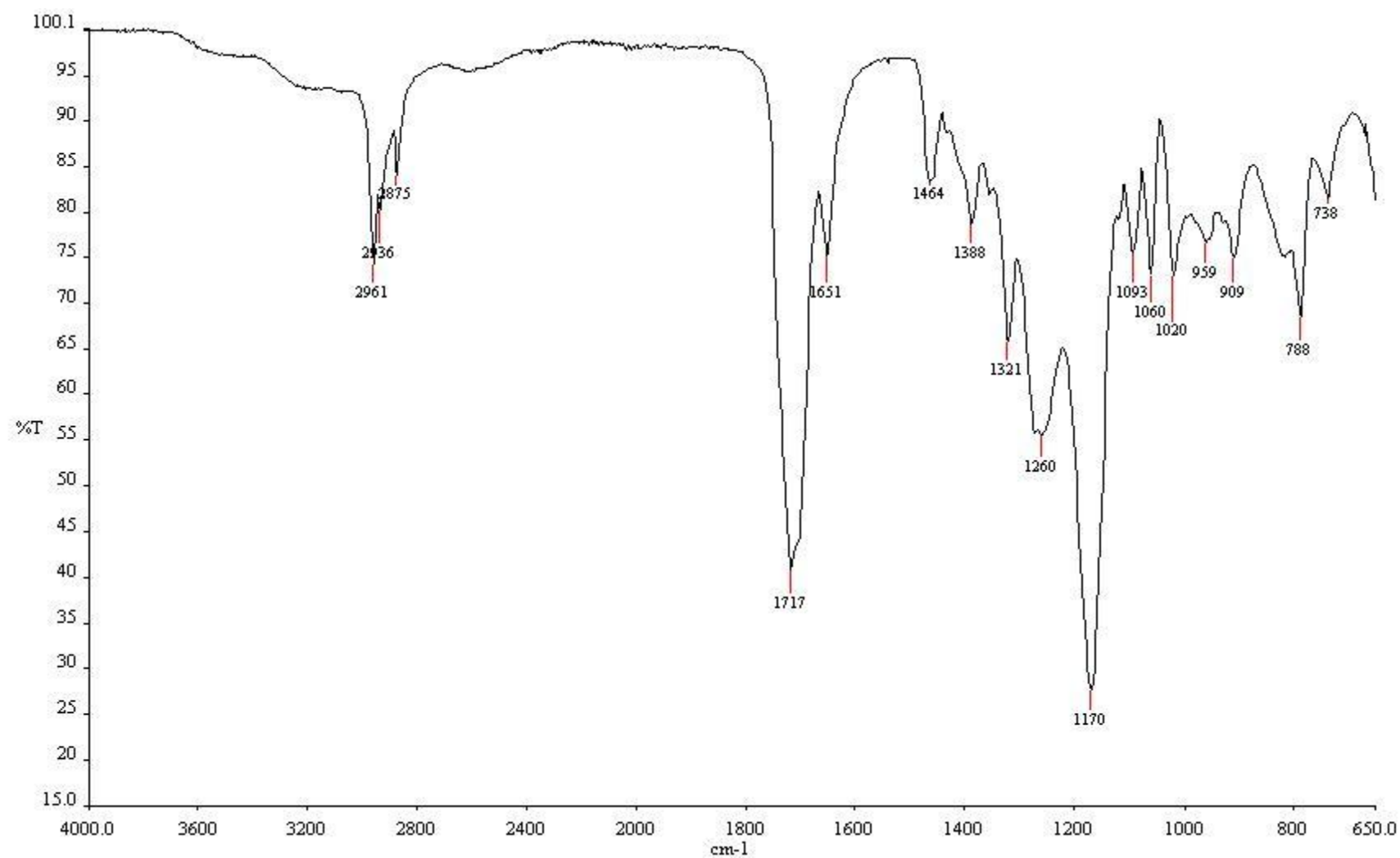


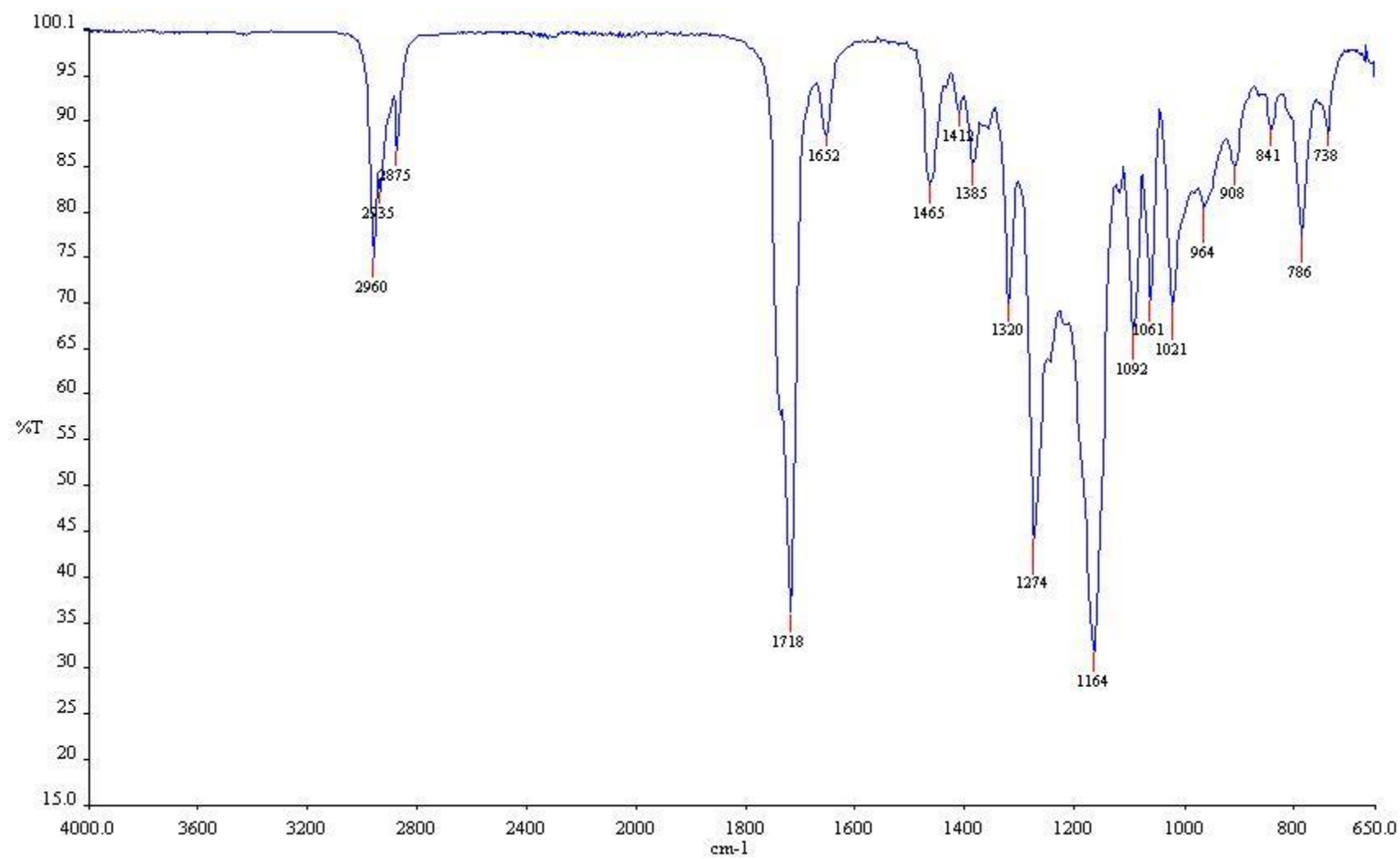


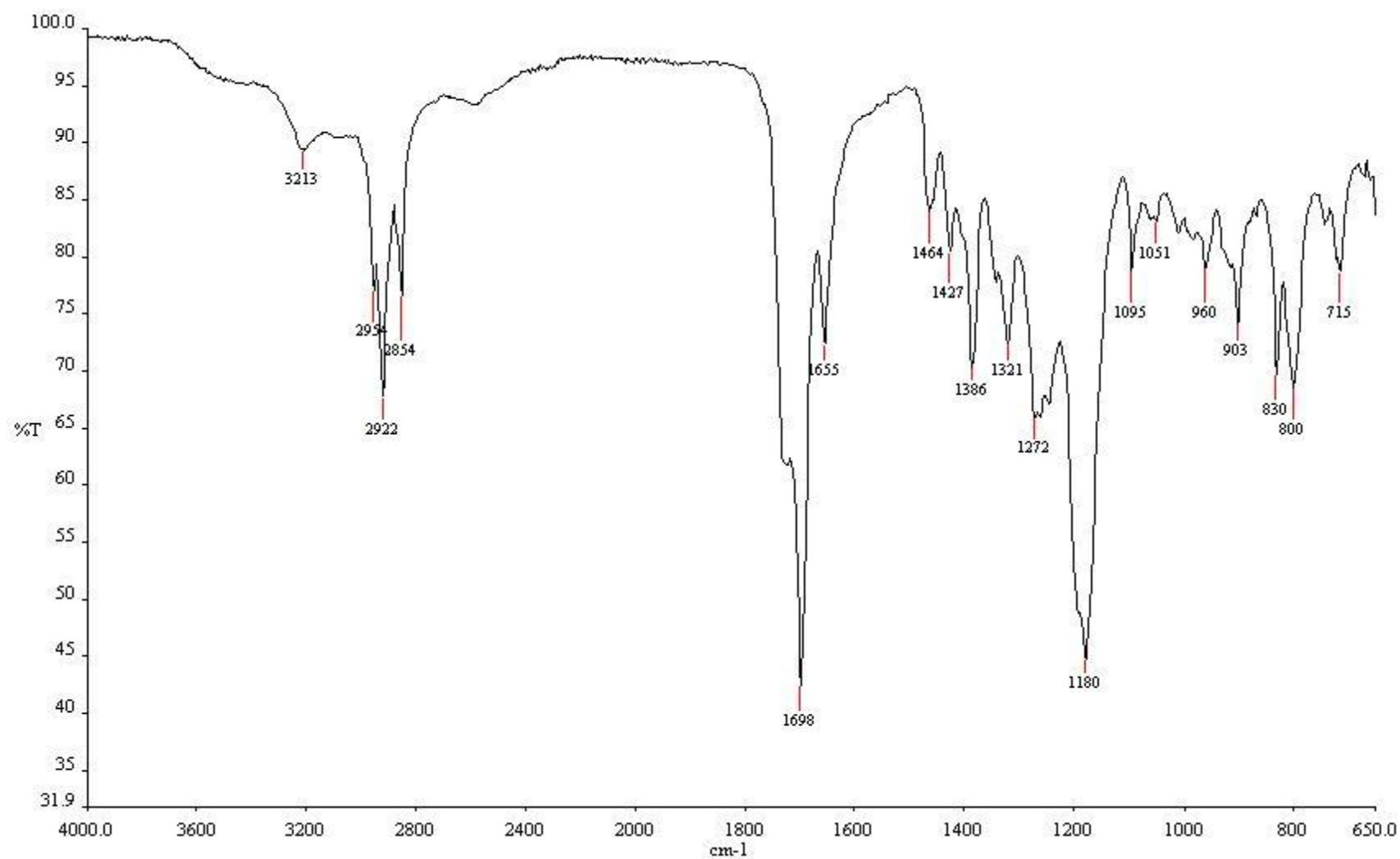
Mistura de diésteres etílicos do ácido *trans*-aconítico

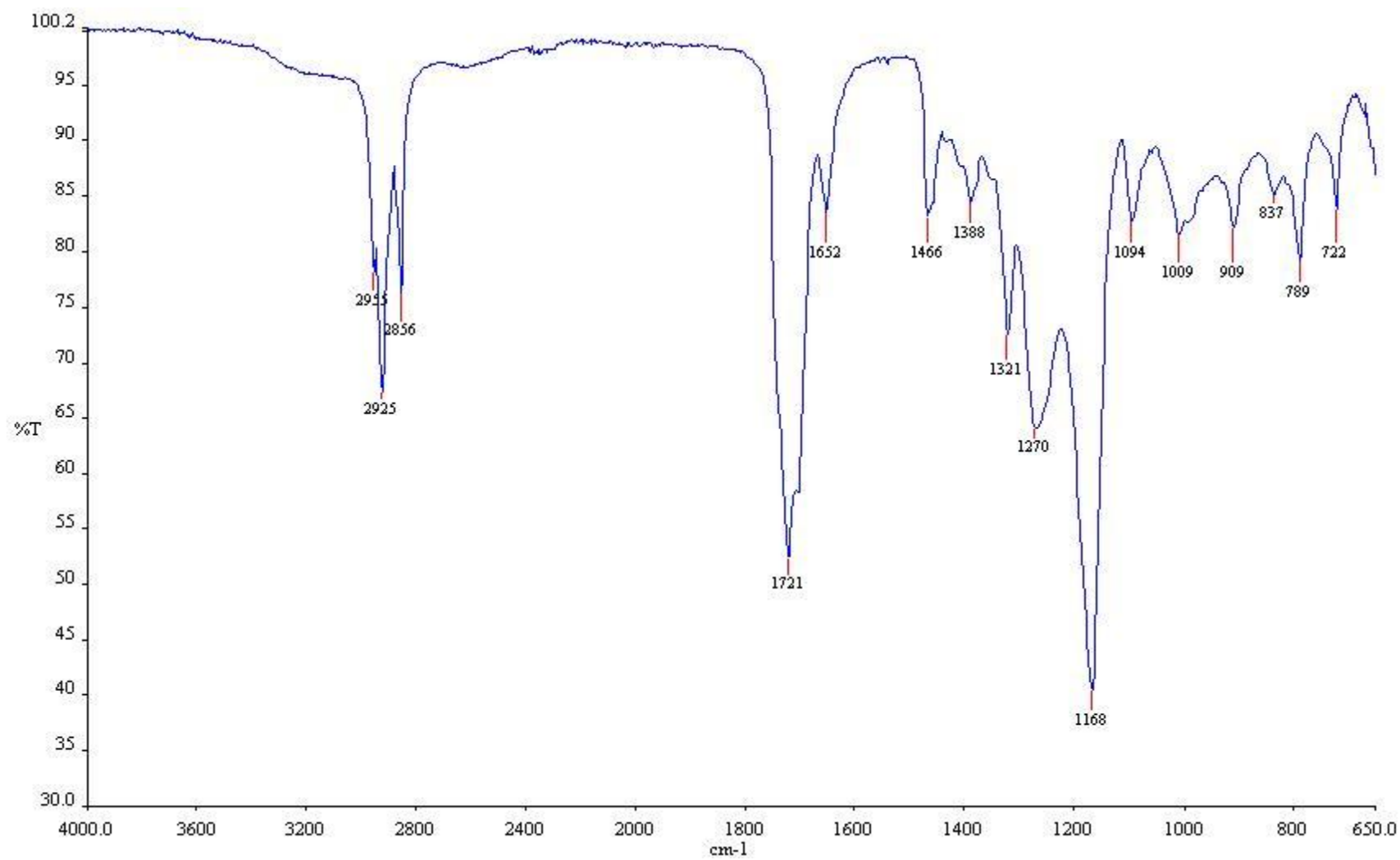
Triéster etílico do ácido *trans*-aconítico

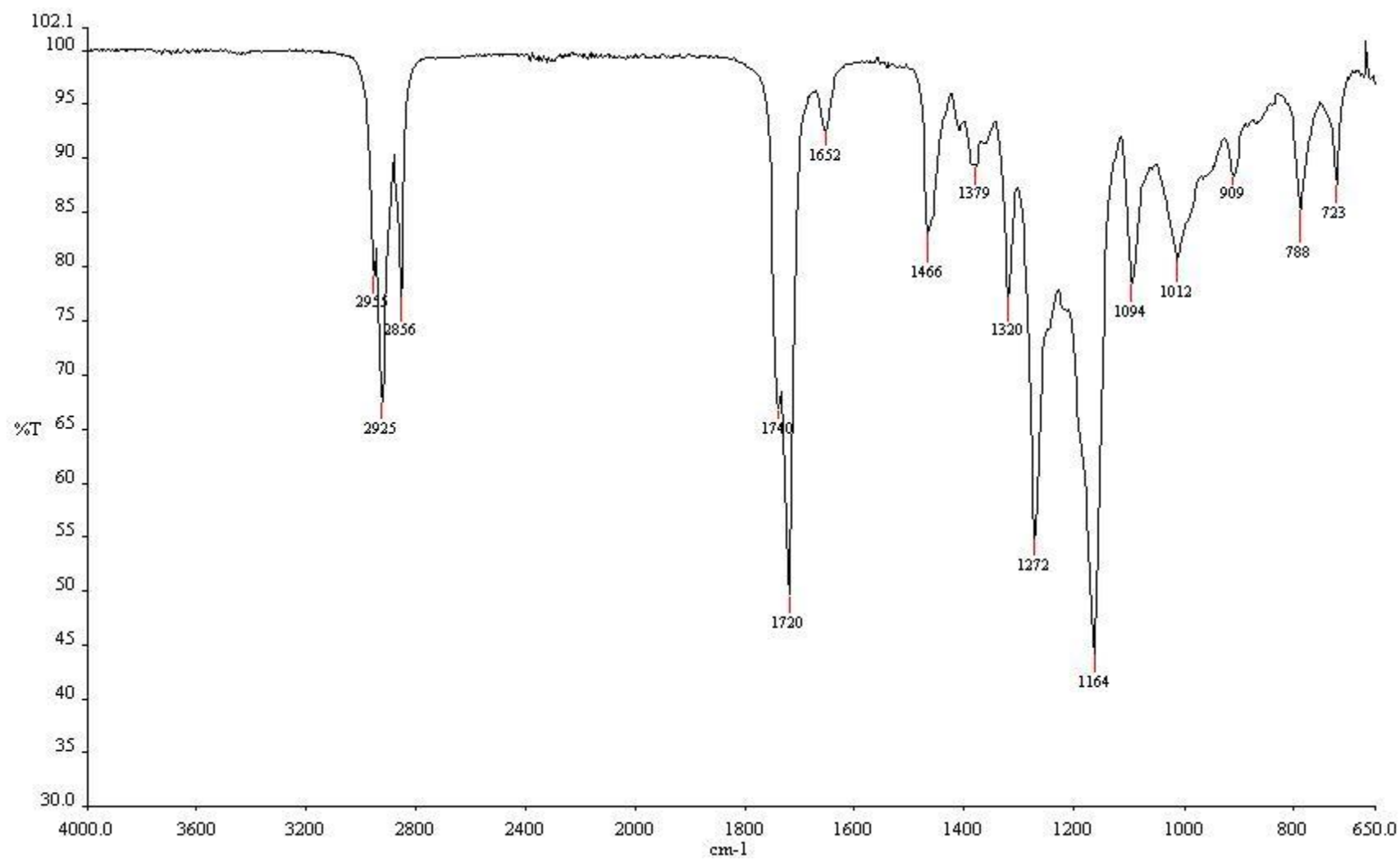
Mistura de monoésteres *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico

Mistura de diésteres *n*-butílicosdo ácido *trans*-aconítico

Triéster *n*-butílico

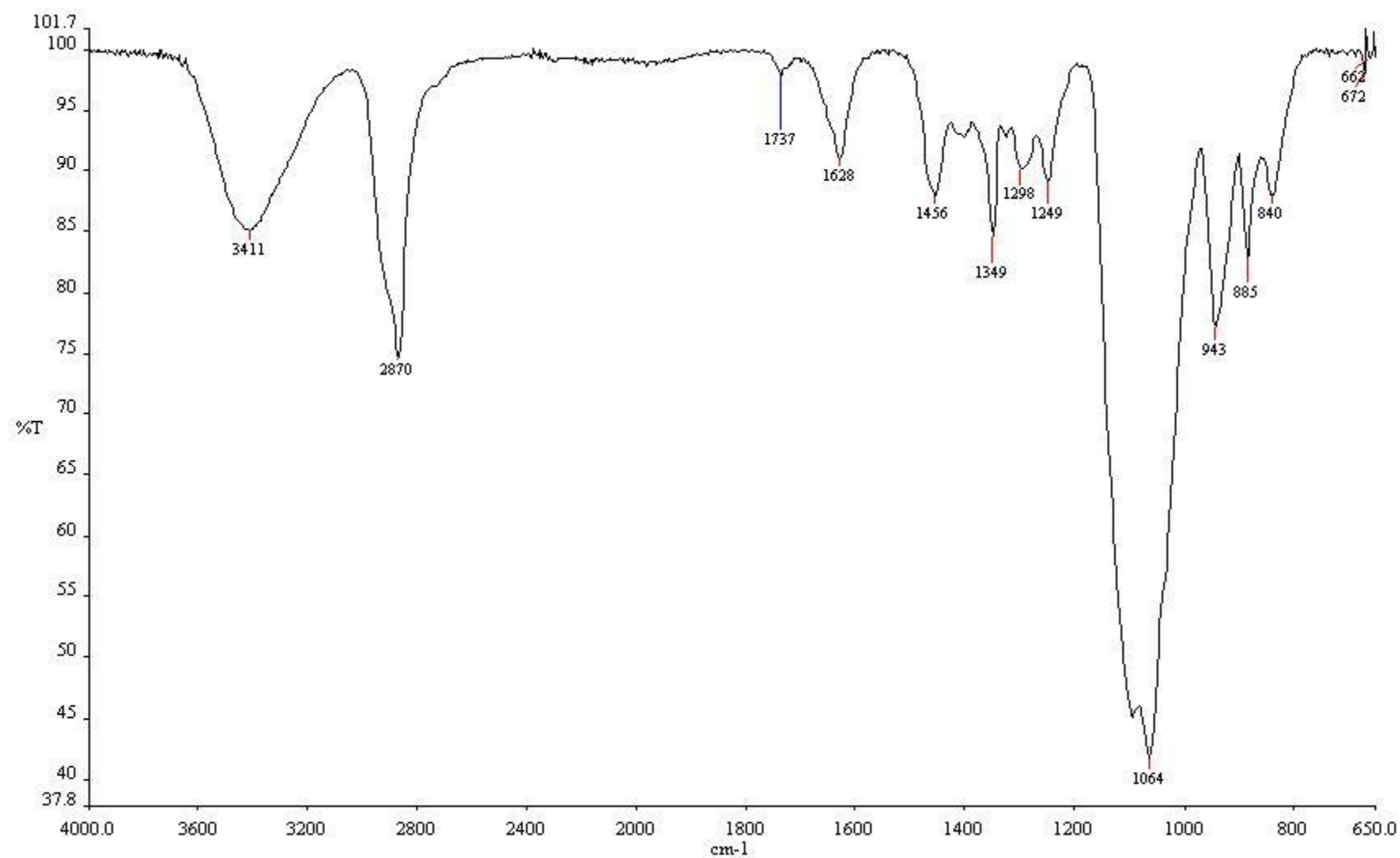
Mistura de *n*-monoésteres octílicos

Mistura de diésteres *n*-octílicosdo ácido *trans*-aconítico

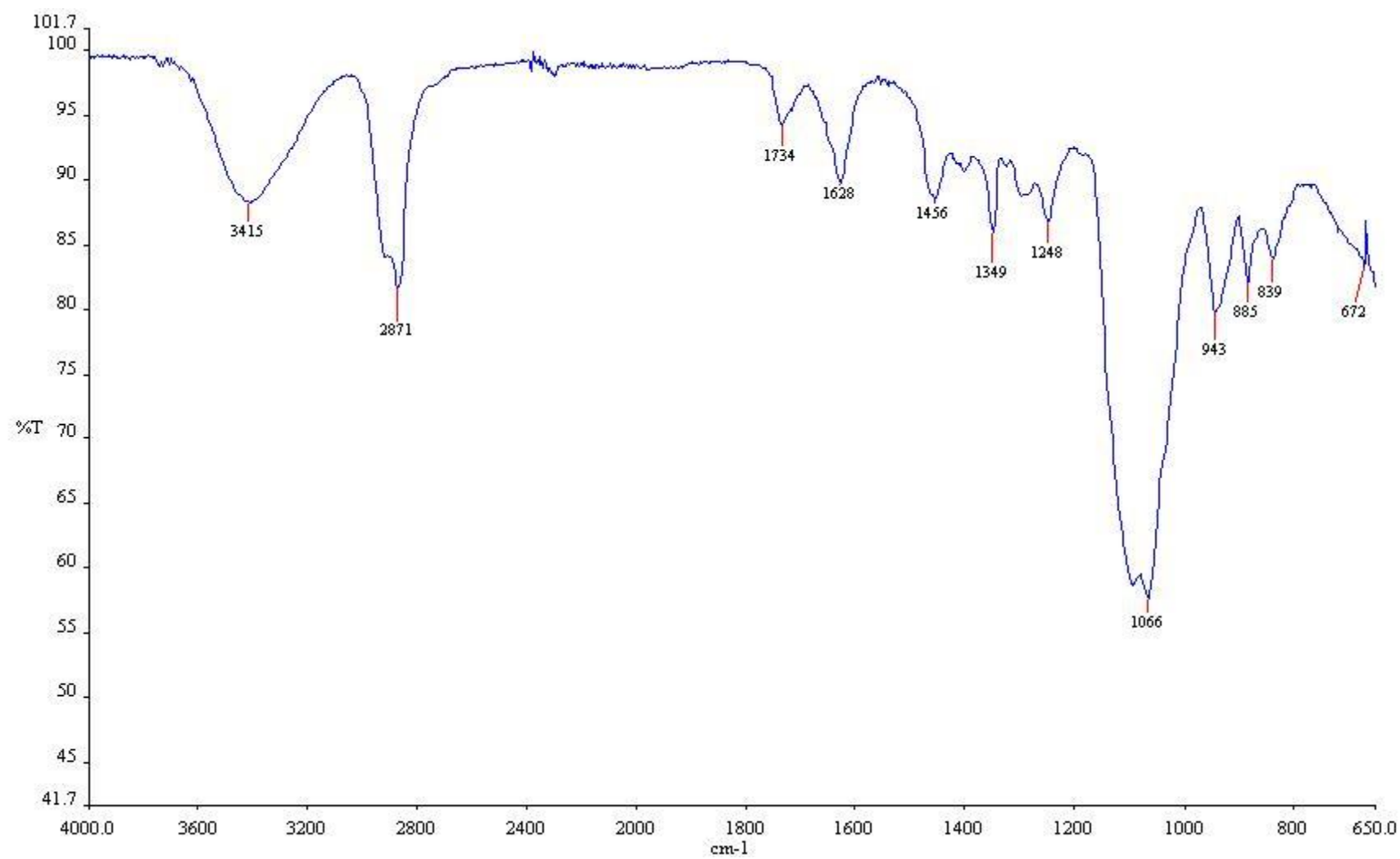
Triéster *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico



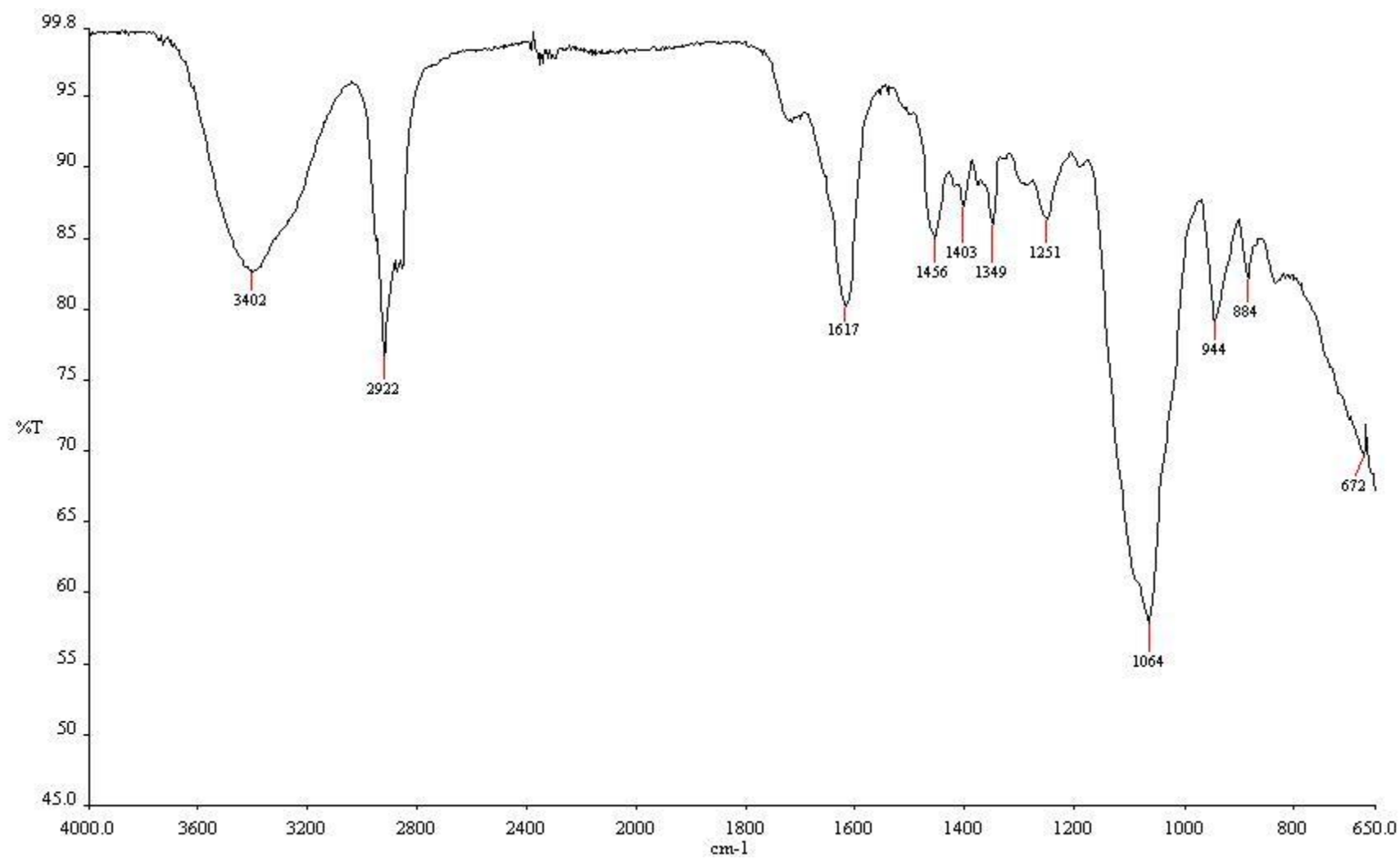
## Formulação F1B



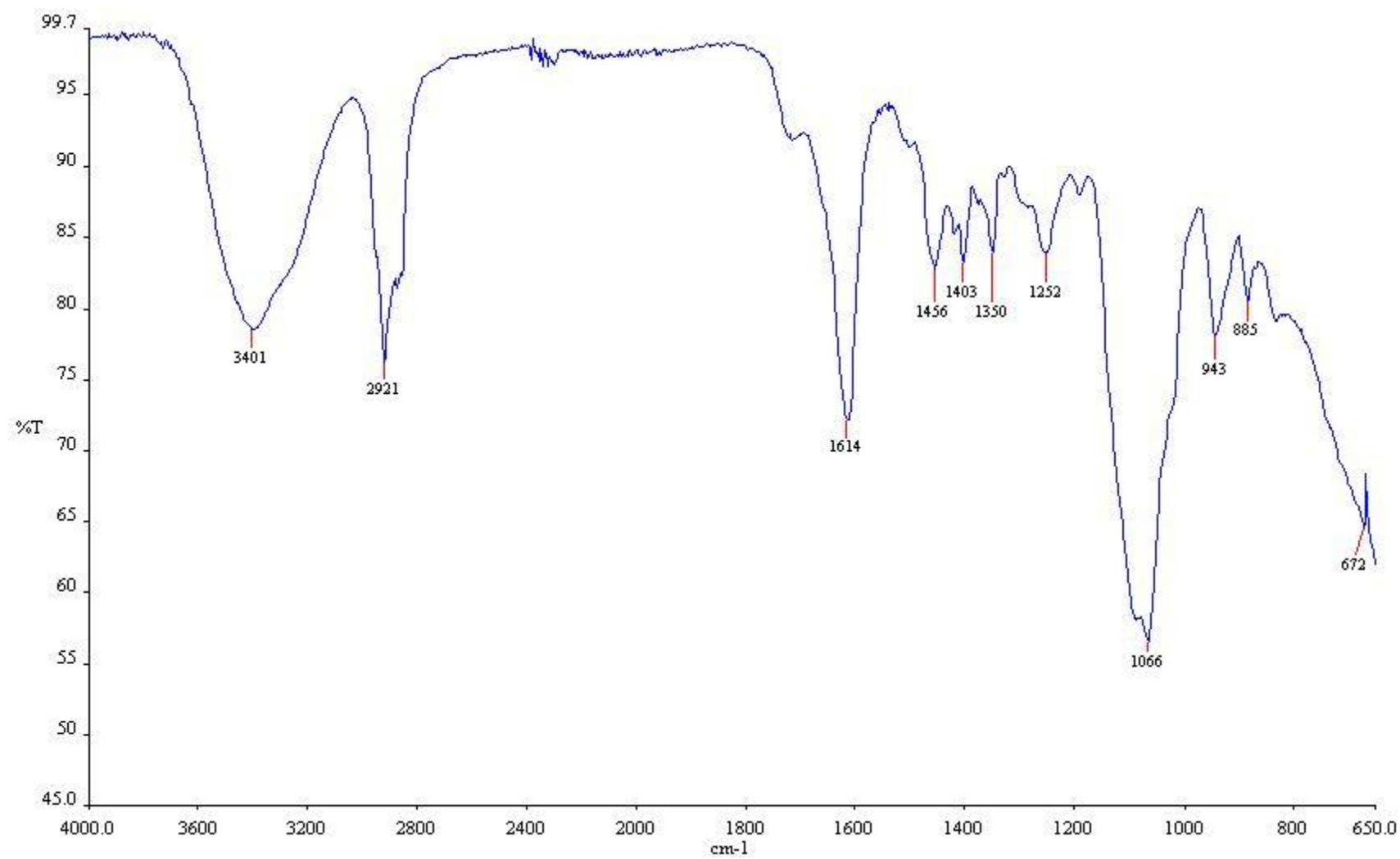
## Formulação F1



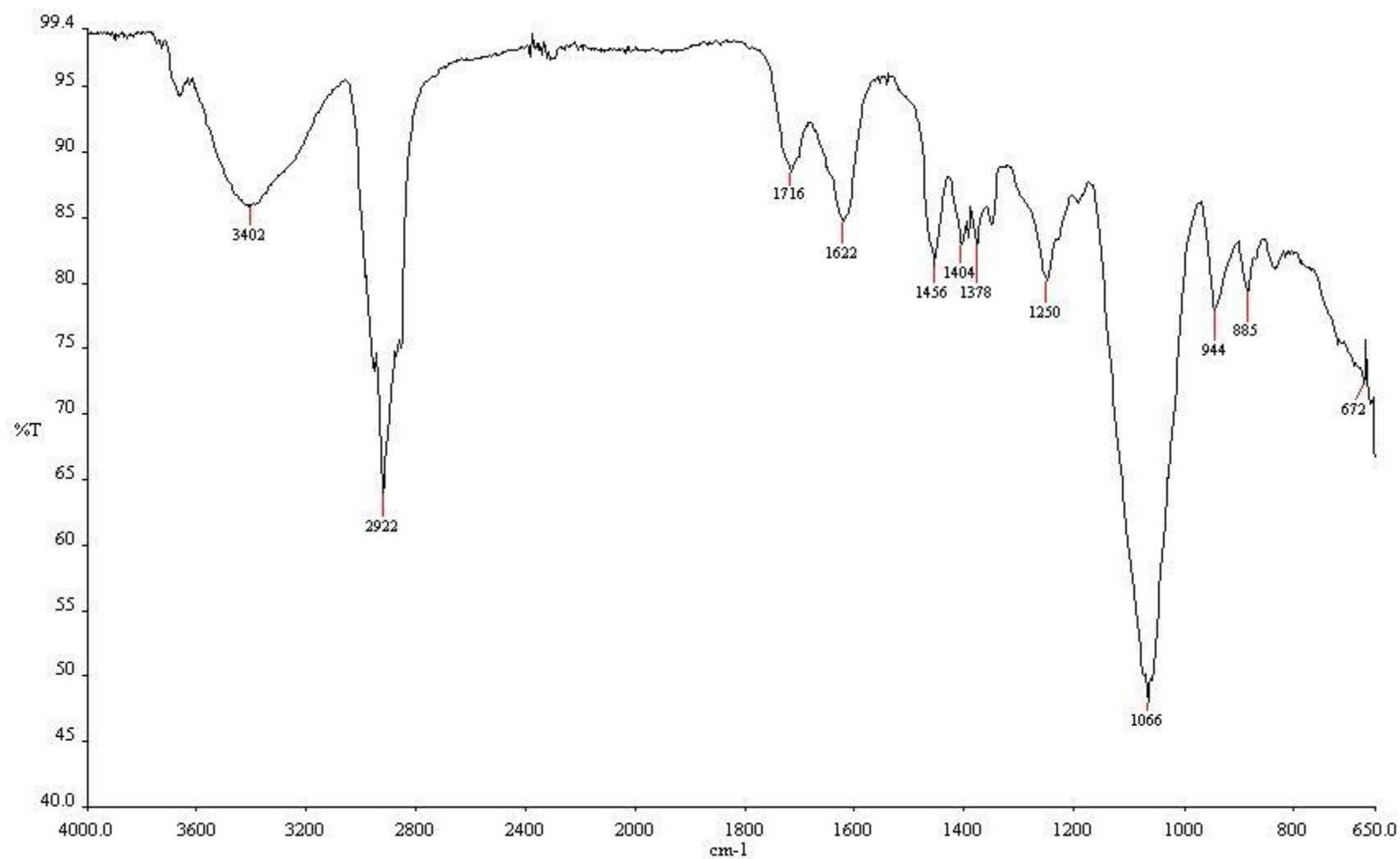
## Formulação F3B



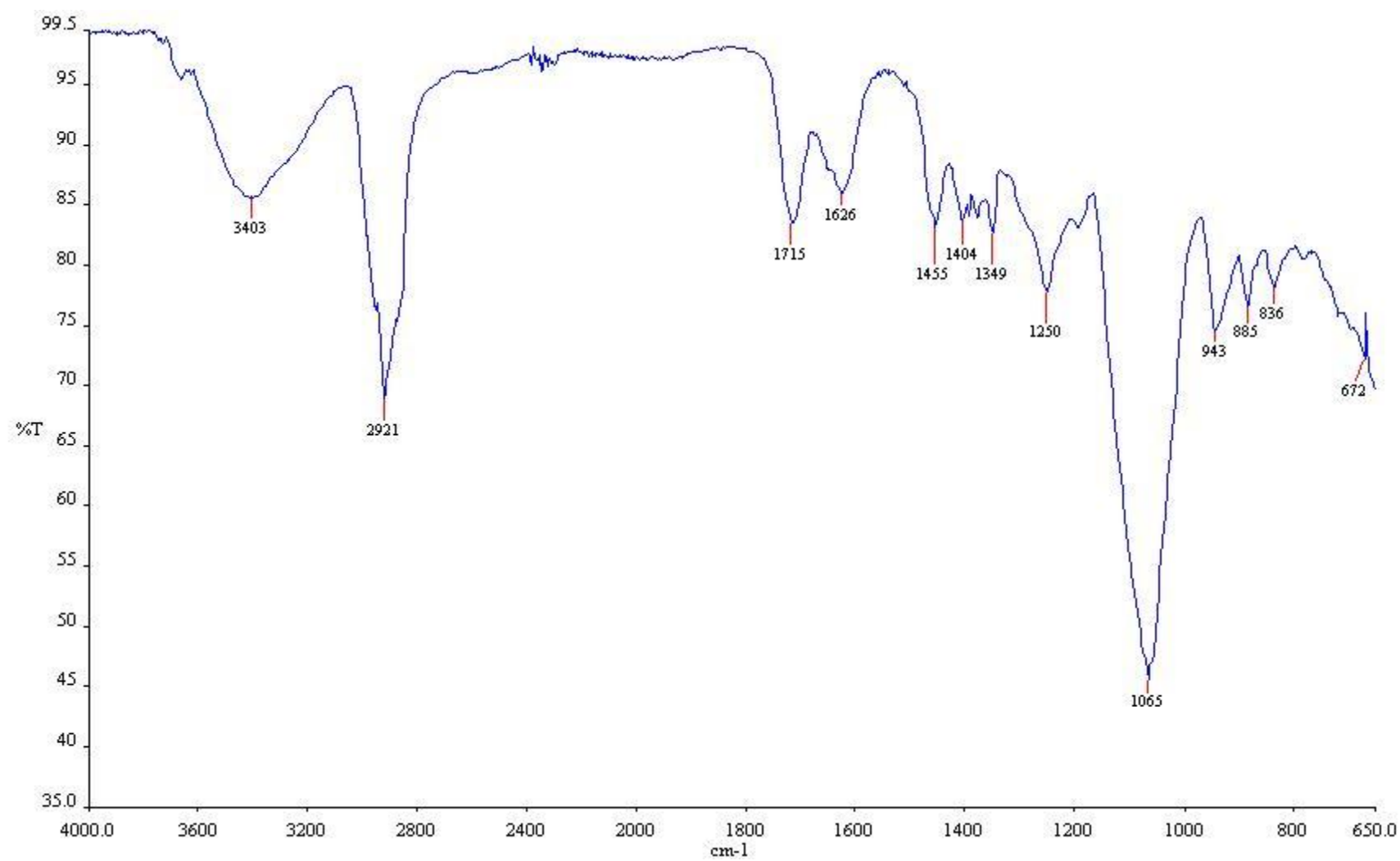
## Formulação F3a



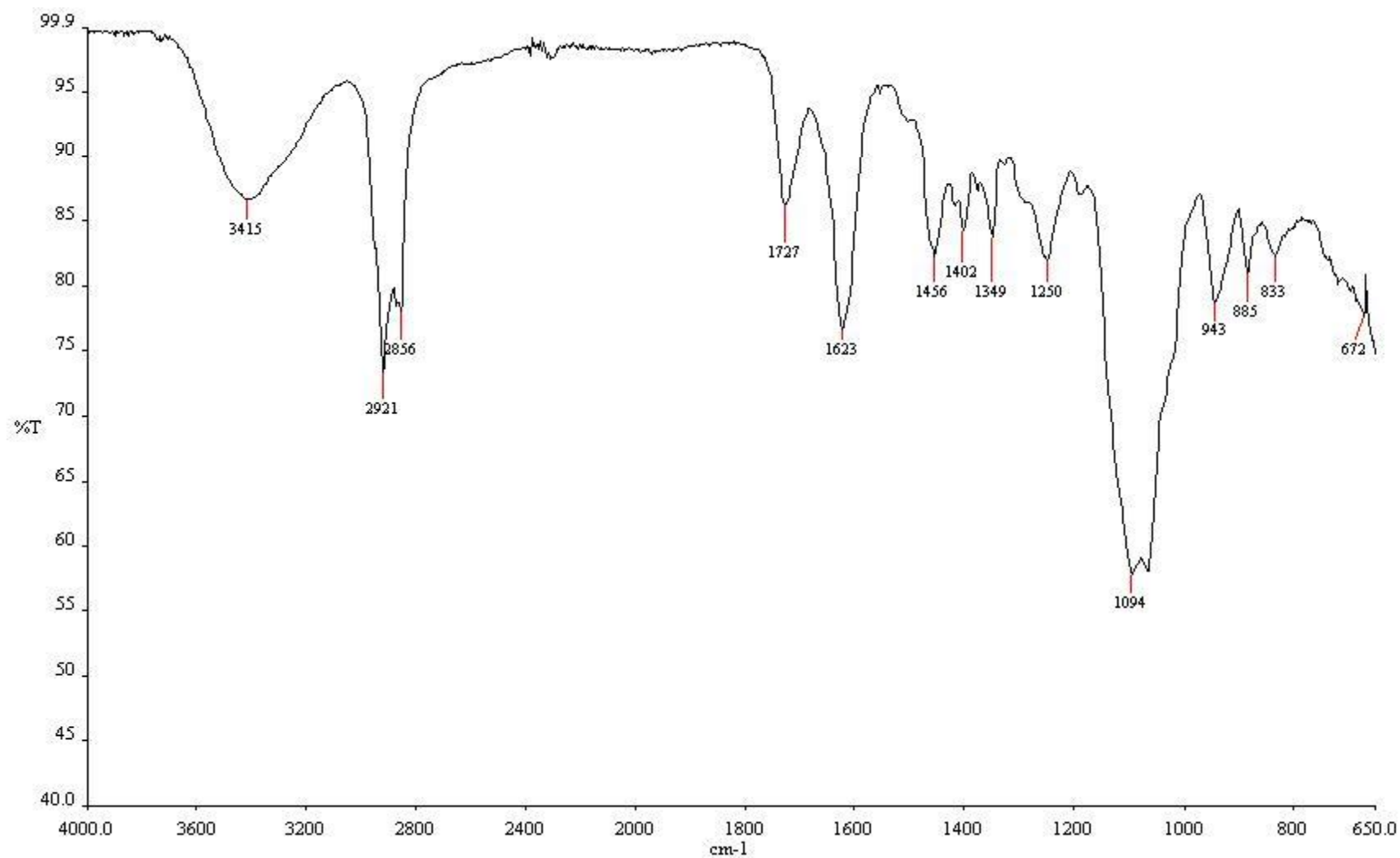
## Formulação F3b



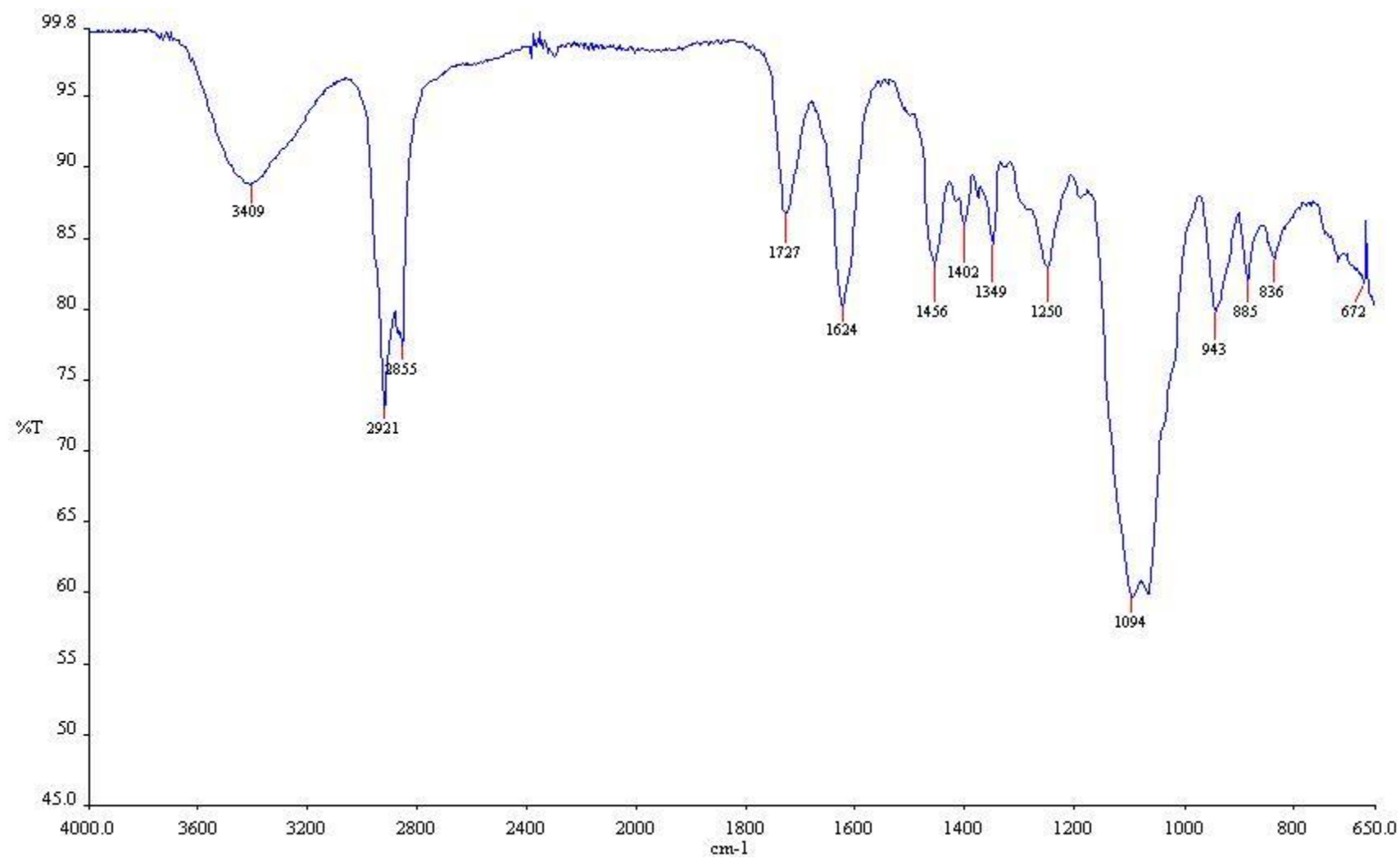
## Formulação F3c



## Formulação F5B



## Formulação F5





## Apêndice 2 – Análises de massas dos derivados butílicos e octílicos

### DERIVADOS BUTÍLICOS

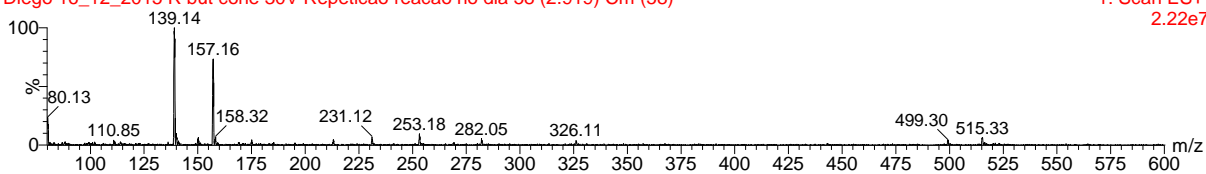
#### Monoésteres *n*-butílicos do ácido *trans*-aconítico

Espectro de varredura (MS) modo positivo

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 58 (2.919) Cm (58)

1: Scan ES+  
2.22e7

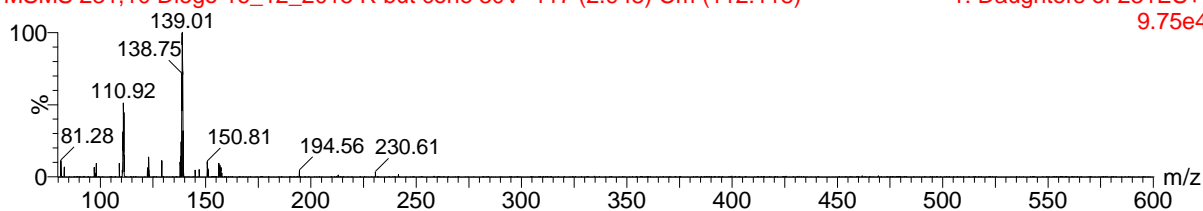


Espectro MS/MS modo positivo

MSMS 231,10 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 231,10 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 117 (2.948) Cm (112:118)

1: Daughters of 231ES+  
9.75e4

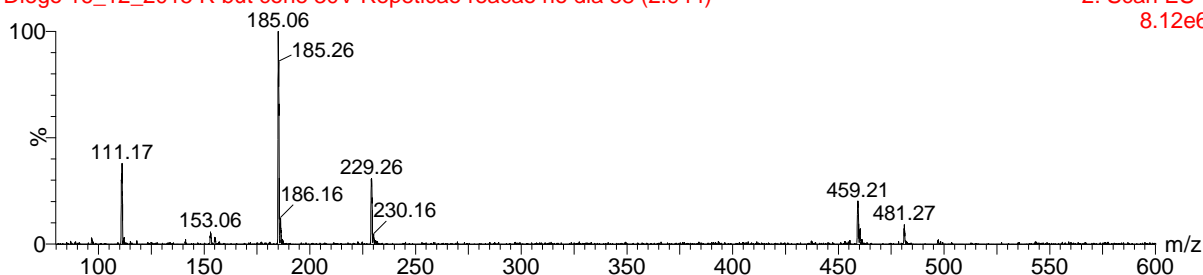


Espectro de varredura (MS) modo negativo

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 58 (2.944)

2: Scan ES-  
8.12e6

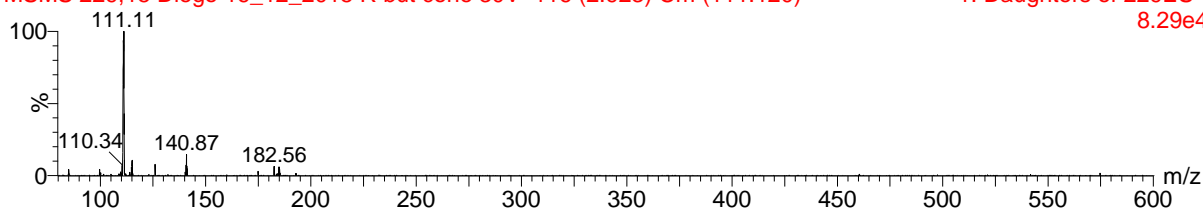


Espectro MS/MS modo negativo

MSMS 229,15 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 229,15 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 116 (2.923) Cm (111:120)

1: Daughters of 229ES-  
8.29e4



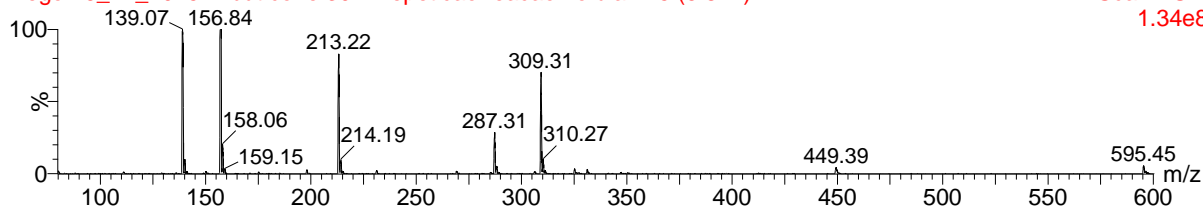
## Diésteres *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico

Espectro de varredura (MS) modo positivo

### Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 115 (5.812)

1: Scan ES+  
1.34e8

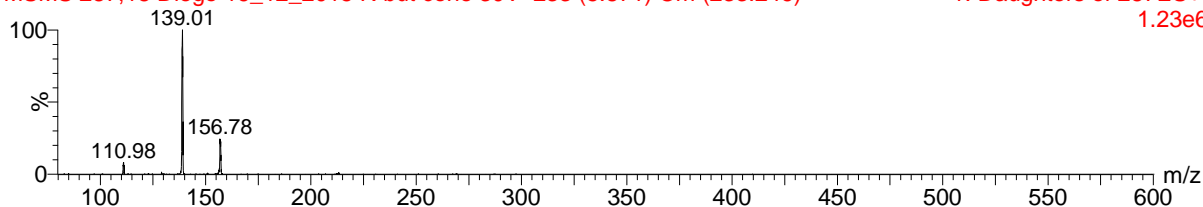


Espectro MS/MS modo positivo

### MSMS 287,18 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 287,18 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 233 (5.871) Cm (233:246)

1: Daughters of 287ES+  
1.23e6

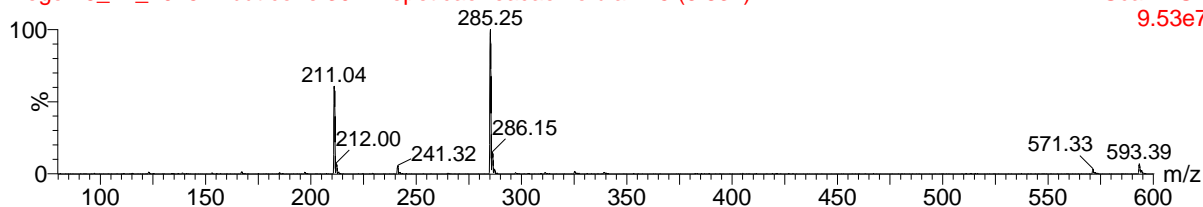


Espectro de varredura (MS) modo negativo

### Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 115 (5.837)

2: Scan ES-  
9.53e7

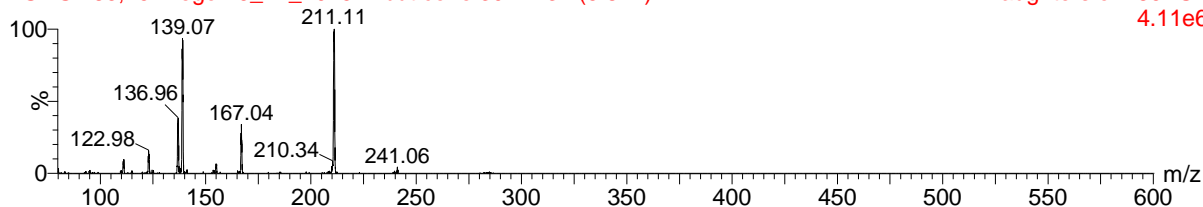


Espectro MS/MS modo negativo

### MSMS 285,15 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 285,15 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 231 (5.821)

1: Daughters of 285ES-  
4.11e6



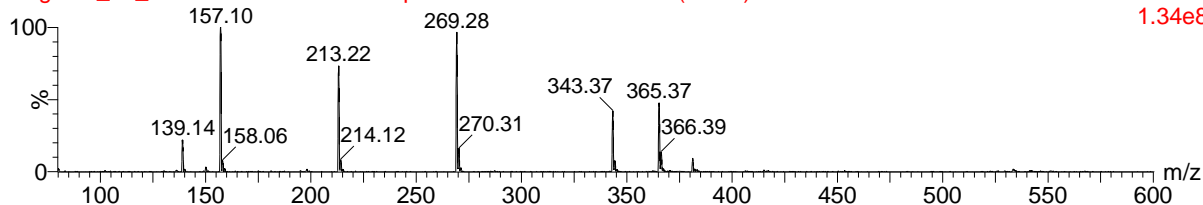
## Triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico

### Espectro de varredura (MS) modo positivo

#### Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 160 (8.096)

1: Scan ES+  
1.34e8

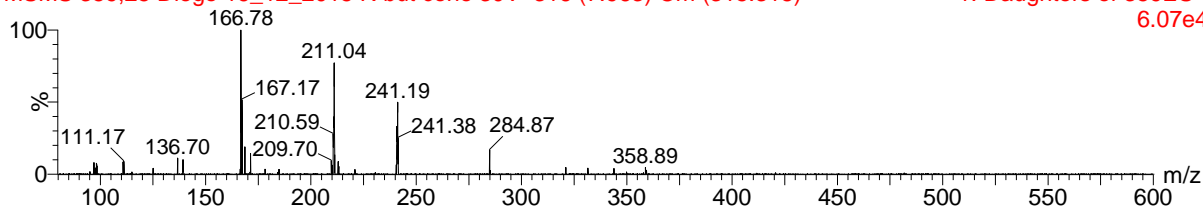


### Espectro MS/MS modo positivo

#### MSMS 359,25 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 359,25 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 316 (7.963) Cm (315:318)

1: Daughters of 359ES-  
6.07e4

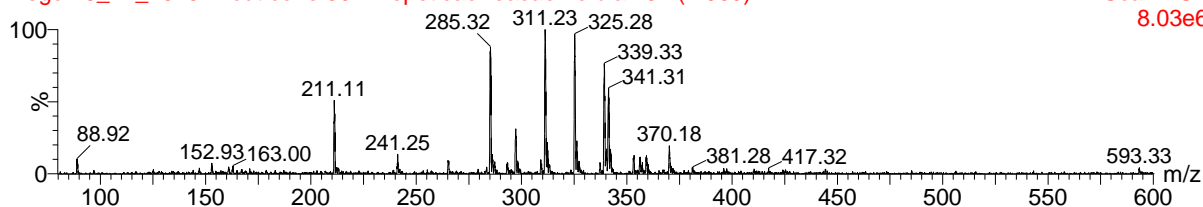


### Espectro de varredura (MS) modo negativo

#### Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia

Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V Repeticao reacao no dia 157 (7.969)

2: Scan ES-  
8.03e6

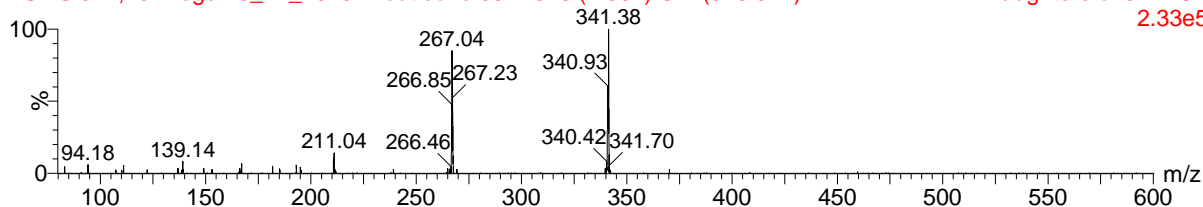


### Espectro MS/MS modo negativo

#### MSMS 341,25 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V

MSMS 341,25 Diego 16\_12\_2015 R but cone 30V 316 (7.962) Cm (315:317)

1: Daughters of 341ES-  
2.33e5



## DERIVADOS OCTÍLICOS

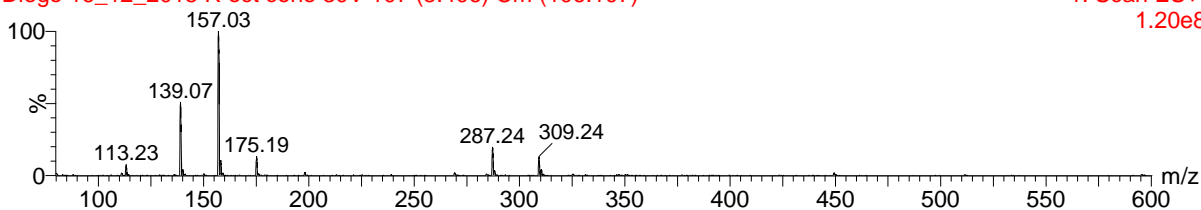
### Monoésteres *n*-octílicosdo ácido *trans*-aconítico

Espectro de varredura (MS) modo positivo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 107 (5.406) Cm (106:107)

1: Scan ES+  
1.20e8

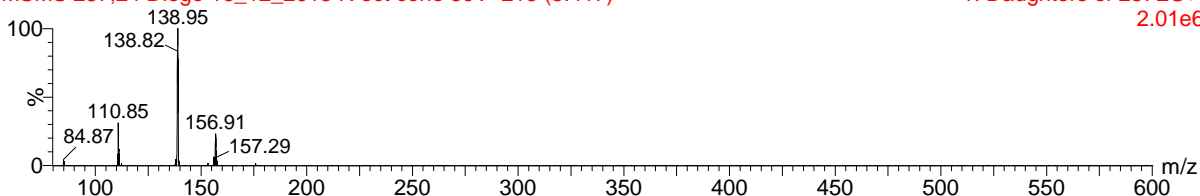


Espectro MS/MS modo positivo

#### MSMS 287,24 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

MSMS 287,24 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 215 (5.417)

1: Daughters of 287ES+  
2.01e6

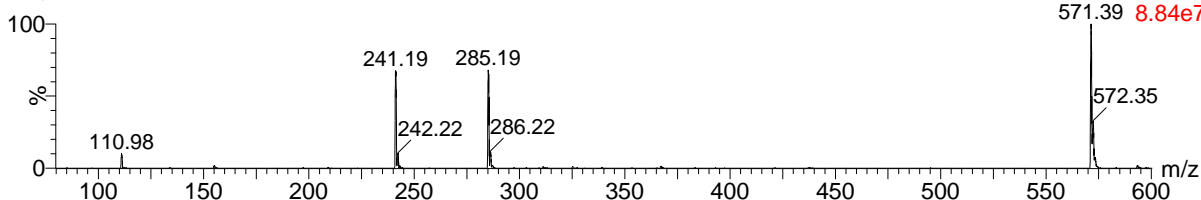


Espectro de varredura (MS) modo negativo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 106 (5.381) Cm (106:107)

2: Scan ES-  
8.84e7

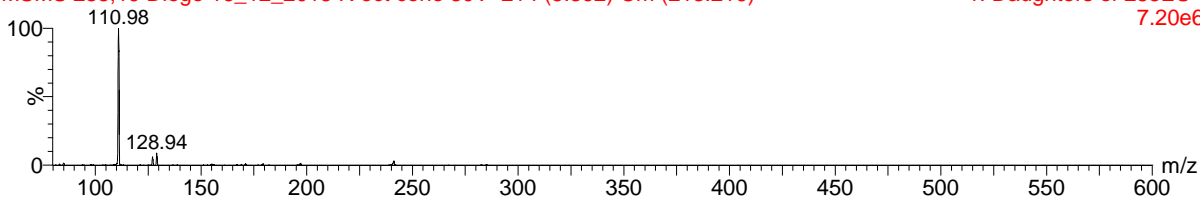


Espectro MS/MS modo negativo

#### MSMS 285,19 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

MSMS 285,19 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 214 (5.392) Cm (213:216)

1: Daughters of 285ES-  
7.20e6



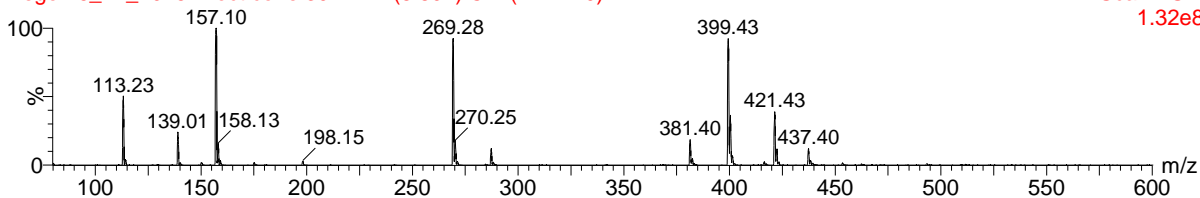
## Diésteres *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico

### Espectro de varredura (MS) modo positivo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 174 (8.807) Cm (174:179)

1: Scan ES+  
1.32e8

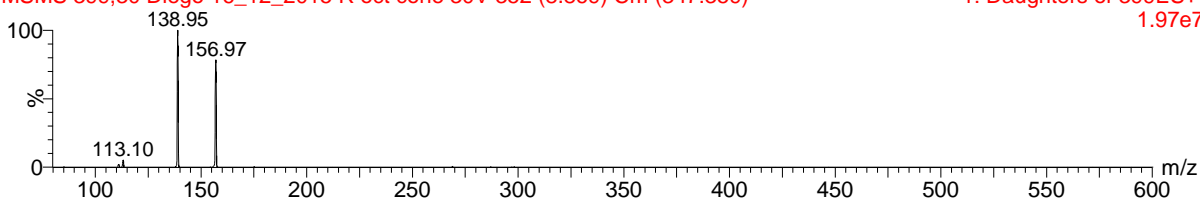


### Espectro MS/MS modo positivo

#### MSMS 399,30 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

MSMS 399,30 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 352 (8.869) Cm (347:359)

1: Daughters of 399ES+  
1.97e7

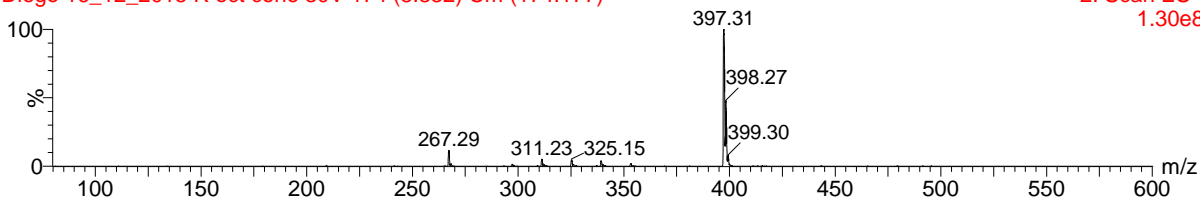


### Espectro de varredura (MS) modo negativo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 174 (8.832) Cm (174:177)

2: Scan ES-  
1.30e8

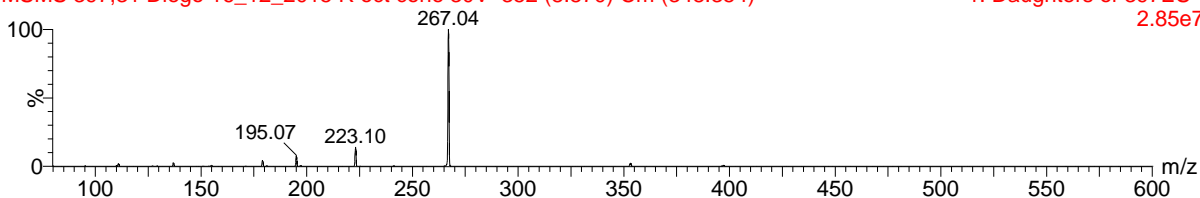


### Espectro MS/MS modo negativo

#### MSMS 397,31 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

MSMS 397,31 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 352 (8.870) Cm (348:354)

1: Daughters of 397ES-  
2.85e7

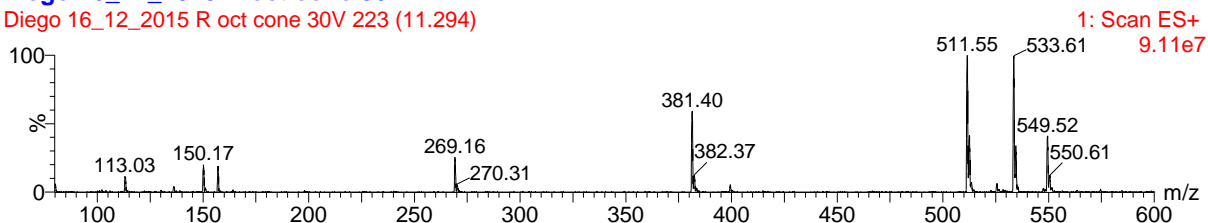


## Triéster *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico

### Espectro de varredura (MS) modo positivo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

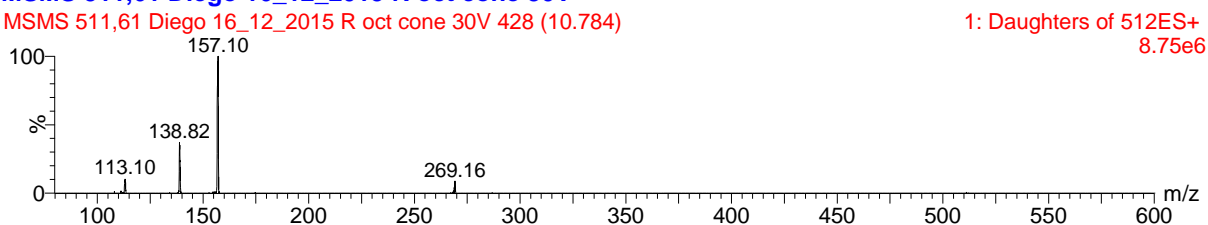
Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 223 (11.294)



### Espectro MS/MS modo positivo

#### MSMS 511,61 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

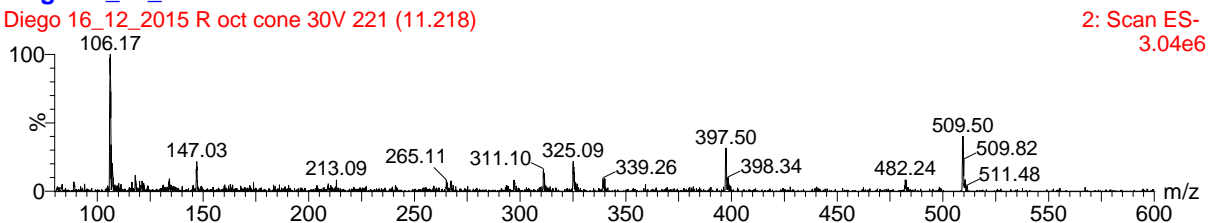
MSMS 511,61 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 428 (10.784)



### Espectro de varredura (MS) modo negativo

#### Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

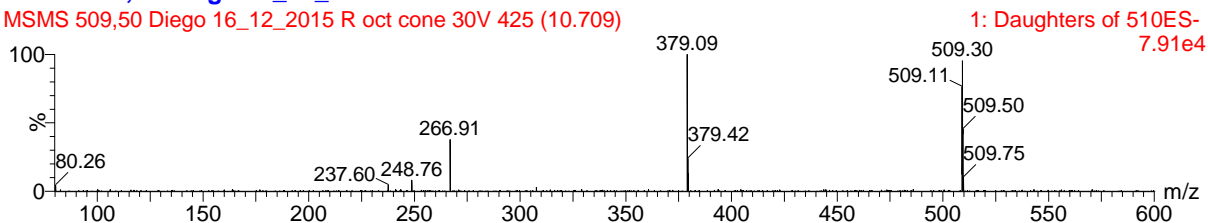
Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 221 (11.218)

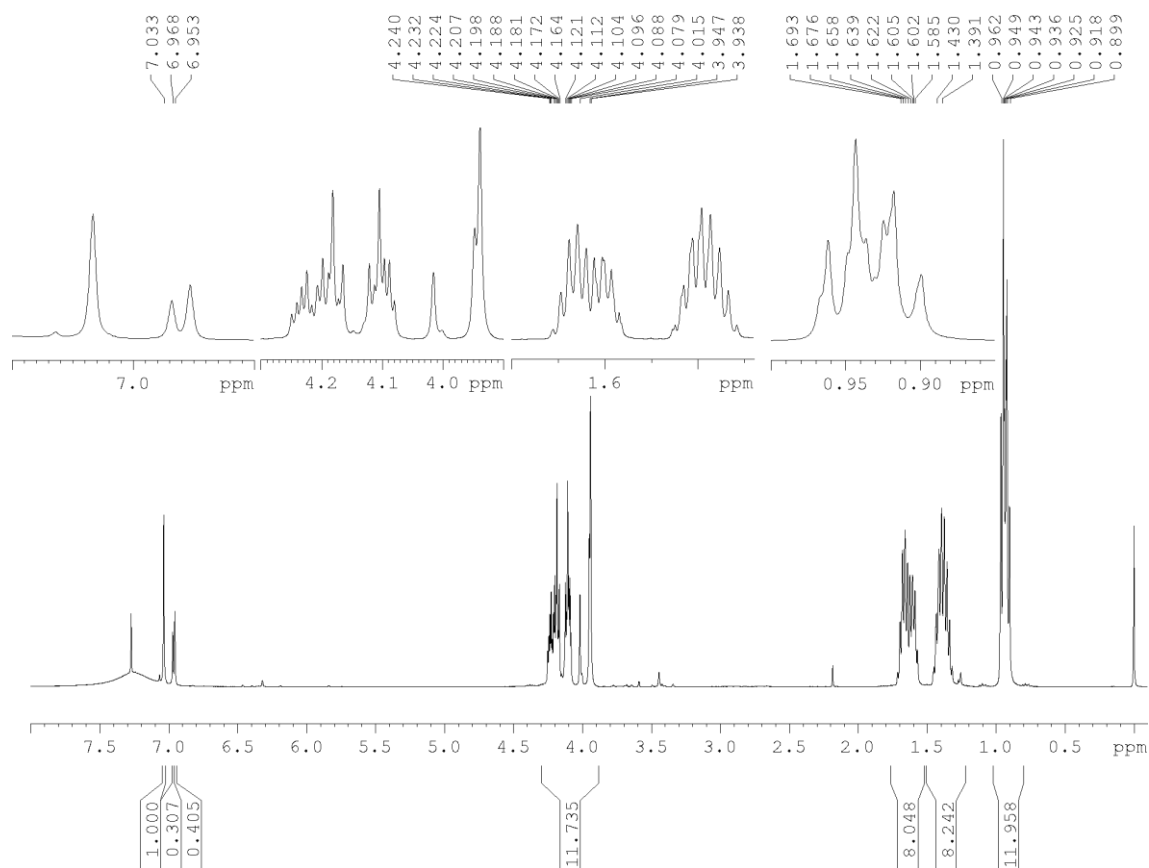


### Espectro MS/MS modo negativo

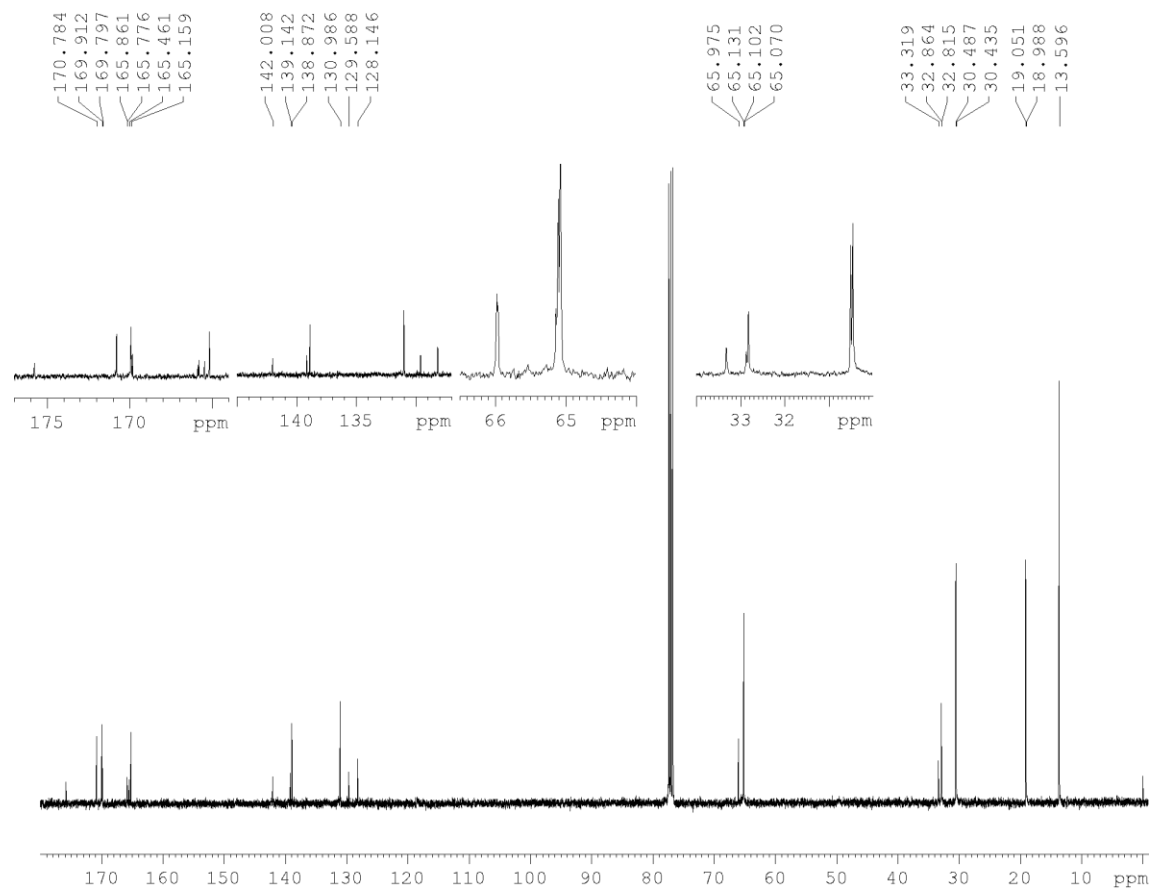
#### MSMS 509,50 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V

MSMS 509,50 Diego 16\_12\_2015 R oct cone 30V 425 (10.709)



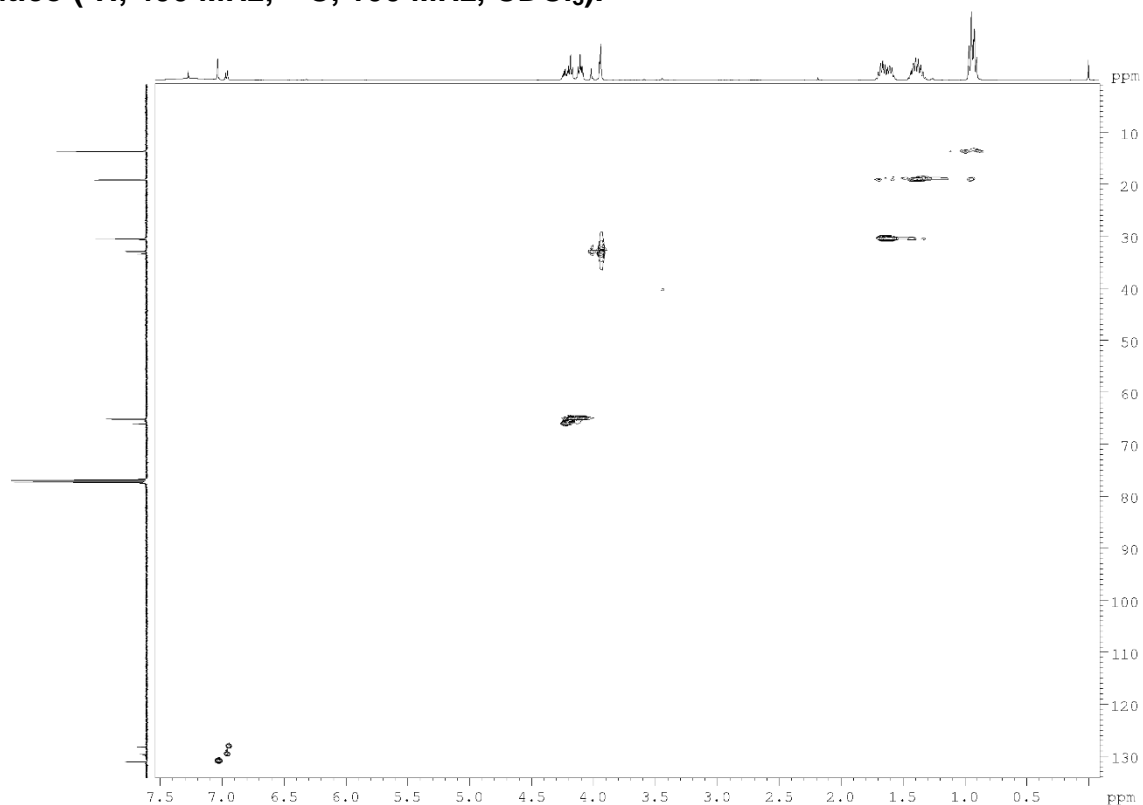
Apêndice 3 – Análises de RMN dos derivados *n*-butílicos e *n*-octílicos**Espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do ácido *trans*-aconítico (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).**

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico  
( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).**

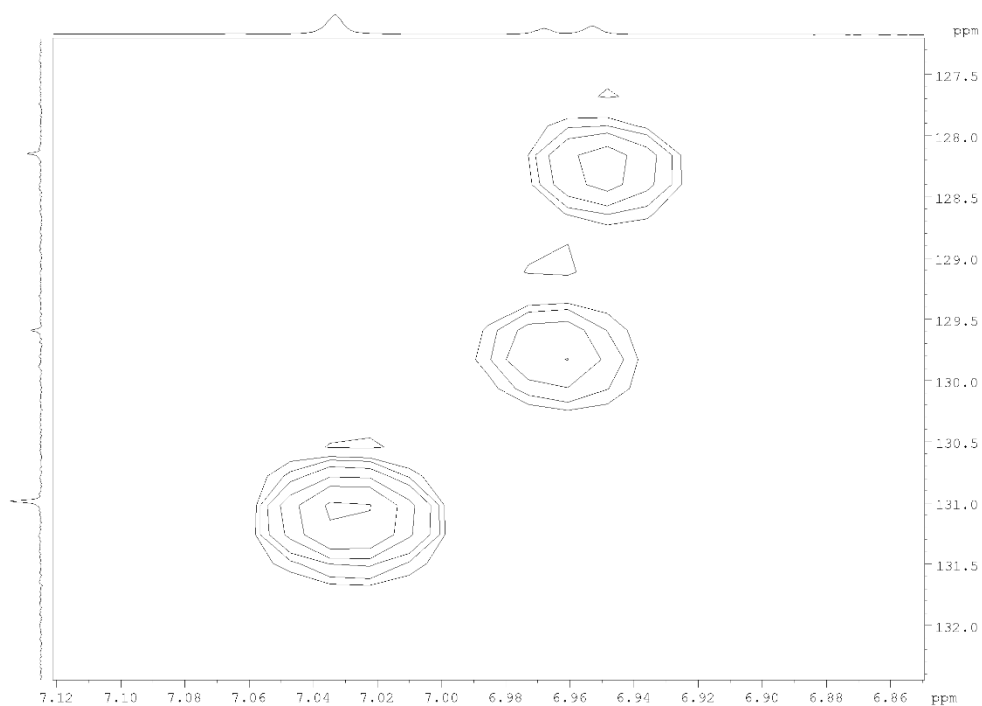




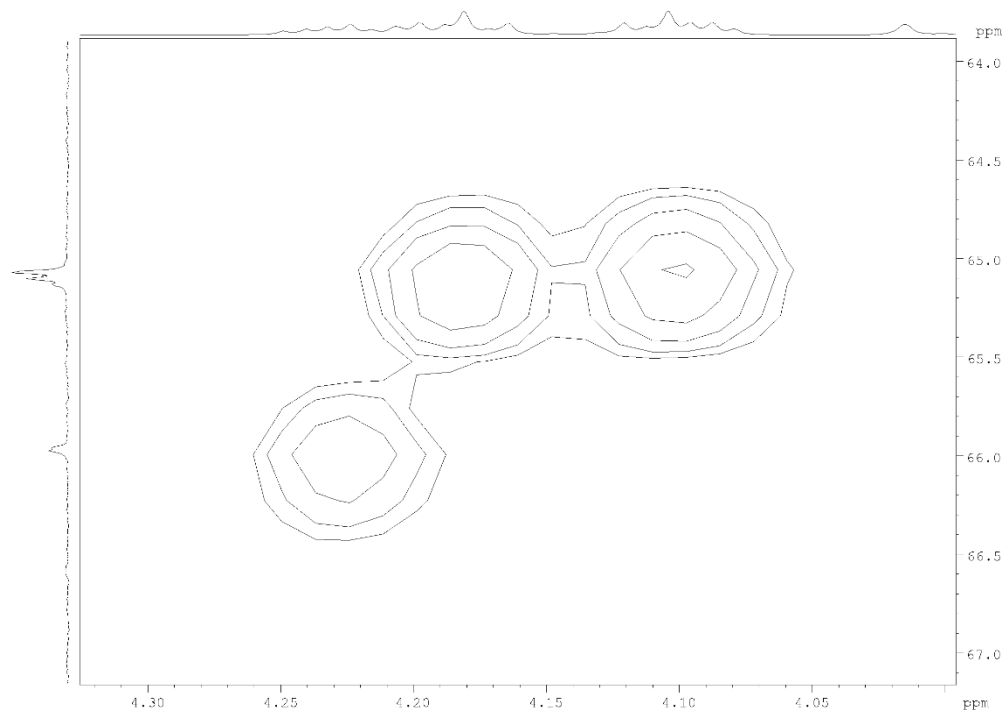
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



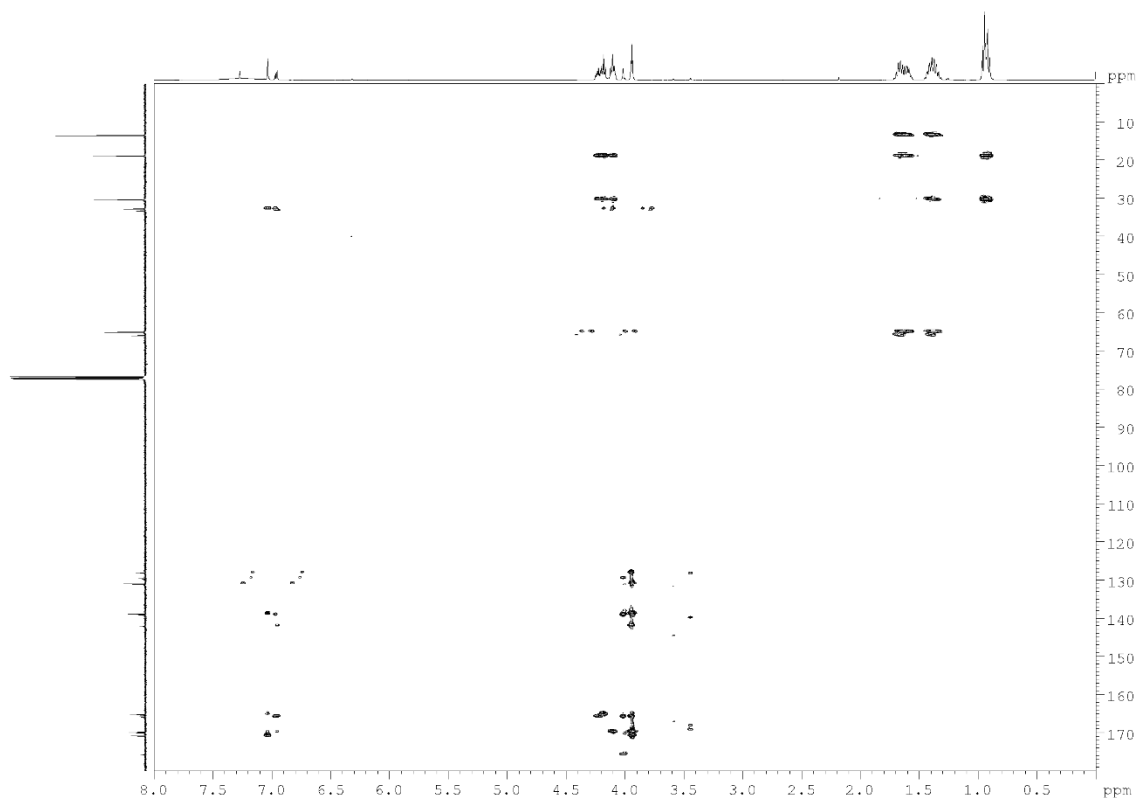
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais olefínicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



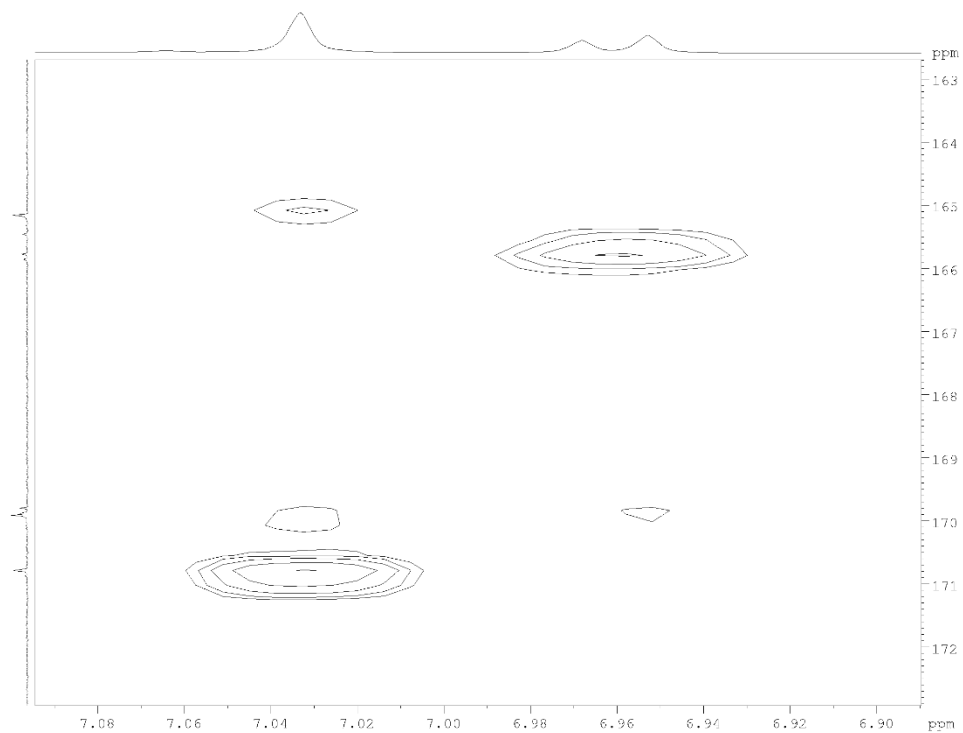
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais oximetilênicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



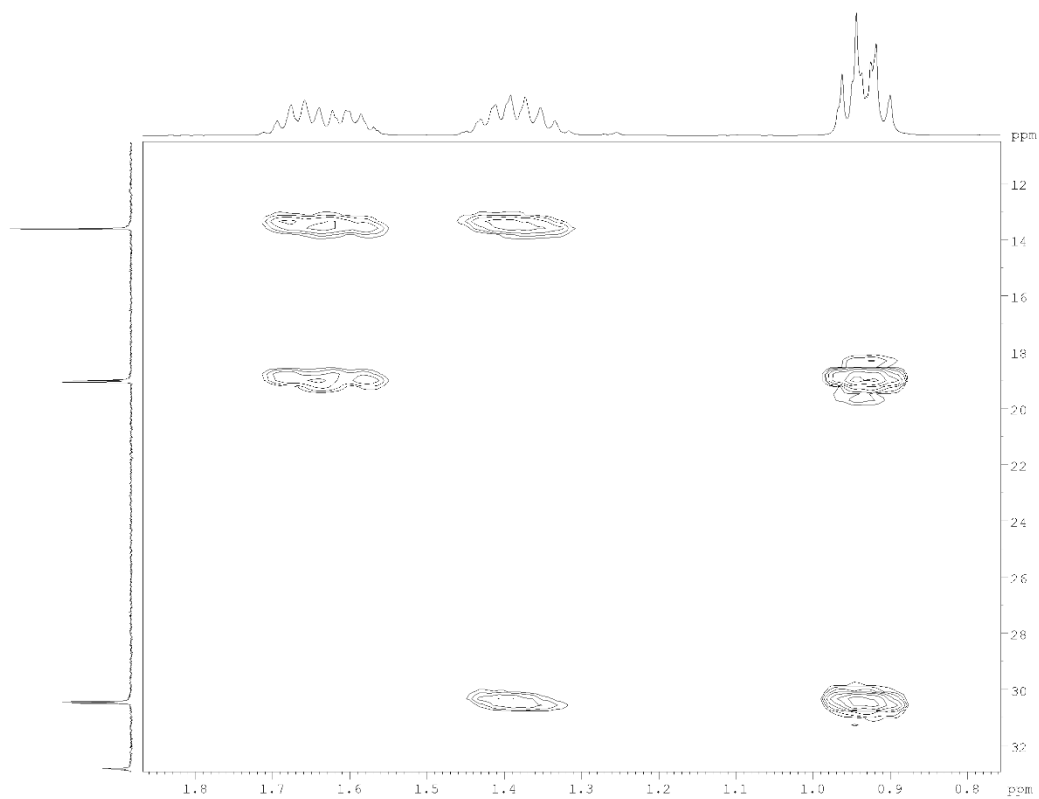
Mapa de contornos HMBC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



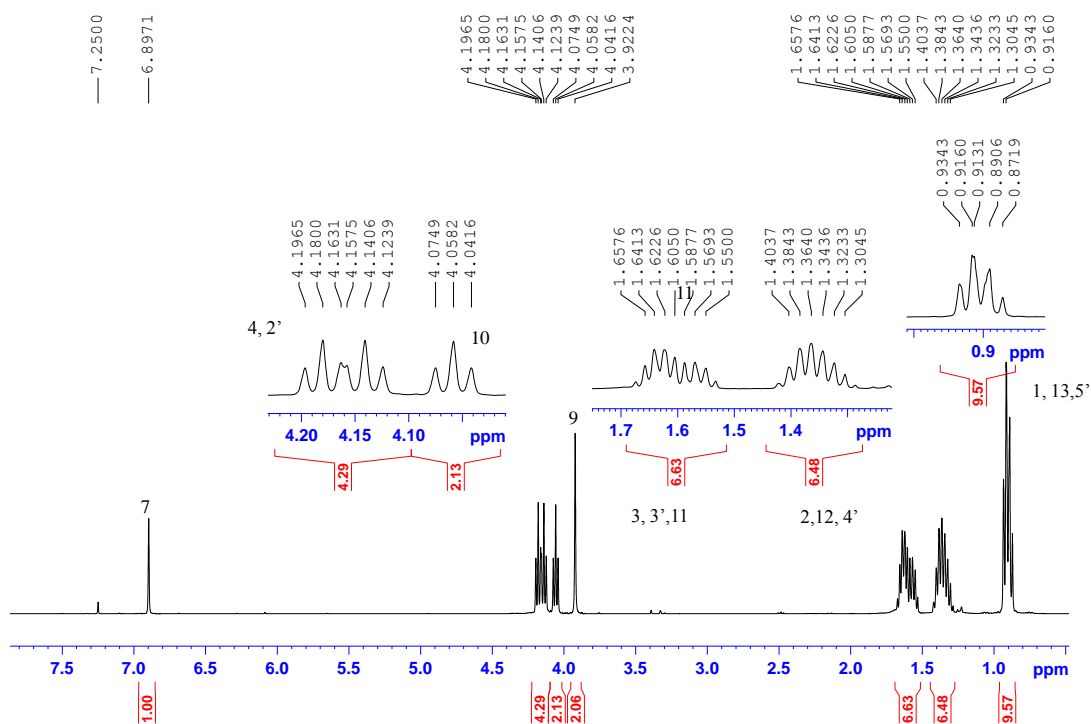
Mapa de contornos HMBC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico (expansão da região de sinais olefínicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



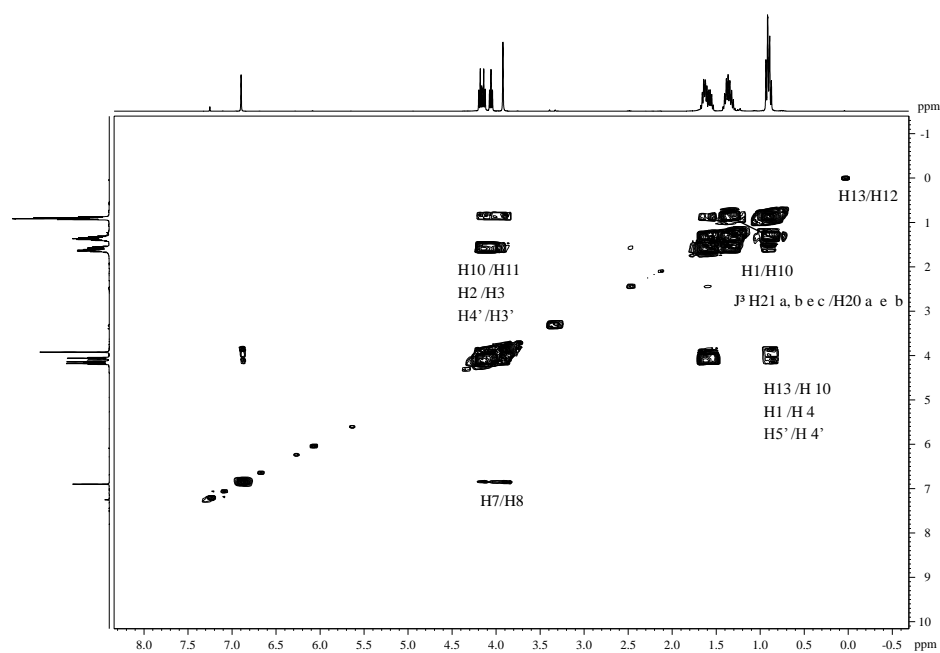
Mapa de contornos HMBC da mistura isomérica de diésteres *n*-butílicos do *trans*-aconítico (expansão da região de sinais oximetilênicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



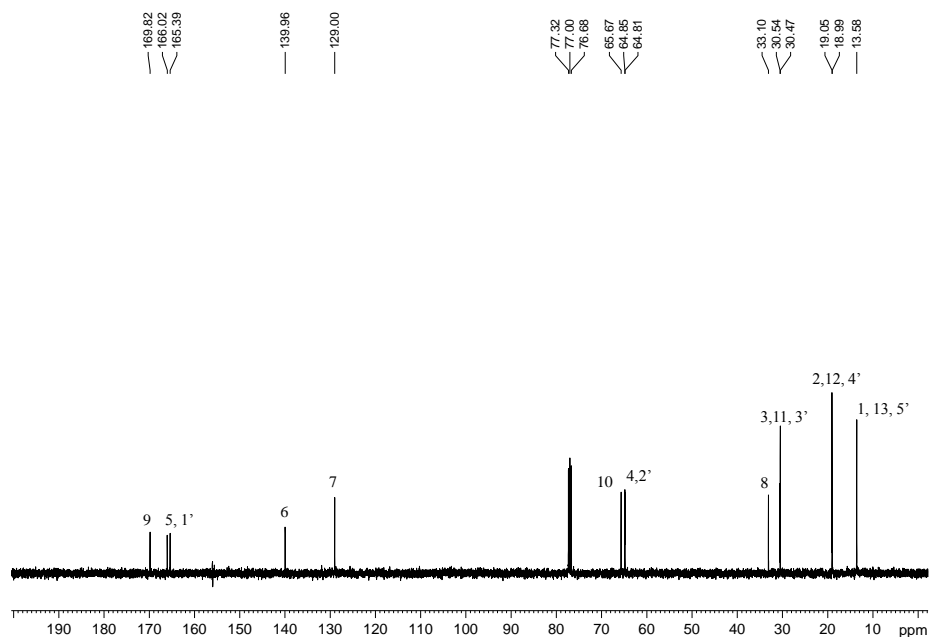
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico e expansões (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



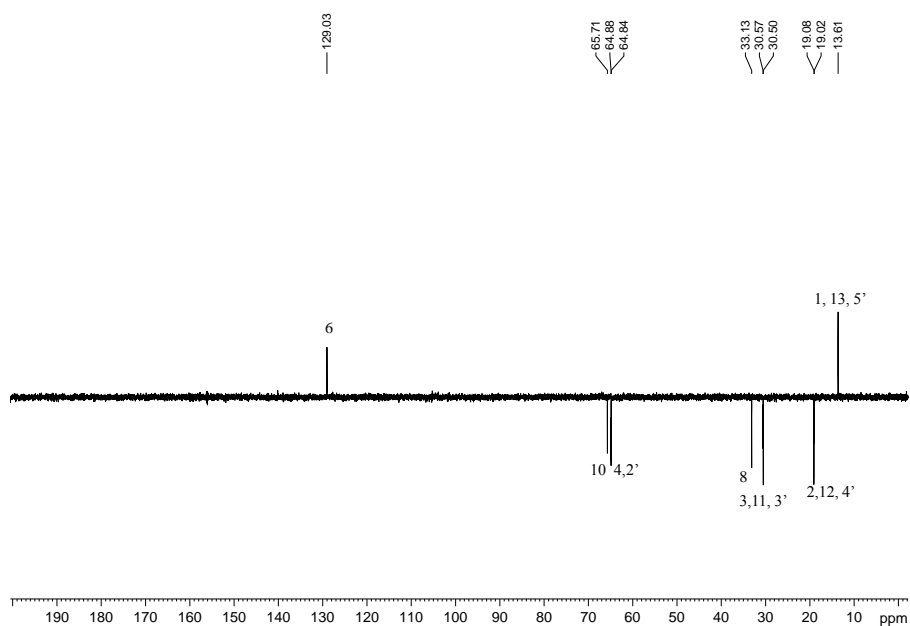
Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) obtido para o triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico.



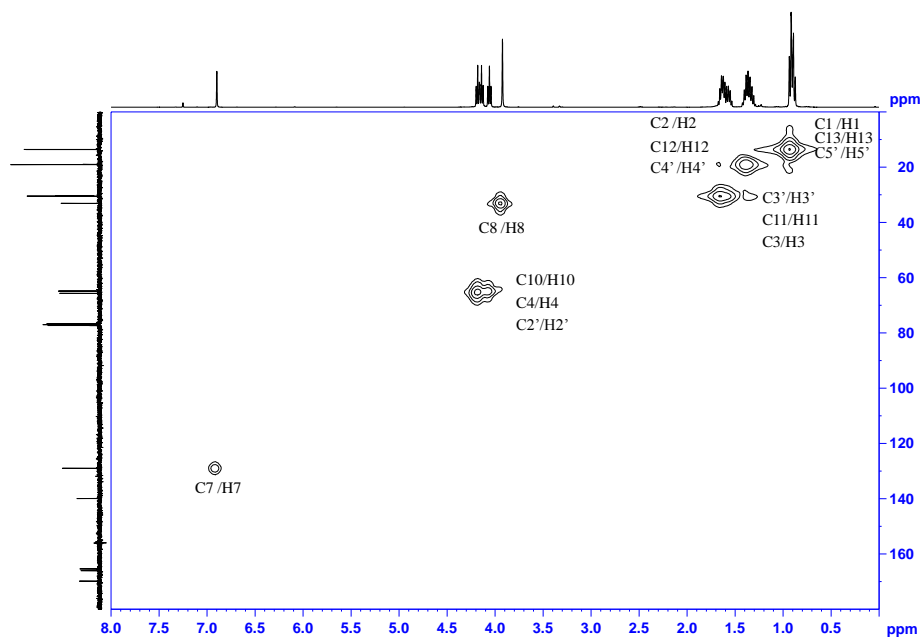
**Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  triéster *don*-butílico do ácido *trans*-aconítico(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



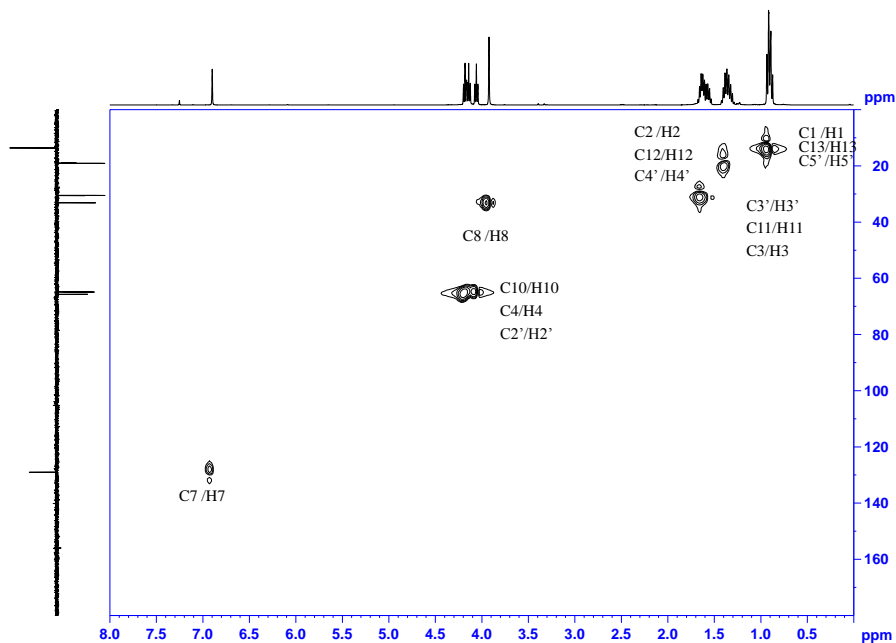
**Subespectro DEPT-135 obtido para o triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



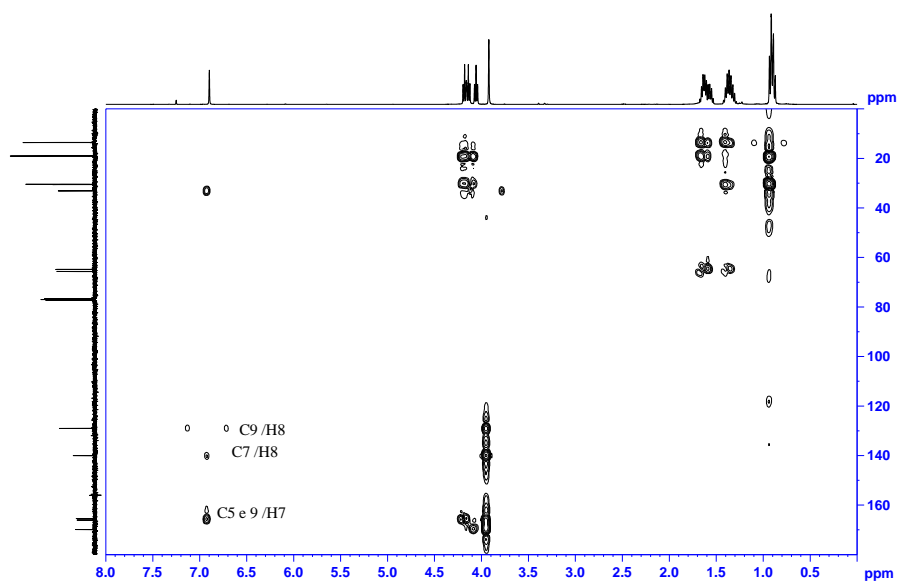
Mapa de contornos HMQC do triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Mapa de contornos HSQC do triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

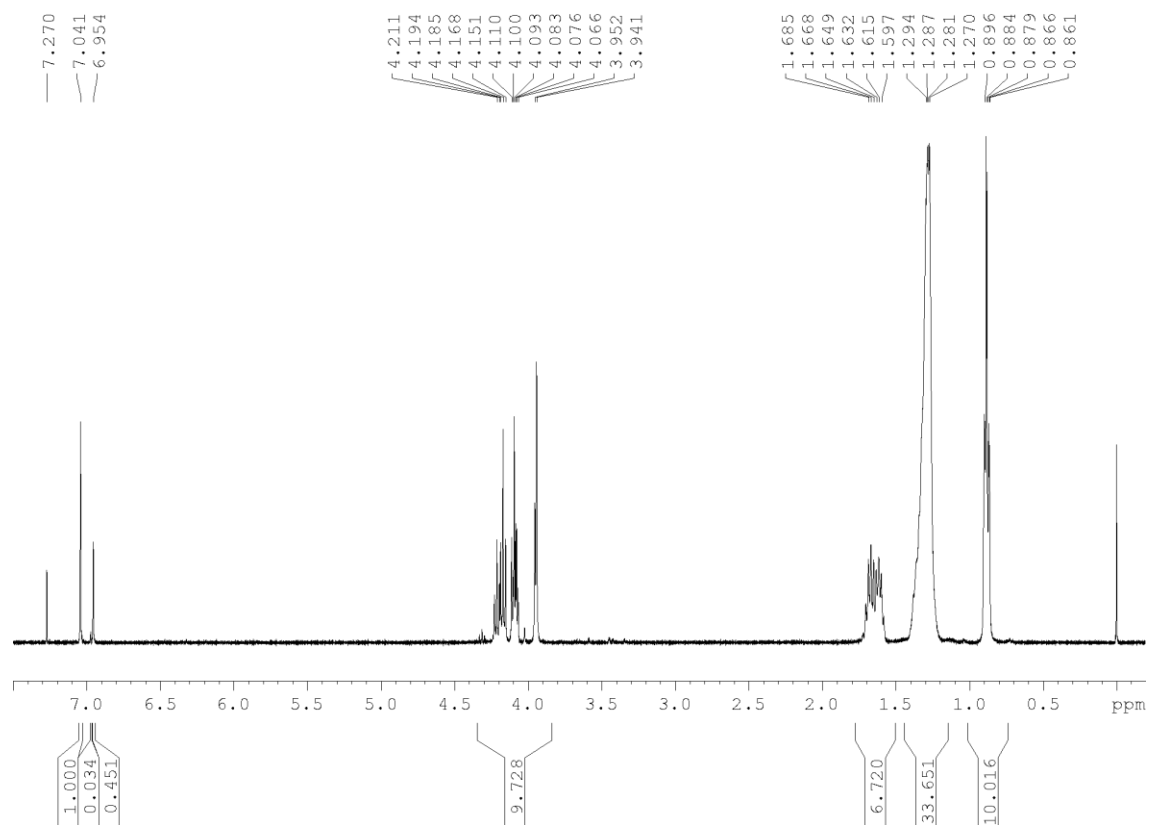


Mapa de contornos HMBC do triéster *n*-butílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

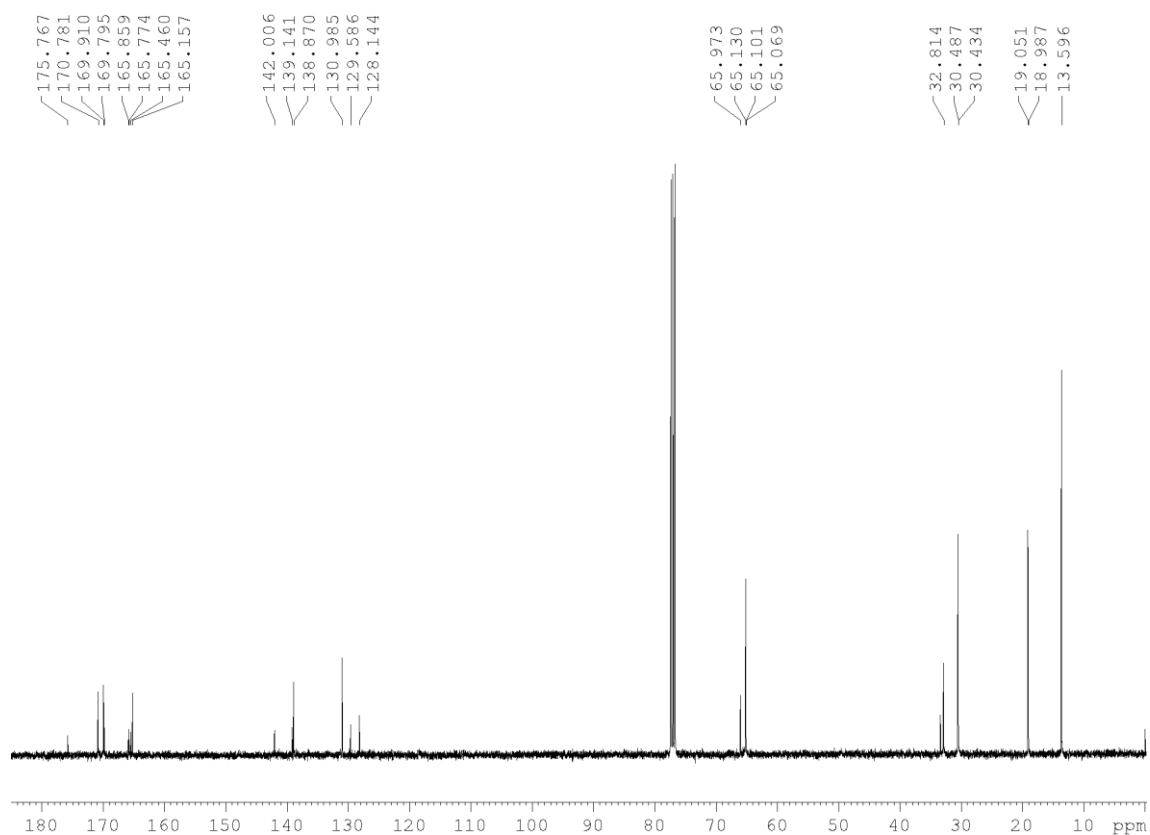




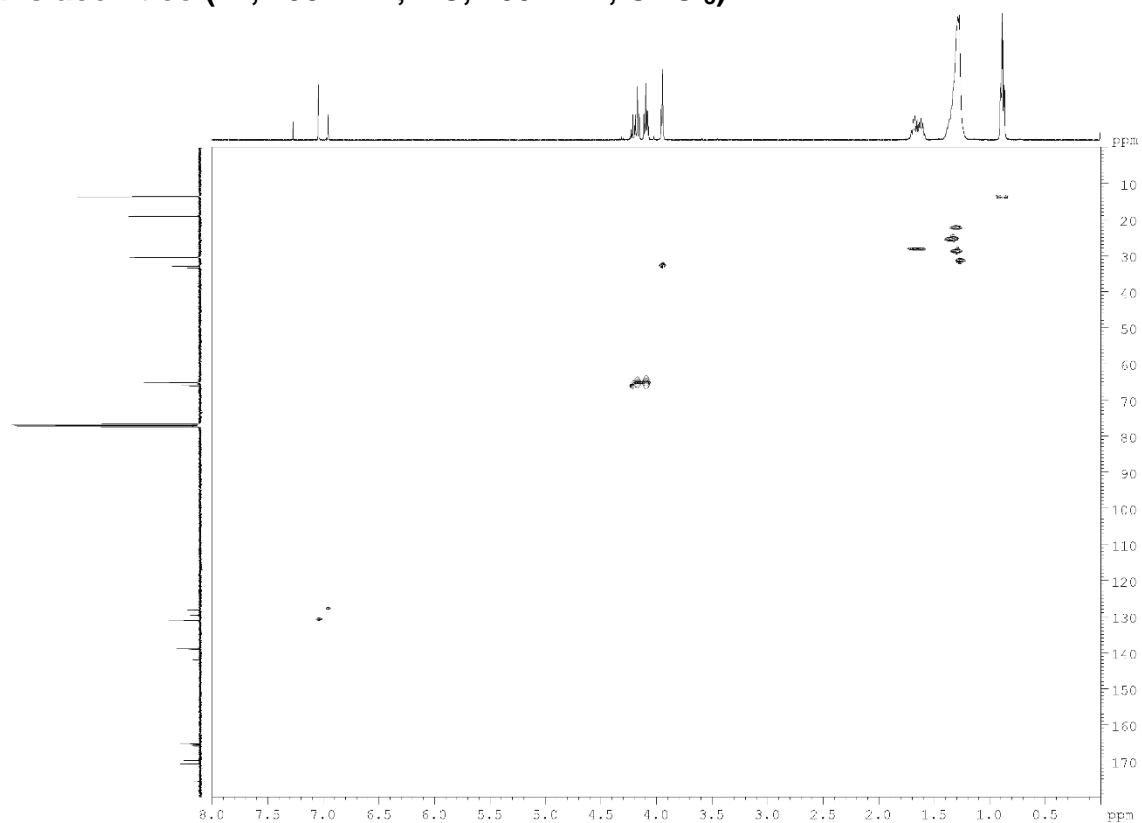
## Triéster octílico

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

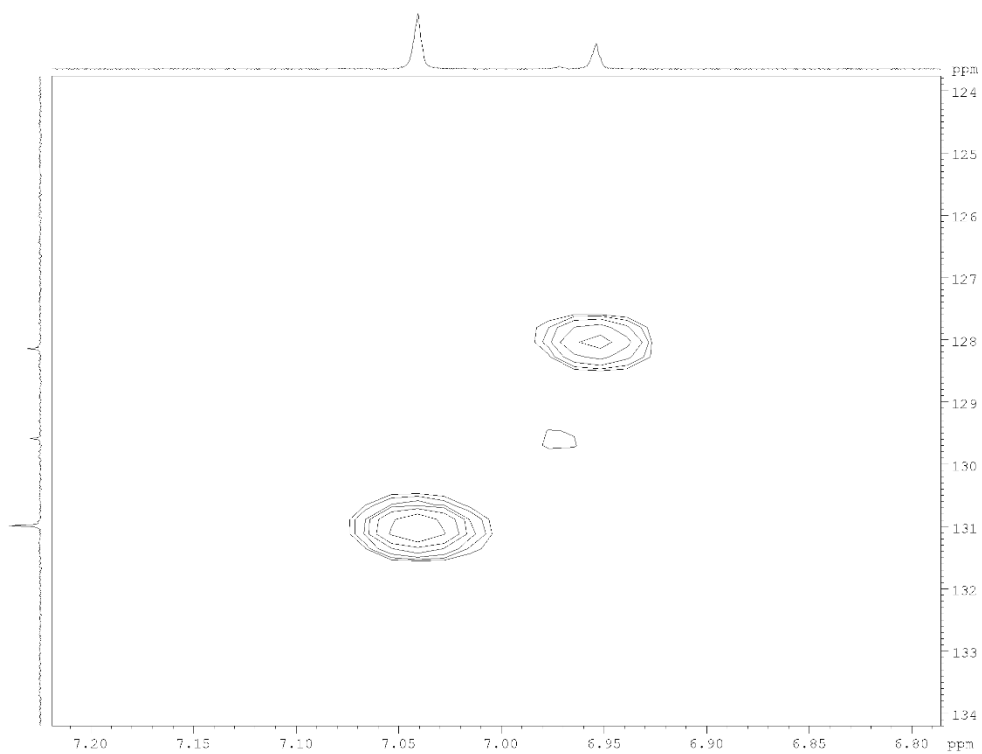
**Espectro de RMN  $^{13}\text{H}$  da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do ácido *trans*-aconítico ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).**



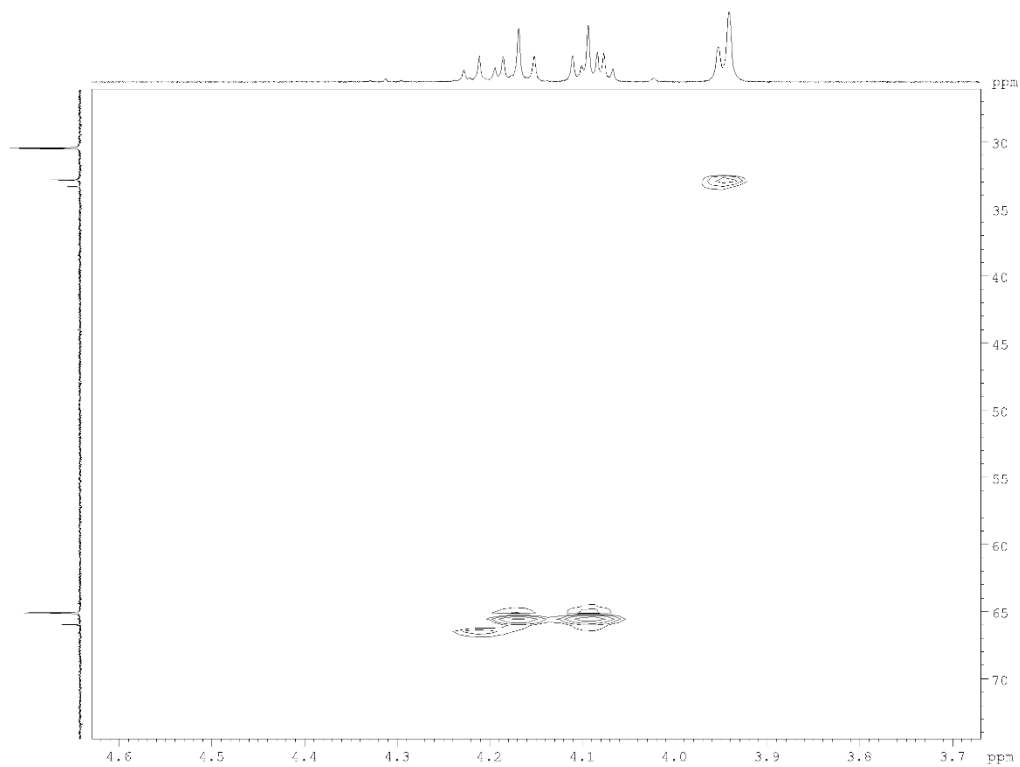
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



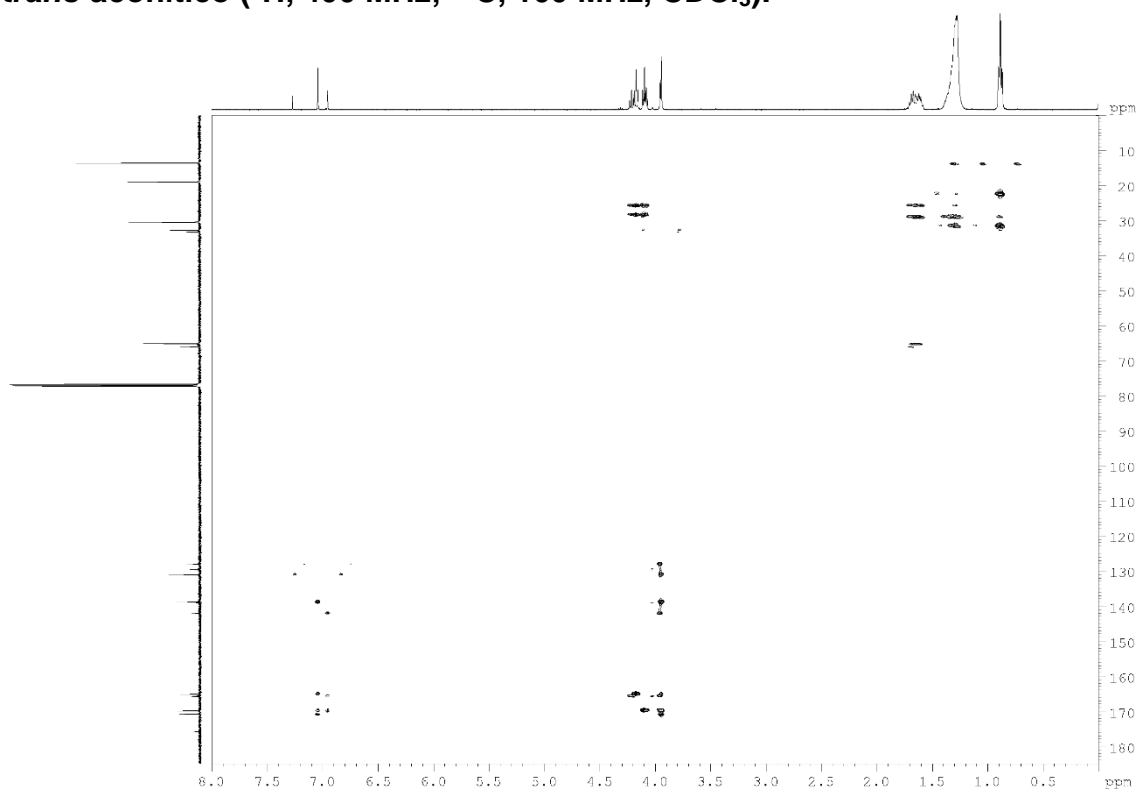
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais olefínicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



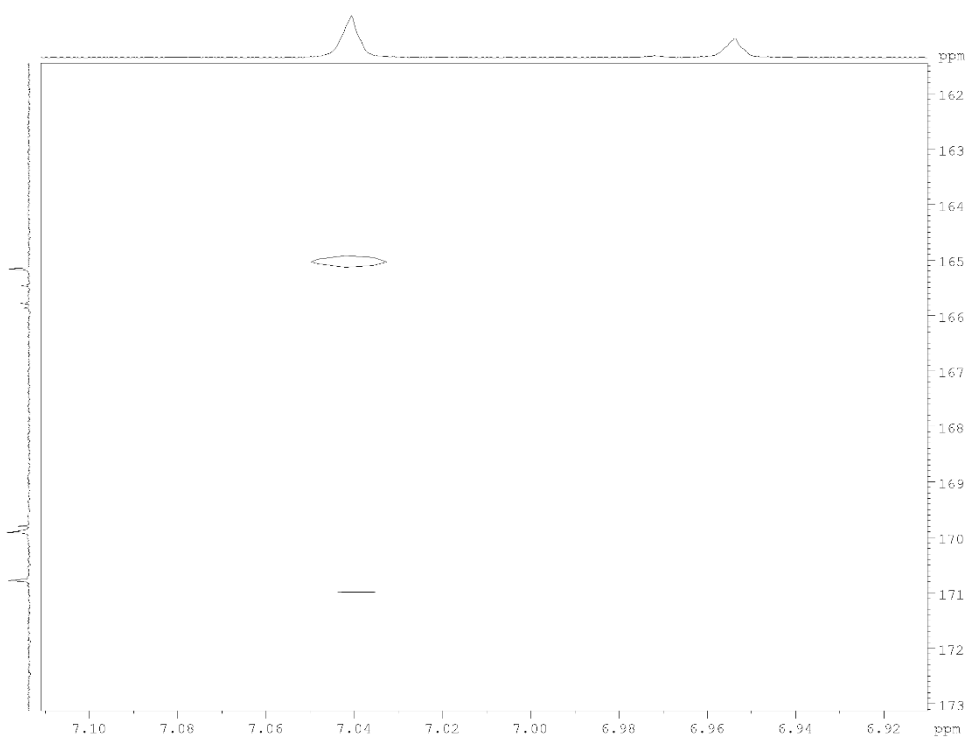
Mapa de contornos HSQC da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais oximetilênicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



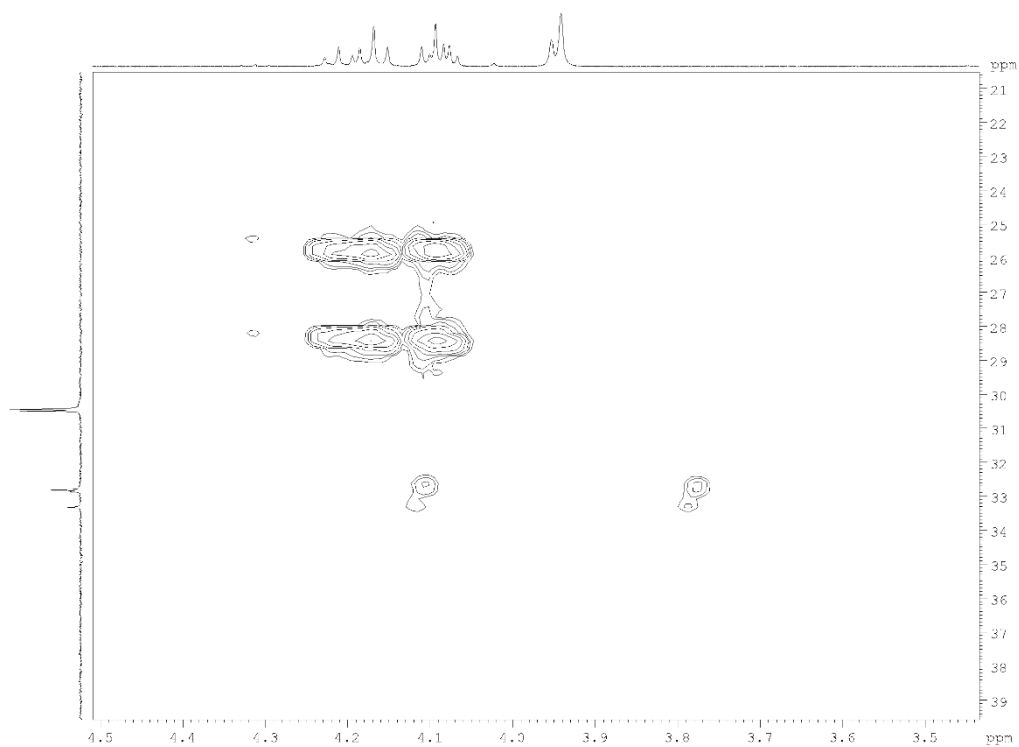
Mapa de contornos HMBC da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



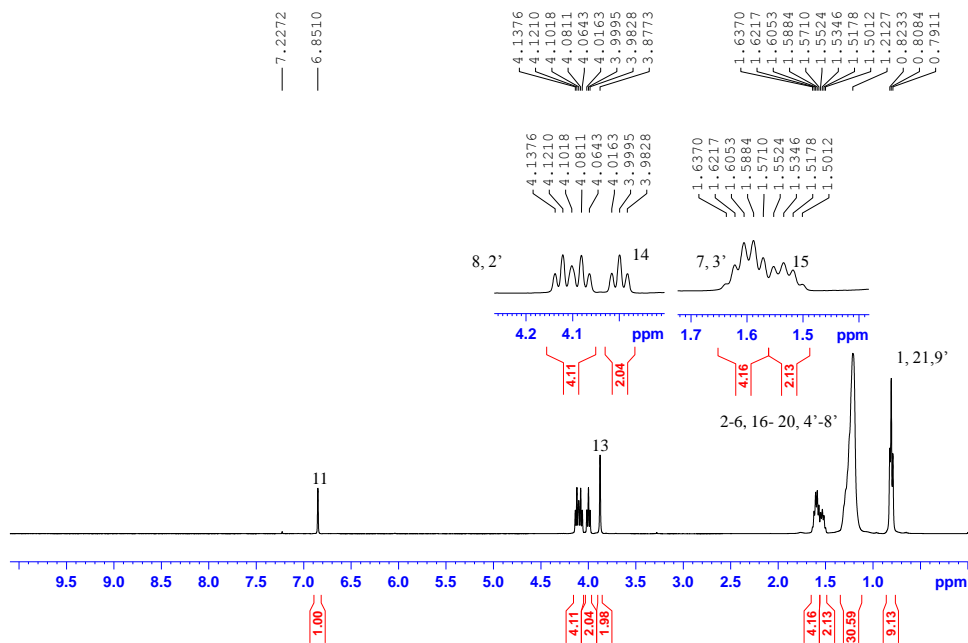
Mapa de contornos HMBC da mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais olefínicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



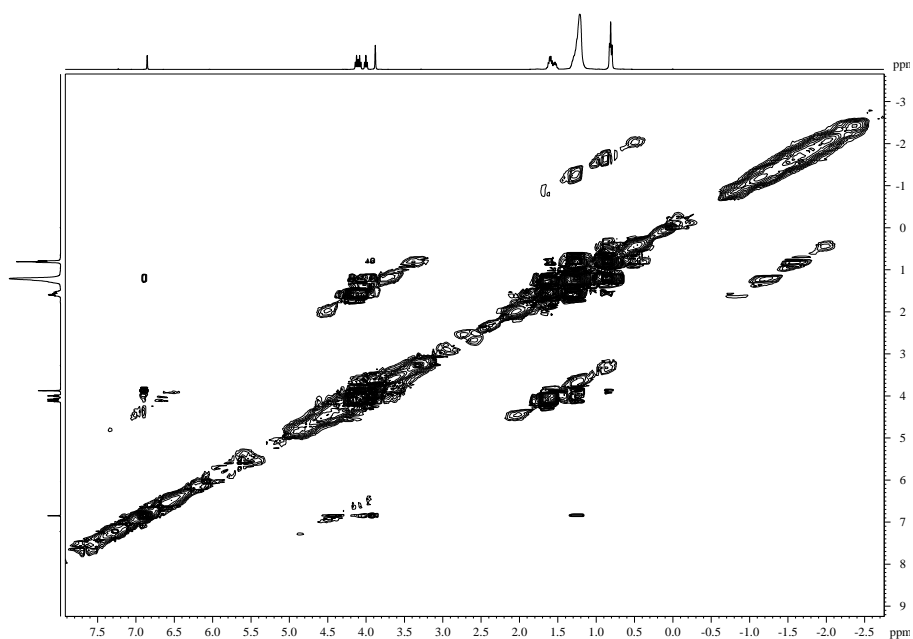
Mapa de contornos HMBCda mistura isomérica de diésteres *n*-octílicos do *trans*-aconítico (expansão da região dos sinais oximetilênicos;  $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico e expansões (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

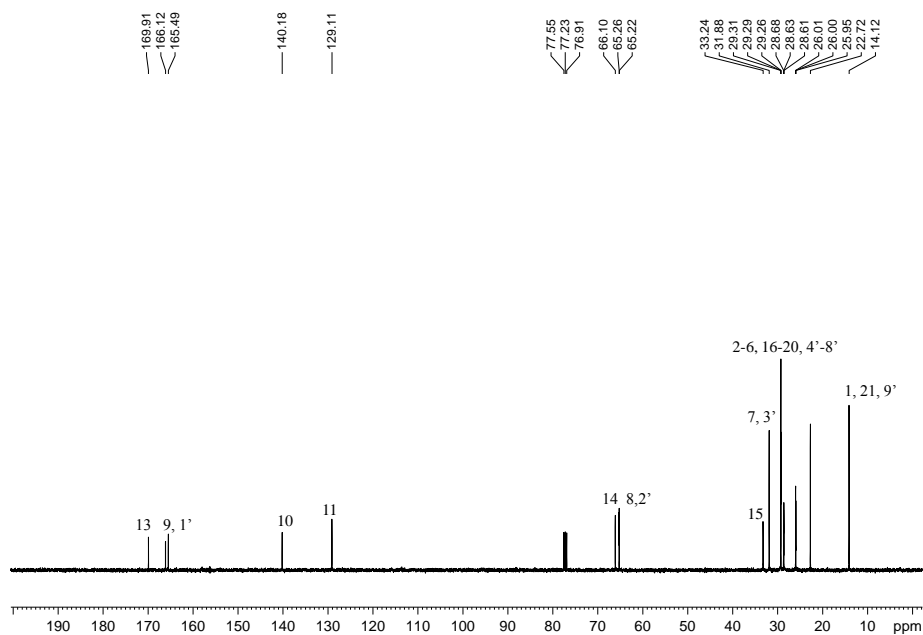


Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) obtido para o triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico.

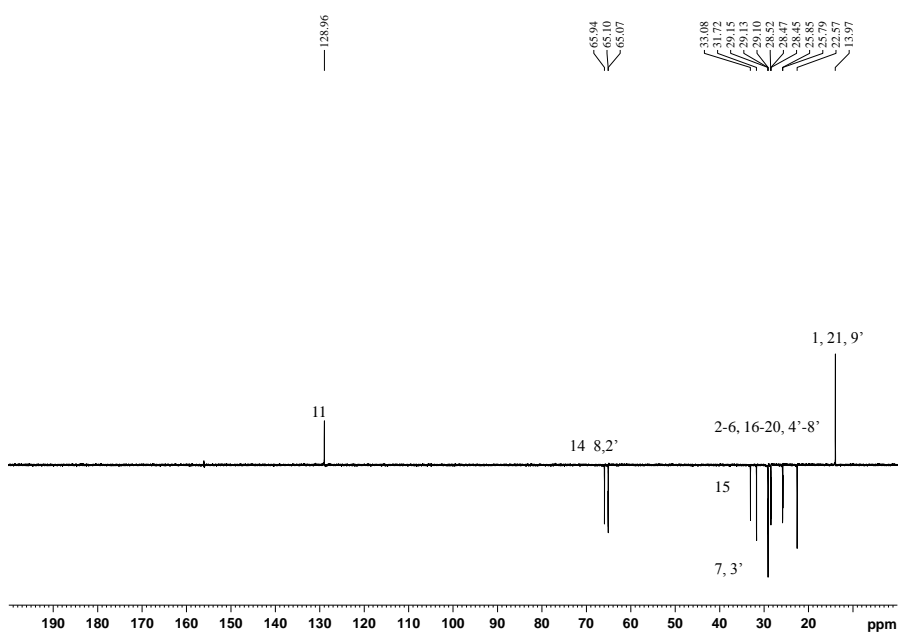




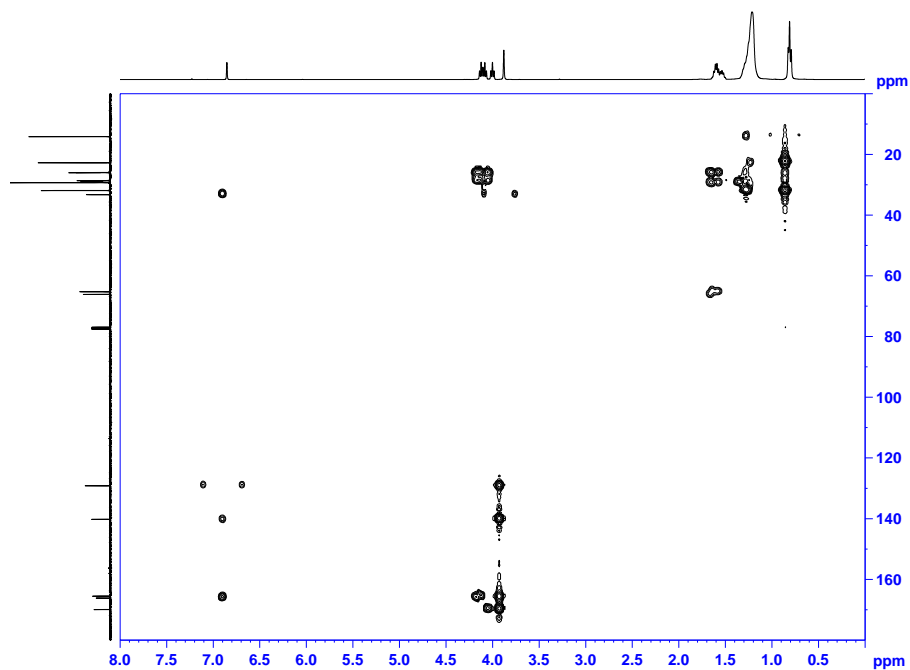
**Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



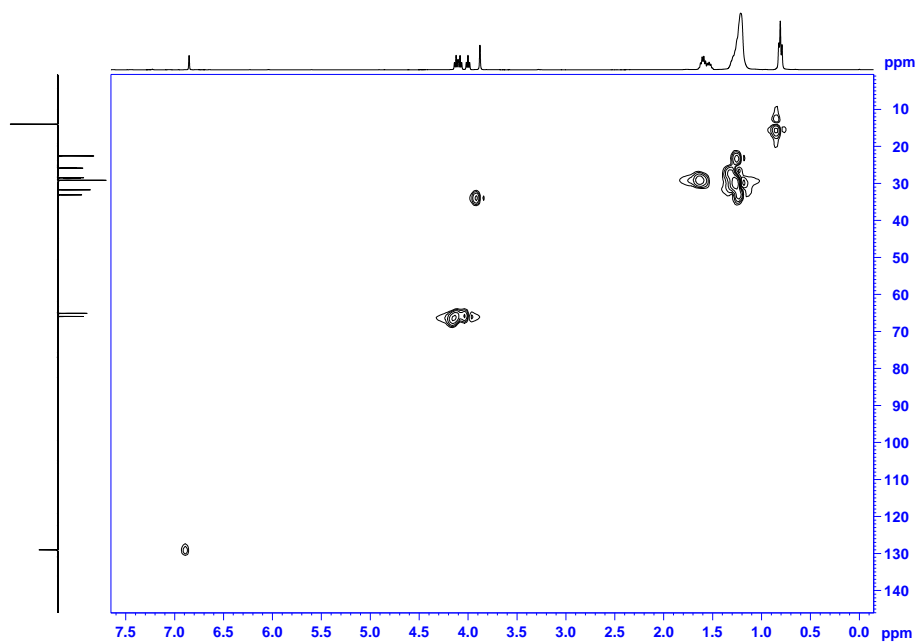
**Subespectro DEPT-135 obtido para o triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



Mapa de contornos HMQC do triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Mapa de contornos HSQC do triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Mapa de contornos HMBC do triéster *n*-octílico do ácido *trans*-aconítico ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

