

VIVIANE APARECIDA GUILHERME

**“AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES
ANALGÉSICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÁCIDO P-COUMÁRICO
INTERCALADO EM NANOPARTÍCULAS DE HIDRÓXIDOS DUPLOS
LAMELARES.”**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Viviane Aparecida Guilherme

“Avaliação da citotoxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do ácido p-coumárico intercalado em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares.”

Esta dissertação corresponde à versão final
do trabalho defendido pelo(a) candidato (a)
Viviane Aparecida Guilherme
Daniele Ribeiro de Araujo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo
Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G945a Guilherme, Viviane Aparecida, 1983-
Avaliação da citotoxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do ácido p-coumárico intercalado em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares / Viviane Aparecida Guilherme. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.
Orientador: Daniele Ribeiro de Araujo.
Coorientador: Eneida de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Ácido p-coumárico. 2. Hidróxidos duplos lamelares. 3. Liberação *in vitro*. 4. Testes *in vivo*. I. Araujo, Daniele Ribeiro de. II. Paula, Eneida de, 1963-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em Inglês: Citotoxicity available and analgesic anti-inflammatory activity of p-coumaric acid intercalated in hydroxide double layered nanoparticle

Palavras-chave em Inglês:

P-coumaric acid

Hydroxide double layered

Release *in vitro*

Assay *in vivo*

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Daniele Ribeiro de Araujo [Orientador]

Vera Regina Leopoldo Constantino

Marcelo Lancellotti

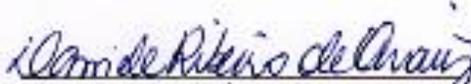
Data da defesa: 29-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

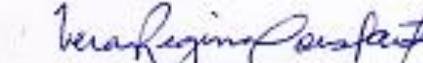
Campinas, 29 de agosto de dois mil e doze

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo


Assinatura

Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti


Assinatura

Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda

Assinatura

Profa. Dra. Carlos Alberto da Silva

Assinatura



À DEUS SIMPLEMENTE POR
PERMITIR A MINHA VIDA E MOSTRAR O
CAMINHO A SEGUIR.....

Agradecimentos

Á minha família maravilhosa! Minha mãe, Rosangela, pelo exemplo de força e superação, ao meu Pai amado, Wanderson, pelo amor incondicional conselhos e ombro amigo de toda uma vida!!! Á minha irmã, Juliana, por ser tão amiga me ajudar sempre!! AMO MUITO TODOS VOCÊS!!

Ao meu Lindo, Cristiano, meu marido querido, te amo obrigada por estar ao meu lado, me compreender sempre... você é tudo pra mim, meu amigo, meu companheiro, TE AMO assim ó....!! Meu Lindinho Léo, filho te amo, apesar de você ainda ser só um bebê você já é o companheiro da mamãe, TE AMO!!

Á Rita e Moacir (Sogra e Sogro), pela amizade, alegria e tranquilidade por mostrar que Deus está sempre no comando, muito obrigada!

Á minha super amiga Carol e ao Gu (amigo mais lindo do Léo!!)... Amiga, obrigada por estar comigo em todos os momentos dos felizes aos desesperadores, por me ajudar como ninguém!!! Sem você a caminhada seria mais difícil!!!

Como não agradecer a todos do Biomembranas, a passagem por aqui é mais do que uma etapa cumprida são amigos, que deixam sua marca em nossos corações por todos os dias de companhia e conselhos, não há nada a se apagado todos os momentos são inesquecíveis e de muito aprendizado!!

Á Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo pela disposição para a minha orientação!! Por sempre me atender quando precisei, mesmo á distância!! Um exemplo de professora e de pessoa para mim! Muito Obrigada!

Á Profa. Dra. Eneida de Paula, por tudo que me ensinou e ainda ensina, orientações do PED, seminários em grupo e mais que isso por ser um exemplo de dedicação e determinação!

Á Profa. Vera Constantino e a doutoranda Vanessa Roberta Cunha pelo fornecimento dos compostos utilizados em todo o meu trabalho e por esclarecimento de dúvidas decorrentes á esse trabalho.

Á Profa. Dra. Cíntia Maria Cereda, ou cózinha , ou futura mamãe científica... por me acalmar, me aconselhar, me ouvir enfim, por estar do meu lado nessa fase tão difícil!!

Ao Prof. Dr. Cleyton Crepaldi Domingues, por ser tão determinado, não desistir fácil das coisas e ser tão viajado....rsrsrsrs e como não pelas risadas e conversas!!

À Camila, amiga que encontrei no meio da caminhada e que tem me dado muito apoio, sabendo aconselhar como a mamãe (cózinha) e sempre trazendo mais pessoas para perto de nós!!! Camila VC É MINHA AMIGUINHA!!! (e de todos alunos nacionais e internacionais da Unicamp!!!)

À Bruna Casadei, Ana Laís , Vivi Vieira, Allan Radaic, Raquel, Michele (Mi) pelos bate papos, assuntos amorosos e científicos, pela amizade!! A querida, Vivi Queiroz, que como eu tem coragem para trabalhar com animais, e me ensinou muito nesses últimos tempo, e já tem deixado muita saudade aqui no lab.

À Maribel e ao Marcio pelo apoio e ajudas quando precisei de matéria prima para trabalhar...rsrsr. Quando ouvia-se um Belllll.....lá vinha a Vivi querendo algo !!

Ao Cafezinho nosso de cada dia...rsrsr! Idas ao café da física onde eram abordados assuntos: filosóficos, esportivos (Vai Curinthia) ou apenas para jogar conversa fora!!

Á TODOS VOCÊS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS !

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. O PROCESSO INFLAMATÓRIO E SEUS MEDIADORES.....	2
1.1 VIA DA CICLOOXIGENASE.....	4
2. DOR DE ORIGEM INFLAMATÓRIA.....	9
3. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROÍDAIS (AINEs).....	12
4. PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.....	14
4.1. OS COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA VARIABILIDADE ESTRUTURAL.....	15
4.1.1. ÁCIDO P- COUMÁRICO: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	17
5. NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS DE HIDRÓXIDO DUPLOS LAMELARES (HDL) COMO SISTEMAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.	20
II. OBJETIVOS.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1. FÁRMACOS E REAGENTES.....	29
2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS $Zn^{2+}/Al^{3+}/CO_3^{2-}$ -HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES.....	29
3. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÁCIDO COUMÁRICO.....	30
5. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> : LIBERAÇÃO DE ÁCIDO COUMÁRICO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS $Mg^{2+}/Al^{3+}/CO_3^{2-}$ - HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES.....	30
6. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	32
6.1. TESTE DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO.....	32
7. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTIINFLAMATÓRIA.....	33
7.1. PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	34
7.2. TESTE DE FORMALINA.....	35
7.3. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO.....	36
7.4. <i>TAIL FLICK</i> TESTE.....	36
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÁCIDO COUMÁRICO.....	40
1.1. LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	41

1.2. CITOTOXICIDADE: INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO	44
2. TESTES FARMACOLÓGICOS	46
2.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA: TESTE DE INDUÇÃO DE PERITONITE.....	46
2.2. ATIVIDADE ANALGÉSICA-ANTIINFLAMATÓRIA: TESTE DA FORMALINA.....	47
2.3. ATIVIDADE ANALGÉSICA-ANTIINFLAMATÓRIA: TESTE DE INDUÇÃO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS	52
2.4. ATIVIDADE ANALGÉSICA: TESTE <i>TAIL FLICK</i>	53
V. CONCLUSÃO.....	58
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
VII. ATIVIDADE DESENVOLVIDAS.....	72
VIII. ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema das vias que levam a inflamação. Vias resultantes de: estímulos nocivos com lesão na membrana desencadeando a síntese de prostaglandinas (PGs), ação de toxinas virais e bacterianas desencadeando a síntese de fatores de necrose (NF- κ B), ativação de mastócitos e complexo sérico antígeno-anticorpo (Ag-At) desencadeando o sistema complemento. A via destacada em vermelho será a via mais abordada nesta introdução. Adaptação de Gautam e Jachak (2009). 3
- Figura 2:** Liberação de ácido araquidônico a partir de moléculas de fosfolípídios de membrana. Ação da fosfolipase A_2 na clivagem da ligação éster na posição Sn2 do fosfolípídio de membrana (glicofosfolípídio) e liberação do ácido araquidônico..... 5
- Figura 3:** Via de síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Através da ação da COX temos a síntese de PGH_2 precursor das demais prostaglandinas e do tromboxano A_2 . Adaptado de Lehninger (2006). 6
- Figura 4:** Esquema das diferentes fases que envolvem o processo doloroso. A nocicepção leva a dor a intensidade da dor vai variar conforme a percepção individual que pode levar a uma alteração comportamental. A alteração comportamental também pode levar a aumentar a percepção da dor. 10
- Figura 5:** Ilustração da inibição da COX por AINEs. Sendo A- COX-1 e COX-2 inibidas por AINEs não seletivos e B- Inibição seletiva da COX-2 por AINEs seletivos. Adaptado de Rang (2003). 13
- Figura 6:** Estrutura básica de um fenol..... 15
- Figura 7:** Via de síntese de ácido p-coumárico a partir da glicose e seus compostos derivados. A síntese de ácido p-coumarico pode ser feita de forma direta a partir do aminoácido tirosina e de forma indireta do aminoácido fenilalanina. 18
- Figura 8:** Sugestão de arranjo entre HDL ($MgFe_2O_4$) e ibuprofeno, sugerido que a matéria a ser inserida no HDL encontra-se no lugar do ânion. Figura retirada de Ay (2009). 23

Figura 9: Ilustração de uma célula de Franz utilizada para teste de liberação in vitro. Em laranja compartimento doador, em amarelo compartimento receptor e em verde membrana que separa esses compartimentos..... 31

Figura 10: Molécula de Vermelho Neutro (VN)..... 32

Figura 11: Foto do Analgesímetro utilizado para a realização do teste de tail flick. A- base do analgesímetro emitindo a fonte de calor; B- Contensor de acrílico utilizado para imobilizar o animal. 37

Figura 12: Análise espectrofotométrica de varredura. 40

Figura 13: Curva de calibração para o ácido coumárico. Obtida por espectrofotometria UV-VIS em diferentes concentrações (n=6). 41

Figura 14: Perfis de liberação do ácido coumárico livre (AC) e intercalado a nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (AC-HDL). Dados expressos em porcentagem de fármaco liberado em função do tempo. Dados apresentados como média \pm SD (n=5). 42

Figura 15: Modelo de difusão de Higuchi. Aplicados aos perfis de liberação do AC livre e intercalado em HDL (AC-HDL)..... 43

Figura 16: Gráfico da porcentagem de células viáveis. Resultados extraídos pós-tratamentos com diferentes concentrações de ácido coumárico livre e intercalado em HDL, avaliada pelo teste de incorporação do VN. Resultados expressos em média \pm SD (n=6). 45

Figura 17: Número de células leucocitárias por mL de líquido pleural pós-tratamentos com AC livre (AC) ou intercalado em HDL (AC-HDL), nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, comparados à indometacina (Indo, 50 mg/kg). Sendo a- Indo 50mg/kg vs controle; b- AC 10mg/kg vs Indo 50mg/kg; c- AC 10mg/kg vs AC-HDL 10 mg/kg; d- AC-HDL 10mg/kg vs controle; e- AC 20mg/kg vs controle; f- AC-HDL 20mg/kg vs controle; g- AC 30mg/kg vs controle; h- AC-HDL 30mg/kg vs controle . ***p<0,001 (média \pm SD, n=7/grupo). 47

Figura 18: Teste de formalina no tempo de 0-5. A- compostos aplicados sem associação; B- compostos associados à naloxona; C- compostos associados à cafeína. Análise

estatística com significância de $***p < 0,001$ (ANOVA) sendo a- indo vs controle; b- Morf vs controle; c- AC vs controle; d- AC-HDL vs controle; e- Morf vs indo 49

Figura 19: Teste de formalina no tempo de 15-30. A- compostos aplicados sem associação; B- compostos associados à naloxona; C- compostos associados à cafeína. Análise estatística com significância de $***p < 0,001$; $**p < 0,01$ e $p < 0,05$ (ANOVA) sendo a- indo vs controle; b- Morf vs controle; c- AC vs controle; d- AC-HDL vs controle; e- Morf vs indo; f- AC vs AC-HDL. 51

Figura 20: Gráfico do número de contorções em 20 min de experimento. Onde a- AC-HDL 10 mg/kg vs Indo 50mg/kg; b- AC-HDL 10 mg/kg vs AC 10 mg/kg c- AC-HDL 10 mg/kg vs AC 20 mg/kg; d- AC-HDL 20 mg/kg vs Indo 50mg/kg; e- AC-HDL 20 mg/kg vs AC 20 mg/kg; f- AC-HDL 30 mg/kg vs Indo 50mg/kg ; g- AC-HDL 30 mg/kg vs AC 30 mg/kg. $***p < 0,0001$ (média \pm SD, n=7/grupo). 52

Figura 21: Curvas de efeito máximo percentual versus tempo obtidas pós-tratamento com AC livre ou AC-HDL, nas doses de 10 mg/kg (A), 20 mg/kg (B) e 30 mg/kg (C), no teste tail flick sendo a- Indo vs AC; b- Indo vs AC-HDL; c- AC vs AC-HDL $*p < 0,05$ $**p < 0,001$ $***p < 0,0001$ Two-Way ANOVA (Média \pm SEM, n=7/grupo). 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Efeito fisiológico das prostaglandinas. Diferentes tipos de prostaglandinas e suas ações sistêmicas.	8
Tabela 2: Estrutura básica para as classes de compostos fenólicos de planta (Angelo e Jorge, 2007).	16
Tabela 3: Efeito observado durante cada tempo de análise do teste de formalina segundo Abbott (1995).....	35
Tabela 4: Área sob a curva (ASC) e tempo de duração da analgesia (T_{REC}). Obtidos para as curvas de efeito versus tempo após o teste tail flick a- AC 10mg/kg vs indo; b- AC-HDL 10mg/kg vs indo; c- AC 10mg/kg vs AC-HDL 10 mg/kg; d- AC-HDL 20mg/kg vs indo; e- AC 20mg/kg vs AC-HDL 20mg/kg; f- AC 30mg/kg vs Indo; g- Indo vs AC-HDL 30mg/kg; h- AC 30 mg/kg vs AC-HDL 30 mg/kg sendo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Média (mínimo. e máximos $n=7$ /grupo).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

12-HETE	Ácido hidroxiieicosatetranoíde
AINEs	Anti-inflamatório não esteroidal
ASC	Área sob a curva
BK	Bradicinina
CN	Controle negativo
COX	Ciclooxigenase
FLA₂	Fosfolipase A ₂
HDL	Hidróxido duplo lamelares
IL	Interleucina
INF	Interférons
LPS	Lipossacarídeos
LT	Leucotrienos
MCT	Transportador de ácido monocarboxílico
MMP	Metaloproteínas
NF-κB	Fator nuclear kappa b
NO	Oxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PGs	Prostaglandinas
TNF	Fator de necrose tumoral
TXs	Tromboxanos
VN	Vermelho neutro

RESUMO

Compostos anti-inflamatórios não esteroídais (AINEs) são amplamente utilizados para o combate da inflamação, mas frequentemente acarretam efeitos adversos que impedem a continuação do tratamento. Atualmente, a terapia a base de plantas tem sido bastante empregada a fim de desenvolver novos fármacos que apresentem eficácia analgésica e anti-inflamatória. Nesse contexto, a utilização de sistemas carreadores, como as nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (HDL), visa melhorar propriedades biofarmacêuticas e farmacológicas dos compostos nelas intercalados. Dessa forma, este estudo teve como objetivo caracterizar a interação entre o ácido coumárico (AC), um composto fenólico extraído de plantas, e hidróxido duplo lamelares (HDL), nanopartículas inorgânicas, considerando parâmetros como a cinética de liberação *in vitro*, a citotoxicidade e as atividades analgésica-antiinflamatória em relação ao fármaco não intercalado. Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando uma célula de difusão vertical (com membrana de acetato de celulose, MWCO 1000 Da) e a viabilidade celular avaliada em células 3T3 pelo teste de incorporação do vermelho neutro (VN). Os testes farmacológicos realizados em camundongos swiss foram: a determinação do número de contorções abdominais, teste *tail-flick*, ensaios de peritonite e teste de formalina para o composto livre e intercalado nas concentrações de 10, 20 ou 30 mg/kg. Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que a intercalação reduziu significativamente a constante de liberação (K_{lib}) do AC, em relação ao fármaco livre, sendo os valores de K_{lib} de $41,6 \pm 1,5 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$ e $32,4 \pm 1,5 \text{ \%} \cdot \text{h}^{-1}$, para o AC e AC-HDL, respectivamente. A viabilidade celular foi reduzida apenas em concentrações mais elevadas de AC e AC-HDL (10 e 12,5 mM). Porém, mesmo nestas concentrações foi observada porcentagem de viabilidade celular maior que 50%. Por fim, a avaliação farmacológica apontou o AC-HDL como um sistema de liberação com atividades analgésica e anti-inflamatória mais pronunciadas do que as observadas para anti-inflamatórios não esteroídais como a indometacina ($p < 0,001$). Esses efeitos foram obtidos para teste de *tail-flick*, quando o AC foi intercalado em HDL aumentou a duração da analgesia (~ 1,7 vezes) quando comparado com o grupo de controle indometacina. Assim, os resultados indicam que o AC intercalado em nanopartículas inorgânicas de HDL apresentou uma taxa de liberação lenta e também induziu uma atividade analgésica - anti-inflamatória, possivelmente, por um mecanismo semelhante ao observado para um anti-inflamatório não esteroídais como a indometacina.

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used to avoid inflammation, but these compounds can evoke some side effects, considering these as an important limitation to the treatment. Currently, the plant-based therapy has been widely employed to develop new drugs which have analgesic and anti-inflammatory pharmacological activities. In this context, the use of inorganic nanoparticles is important to improve biopharmaceutical and pharmacological properties of the intercalated molecules. Thus, this study aimed to characterize the interaction between coumaric acid (CA), a phenolic compound extracted from plants, and layered double hydroxide (LDH), inorganic nanoparticles, considering parameters such as the *in vitro* release kinetics cytotoxicity and analgesic-antiinflammatory activities compared to the non-intercalated-CA. *In vitro* release tests were performed using a vertical diffusion cell (with cellulose acetate membrane, MWCO 1000 Da) and cell viability assessed in 3T3 cells by the neutral red (NR) uptake test. Pharmacological assays were carried in Swiss mice out in order to determine the number of writhings, tail-flick test, peritonitis test and formalin test for the free compound at three different concentrations (10, 20 or 30 mg/kg). *In vitro* release tests showed that the release constant (K_{rel}) value was significantly reduced when compared to the non-intercalated CA (K_{rel} values of $41.6 \pm 1.5 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$ and $32.4 \pm 1.5 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$ for the free CA and CA-HDL, respectively). Cell viability was reduced only at higher concentrations (10 and 12.5 mM) of CA and CA-HDL. However, even at these concentrations the percentage of cell viability was more than 50%. Finally, the pharmacological evaluation reveal the CA-HDL as a drug-release system with more pronounced analgesic-antiinflammatory effects than those observed for classic NSAIDs, such as indomethacin ($p < 0.001$). Those effects were obtained, specially, for tail-flick test, when the treatment with CA-LDH increased the duration of analgesia (~ 1.7 times), when compared with the control group (indomethacin). Thus, the results pointed out that the system CA-LDH showed a slow release rate and also induced *in vivo* analgesic-anti-inflammatory activities, possibly using similar mechanisms to that observed for classic non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as indomethacin.

I. INTRODUÇÃO

1. O PROCESSO INFLAMATÓRIO E SEUS MEDIADORES

A inflamação é um fenômeno fisiológico fundamental ao organismo, desencadeado em resposta a diversos fatores tais como: trauma mecânico, privação de oxigênio, nutrientes, alterações imunológicas, genéticas, agentes químicos, microorganismos, temperaturas extremas, radiação ultravioleta (GOLDSBY, 2003; MURPHY, 2010). Porém essa resposta fisiológica quando persistente pode estar associada ao desenvolvimento de patologias tais como reumatismo, artrites e artroses, arteriosclerose, doenças degenerativas ou até mesmo câncer (MURAKAMI E OHIGASHI, 2007). Estudos revelam que cerca de 1% da população mundial é acometida por doenças de origem inflamatória (WOOLF E PFLEGER, 2003; SMITH, 2005).

O processo inflamatório é caracterizado pelo calor, dor, rubor e inchaço, sendo esses fatores derivados dos efeitos de mediadores (Interleucina-1, prostaglandinas, quimiocinas) e células inflamatórias (macrófagos, leucócitos) diretamente sobre os vasos sanguíneos locais (GOLDSBY, 2003; MURPHY, 2010).

No entanto, a inflamação pode ser também desencadeada por outras vias como aquelas relacionadas à produção de quimiocinas (mediadores protéicos liberadas por células que participam do processo inflamatório presentes no sangue como macrófagos, eosinófilos e basófilos como histamina bradicinina), prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, assim como o NO que tem ação nos vasos sanguíneos, componentes do sistema complemento, fator de necrose tumoral (TNF), interferons (INF), metaloproteinases de matriz extracelular (MMP) e fator de agregação plaquetária (PAF) (GAUTAM E JACHAK, 2009). Todas essas moléculas acarretam inflamação e aumentam a permeabilidade vascular e a quimiotaxia (Figura 1).

1.1 VIA DA CICLOOXIGENASE

Os mediadores conhecidos como prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A_2 , também denominados eicosanóides, são derivados de fosfolípidios de membranas geram o ácido araquidônico como produto de sua degradação (RANG, 2003; BOTTING, 2006).

A fosfolipase A_2 (FLA_2), enzima que exerce catálise interfacial dependente de cálcio, pertence a uma grande família de esterases cuja função envolve a hidrólise de glicerofosfolípidios. A sua ativação é determinada por alguns moduladores como a trombina, bradicinina, sistema complemento C5a, reações antígeno-anticorpo e lesão celular (KINI E EVANS, 1995; RANG, 2003; OLIVEIRA, 2009). Esta fosfolipase é denominada A_2 , pois tem ação sobre a posição Sn-2 do glicerofosfolípidios liberando moléculas de acil fosfolípidios e de ácidos graxos livres.

A família A_2 contém mais de quinze subgrupos, sendo o subgrupo V relacionado às enzimas presentes em células inflamatórias e células cardíacas humanas (OLIVEIRA, 2009).

Com a aproximação da fosfolipase A_2 nas membranas celulares há uma alteração na conformação da mesma. Com isso a enzima torna-se ativa e captura um fosfolípidio presente na membrana, direcionando-o para seu sítio ativo formando o complexo enzima substrato. Ocorre, assim, a clivagem da ligação éster na posição Sn-2 do glicofosfolípidio liberando o ácido araquidônico (OLIVEIRA, 2009), conforme ilustra a figura 2.

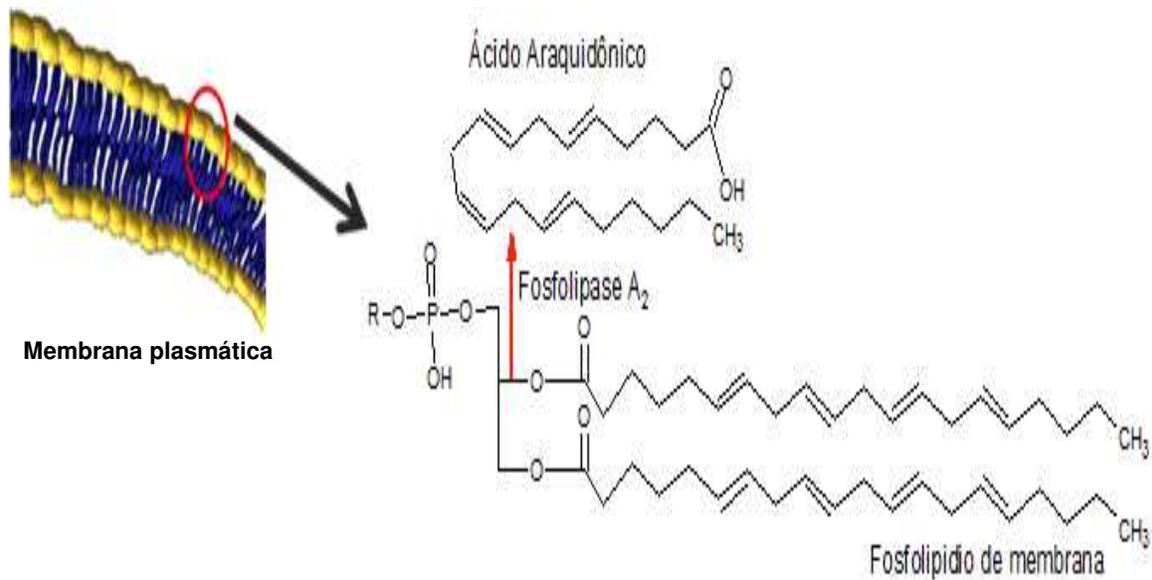


Figura 2: Liberação de ácido araquidônico a partir de moléculas de fosfolípidios de membrana. Ação da fosfolipase A₂ na clivagem da ligação éster na posição Sn2 do fosfolípido de membrana (glicofosfolípido) e liberação do ácido araquidônico.

O ácido araquidônico liberado dará origem a alguns mediadores inflamatórios, que podem seguir duas vias: a da ciclooxigenases (COX) ou a das lipooxigenases (LOX). Ambas as vias levam à síntese de mediadores importantes no processo inflamatório. Na via da ciclooxigenase o ácido araquidônico sofre uma ciclooxigenação com a inserção de dois O₂ em sua molécula, tornando-se, assim, prostaglandina G₂ (PGG₂). Posteriormente, a própria COX cataliza a reação de peroxidação com a retirada de um O, convertendo, assim, o PGG₂ em prostaglandina H₂ (PGH₂) quimicamente instável. Por esta instabilidade a PGH₂ sofre alterações moleculares dando origem as demais prostaglandinas (PGD₂; PGE₂; PGF₂; PGI₂) e do tromboxano A₂ (TXA₂) (LEHNINGER, 2006; NAGAI, 2008), como pode ser visto na figura 3.

posteriormente com atividade de peroxidase com a saída de uma molécula de oxigênio formando a prostaglandina H_2 (PGH_2) (Kummer e Coelho, 2002).

Atualmente, são conhecidas diversas isoformas da COX que foram isoladas de diferentes órgãos humanos sendo elas: COX-1; COX-1a; COX-1b, COX-2 e COX-3. As isoformas COX-1 e COX-2 têm a sua estrutura bem definida na literatura e apresentam uma diferença crucial que reside no aminoácido da posição 523, onde a COX-1 apresenta uma isoleucina e a COX-2 uma valina, um aminoácido de menor tamanho molecular, formando, assim, uma lacuna que permite o acesso a uma “bolsa lateral” presente no sítio ativo (WILLOUGHBY, 2000; CHANDRASEKHARAN, 2002; BOTTING, 2006; RANG, 2003).

Autores divergem em relação a constitutividade dessas isoformas existindo diferentes linhas de estudo. A primeira, mais comum e encontrada em livros, defende a presença constitutiva da COX-1 (considerada uma enzima *housekeeping*) em todas as células, liberando as prostaglandinas para ações fisiológicas e mantendo a homeostasia do organismo. Já a COX-2, seria sintetizada em maior concentração em relação a COX-1, somente frente à liberação de mediadores inflamatórios como lipossacarídeos (LPS), interleucinas ($IL-1\alpha$ e 1β) e fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) e apresenta-se mais expressa em alguns órgãos como cérebro, coração e rins. A COX-3, por sua vez, isolada de córtex cerebral, está relacionada com dor e febre (STITES, 2000; CALICH E VAZ, 2001; CHANDRASEKHARAN, 2002; RANG, 2003; BOTTING, 2006; KING, 2007; NAGAI, 2008).

Tabela 1: Efeito fisiológico das prostaglandinas. Diferentes tipos de prostaglandinas e suas ações sistêmicas.

	PGD ₂	PGF _{2α}	PGI ₂	PGE ₂		
				EP ₁	EP ₂	EP ₃
Vasodilatação	X		X		X	
Inibição da agregação plaquetária	X		X			
Relaxamento da musculatura gastrointestinal	X				X	
Relaxamento uterino	X					
Modificação na liberação dos hormônios hipotalâmicos e hipofisários	X					
Contração do miométrio		X				
Liberação de renina e natriurese			X			
Broncoconstrição				X		
Contração da musculatura gastrointestinal				X		X
Broncodilatação					X	
Liberação da secreção de líquido intestinal					X	
Inibição da secreção de ácido gástrico						X
Aumento da secreção protetora da mucosa gástrica						X
Inibição da lipólise						X
Inibição da liberação de neurotransmissores autônomos						X
Estimulação da contração do útero grávido						X

O grupo de Zidar (2009) demonstraram através de testes de imunohistologia *western blotting* e PCR em tempo real, utilizando amostras de tecidos obtidas por autópsia (mortes acidentais) e biópsia de homens e mulheres, de todos os órgãos e suas diferentes células. Esse estudo demonstra que a constitutividade ou não de ambas as isoformas de COX é mais complexa do que se acredita e que ambas isoformas estão presentes em condições fisiológicas, a fim de manter a homeostasia do organismo em condições patológicas diversas. Além desses

autores, outros já haviam realizados trabalhos apresentando a presença da COX-1 e da COX-2 em condições fisiológicas, mas em órgãos isolados (YASOJIMA,1999; SAKURAI, 2005; HARRIS E BREYER, 2006; ZIDAR, 2007).

As prostaglandinas sintetizadas exercem um importante papel na inflamação, as PGI₂, PGD₂ e PGE₂ apresentam ações vasodilatadoras; as PGI₂ e PGD₂ também inibem a agregação plaquetária; PGI₂, PGF₂ e PGE₂ são hiperalgênicas; a PGF₂ é a única que apresenta ação broncoconstritora e aumenta a contração do miométrio. O tromboxano A₂ (TXA₂) é produzido principalmente nas plaquetas e tem ação trombótica e vasoconstritora (RANG, 2003; CAVALCANTI, 2004; KING, 2007).

O ácido araquidônico é substrato de outra enzima, a lipooxigenase que apresenta três isoformas, a 15-lipoxigenase, a 12-lipoxigenase e a 5-lipoxigenase. Todos os seus produtos estão envolvidos em processos inflamatórios, o LTB₄ e o 12-HETE apresentam ações de quimiotaxia, enquanto o LTC₄, o LTD₄ e o LTE₄ têm ações broncoconstritora e aumentam a permeabilidade vascular (RANG, 2003).

2. DOR DE ORIGEM INFLAMATÓRIA

Todo processo inflamatório é muito incômodo para o paciente, pois esse vem acompanhado de diversos sintomas, dentre eles a dor, que foi conceituada em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência emocional com sensação desagradável, associada à lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal (CAVALCANTI, 2004).

Quando a dor torna-se um sintoma do processo inflamatório, essa pode alcançar o extremo e chegar a impedir o paciente de realizar suas tarefas cotidianas – nos casos mais graves. Porém, como envolve também fatores psicológicos, torna-se difícil classificá-la. Por isso, atualmente algumas terminologias são utilizadas para denominar diferentes fases do processo doloroso, sendo assim, a resposta fisiológica a um estímulo agressivo é denominada nocicepção uma vez que envolve neurotransmissores (nociceptores)

e mediadores da inflamação sendo possível de ser avaliada de maneira direta (DUNDER, 2009).

A figura 4, mostra os diversos fatores que envolvem a dor, além da resposta nociceptiva, mostrando que a dor é a soma das respostas externas (comportamento doloroso e sofrimento) e da nocicepção, resposta fisiopatológica do organismo.

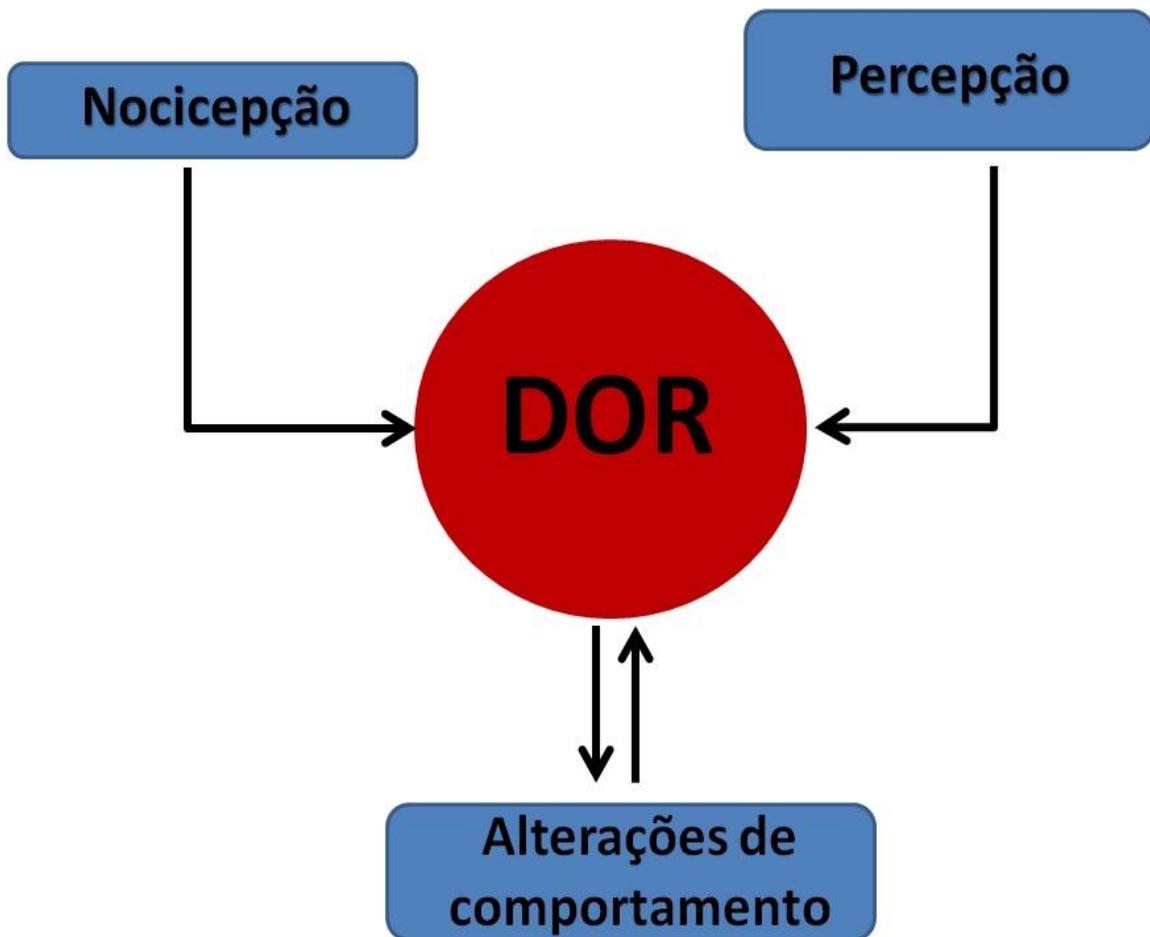


Figura 4: Esquema das diferentes fases que envolvem o processo doloroso. A nocicepção leva a dor a intensidade da dor vai variar conforme a percepção individual que pode levar a uma alteração comportamental. A alteração comportamental também pode levar a aumentar a percepção da dor.

A nociceção consiste, na detecção de lesão tecidual por transdutores especializados ligados às fibras dos nervos periféricos do tipo A δ e C, essa via de ação constitui a via periférica. A detecção do estímulo doloroso é realizada por nociceptores presentes nos tecidos superficiais da pele, mucosas e vísceras que, quando ativados ou sensibilizados, terão como resposta a dor, sendo essa resposta denominada de periférica (CAVALCANTI, 2004).

A modulação periférica da resposta nociceptiva é desencadeada pelo processo inflamatório gerado por uma lesão. Os mediadores inflamatórios liberados são responsáveis pela hiperalgesia (diminuição do limiar de ação dos nociceptores), as PGE₂, PGF₂ e PGI₂ potencializam o efeito da bradicinina (BK) e da serotonina (5-HT) (agentes nociceptivos) aumentando, assim, a sensibilidade dos receptores nociceptivos. Como consequência, haverá a sensibilização das fibras C aferentes, sendo essas ativadas por duas vias, a primeira com a função de inibição dos canais de potássio e a segunda com a função de facilitar a ação dos agentes nociceptivos em canais de cátions, sendo esses eventos os responsáveis pela excitação dos neurônios de transmissão que causam a dor (RANG, 2003; CAVALCANTI, 2004).

A inflamação está também relacionada a outros mecanismos como estimulação de nociceptores silentes, presentes em fibras aferentes não mielinizadas, que não são sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos intensos, bem como ao aumento do número de receptores opióides, evidenciados por experimentos e observações clínicas onde demonstram uma maior eficiência de fármacos opióides quando há um processo inflamatório (STEIN, 1989; 1990), a definição dos processos envolvidos para este ocorrido ainda não foram bem elucidados, mas existem duas hipóteses sendo estas a estimulação da síntese de novos receptores e transporte axonal destes para a periferia (CAVALCANTI, 2004), além da lesão ou inflamação levar a uma alteração na membrana perineural e aumentar a exposição dos receptores opióides na fibra nervosa sensitiva (OLSSON, 1990).

Os receptores opióides de diferentes tipos (μ , δ , κ , σ , ϵ e ORL) apresentam seus efeitos fisiológicos estimulados pela morfina, um

analgésico opióide clássico e referência clínica para esse grupo de fármacos. A morfina estimula os receptores opióides, sendo antagonizada pela naloxona (RANG, 2003; CAVALCANTI, 2004).

A analgesia desencadeada pelos opióides tem início imediato após a sua administração e geralmente tem um efeito mais prolongado do que o obtido com a administração de AINEs, mas essa classe de fármacos levam a outros efeitos como sedação, euforia, constrição pupilar, motilidade gastro intestinal reduzida, depressão respiratória e dependência química (RANG, 2003; CAVALCANTI, 2004).

Outro sistema relacionado com analgesia envolve os receptores de adenosina (A_1 e A_2). Quando há estimulação dos receptores A_1 há uma estimulação de efeitos antinociceptivos. Moléculas que exercem ação sobre esses receptores, além da adenosina, desencadeiam um efeito analgésico. Em contrapartida, quando há estimulação de receptores A_2 , uma resposta pró-nociceptiva é desencadeada, mediada por AMPc independente de mediadores da inflamação (RANG,2003; LIMA,2008).

Para a averiguação da estimulação desta via são utilizados antagonistas dos receptores A_1 , como a cafeína (LIMA 2008; DE MIRANDA 2001).

3. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROÍDAIS (AINEs)

Atualmente, a terapia farmacológica mais utilizada para o tratamento da inflamação, e dos sinais clínicos a ela relacionados, consiste na administração de uma classe de compostos químicos denominados anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). O mecanismo de ação dos AINEs consiste na inibição da COX, podendo ser classificados em: i) não seletivos para COX-1 e 2, ii) seletivos para COX-1, iii) seletivos para COX-2 e iv) altamente seletivos para COX-2 (VANE, 1998; WILLOUGHBY, 2000; RANG, 2003).

De acordo com a estrutura química do fármaco, os AINEs apresentam a capacidade de se alojarem no interior da cavidade da COX impedindo a interação do ácido araquidônico com o sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, evitando a síntese de PGG₂, das outras prostanglandinas e tromboxanos (Figura 5).

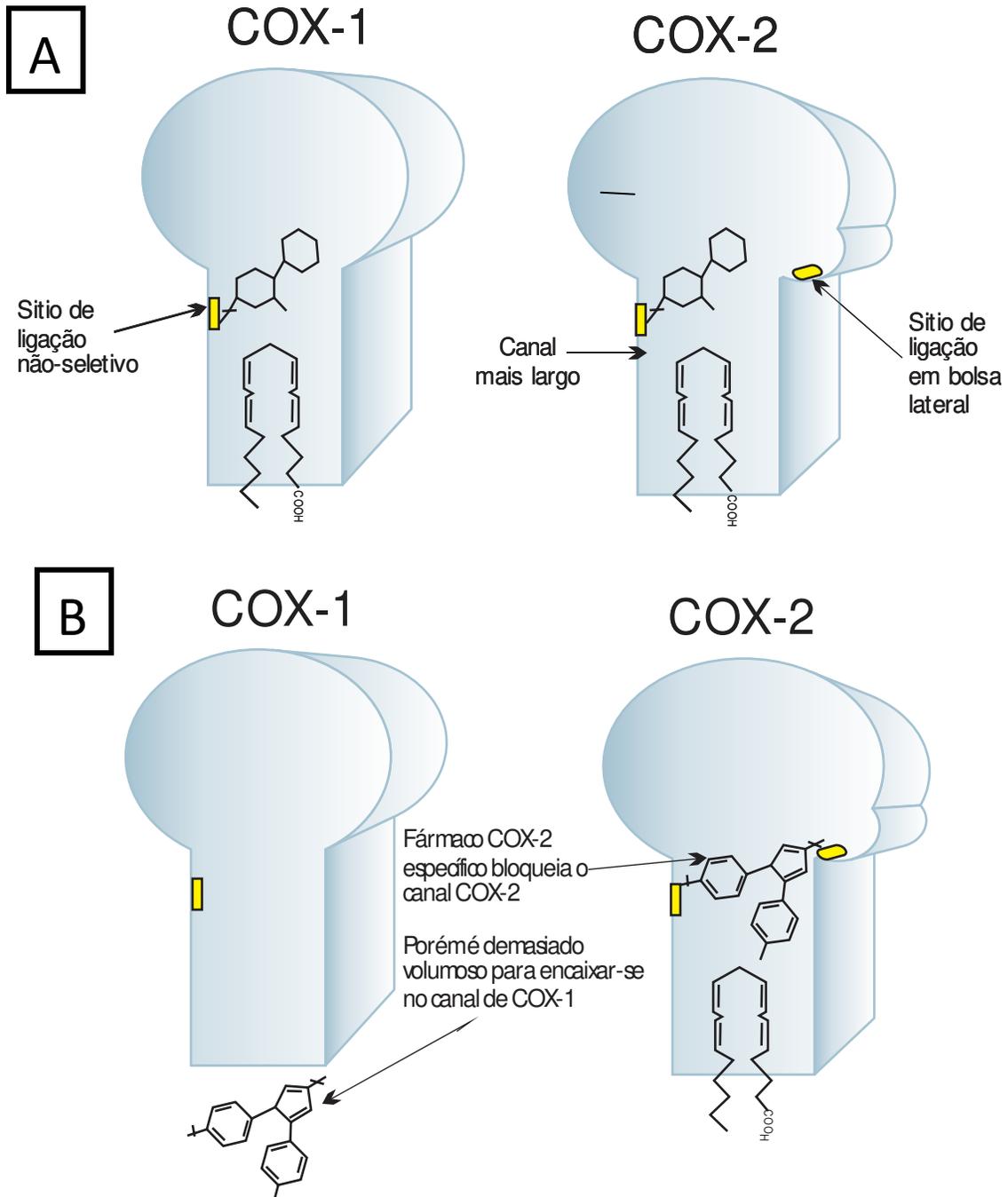


Figura 5: Ilustração da inibição da COX por AINEs. Sendo A- COX-1 e COX-2 inibidas por AINEs não seletivos e B- Inibição seletiva da COX-2 por AINEs seletivos. Adaptado de Rang (2003).

O desenvolvimento de diferentes compostos e a utilização de sistemas de liberação controlados de fármacos para o combate à dor vêm sendo ampliado com o intuito de diminuir os efeitos colaterais tais como problemas gástricos podendo se agravar à úlceras e resultantes da classe de AINEs seletivos e não seletivo da COX-1 e problemas pró-trombóticos que podem levar a problemas cardiovasculares decorrente da inibição seletiva da COX-2 decorrentes do uso contínuo desses medicamentos (BARBATO, 1997; ALMASIRAD, 2005; GORDIJO, 2005; BOTTING, 2006; MCCULLOCH, 2006; KING, 2007; ALAFEEFY, 2008; AY, 2009; GAUTAM E JACHAK, 2009).

4. PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

Os fármacos à base de plantas eram inicialmente dispensados na forma bruta tais como: tinturas, chás, pós e outras formulações herbais. Hoje essa apresentação farmacêutica é denominada fitoterápico (GAUTAM E JACHAK, 2009).

Cerca de 15 % do capital da indústria farmacêutica mundial é proveniente da venda de fitoterápicos (dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)), onde em países desenvolvidos e em desenvolvimento, 65 - 80% da população utiliza fitoterápicos como uma das fontes básicas de saúde. No Brasil, esse mercado gera em torno de U\$ 100 milhões por ano, a evolução deste mercado esta atraindo cada vez mais investidores (BRESOLIN, 2010).

Um fitoterápico não apresenta seus compostos bioativos isolados como no caso dos medicamentos Giamebil[®] (a base de *Mentha crisper* L., que está no mercado desde 1991), que foi desenvolvido pela Hebron em parceria com a Universidade Federal de Pernambuco, e o Acheflan[®], medicamento desenvolvido pela indústria Aché, tendo como base o óleo essencial de *Cordia Verbenacea* (BRESOLIN, 2010).

Para uma ação mais específica os compostos bioativos provenientes de plantas medicinais são isolados, caracterizados, incorporados aos veículos farmacêuticos e, então, comercializados. Segundo Newman e Cragg (2012) os

compostos bioativos vêm sendo amplamente estudados e são a base de cerca de 60% de novas moléculas descobertas no período de 01/1981 à 2010. A utilização popular de certas plantas é um indício para a pesquisa de novos compostos bioativos. Um exemplo disso é a descoberta da Aspirina[®], que foi baseada no conhecimento da ação analgésica e antipirética do salgueiro pelos Gregos e Romanos há 400 anos a.C. Em 1899, o ácido acetil salicílico (Aspirina[®]) foi introduzido no mercado como o primeiro fármaco potente para o tratamento de doenças reumáticas (VANE, 1971).

O artigo de revisão publicado por Gautam e Jachak (2009) revela a grande variedade de grupos de moléculas isoladas de plantas com atividades anti-inflamatórias, sendo descritas 212 moléculas das classes dos alcalóides, ácidos graxos, esteróides, terpenos e quinonas, entre outros.

Em vista do exposto, neste trabalho serão abordados aspectos biofarmacêuticos e farmacológicos de outra importante classe de bioativos, conhecidos como compostos fenólicos.

4.1. OS COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA VARIABILIDADE ESTRUTURAL

As moléculas que apresentam pelo menos um anel aromático como demonstrado na figura 6 ligado a uma hidroxila, são denominados compostos fenólicos (SIMÕES, 2007; OLIVEIRA, 2009).

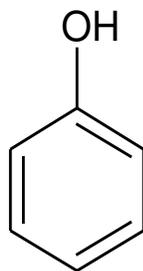


Figura 6: Estrutura básica de um fenol.

Para a indústria, estes compostos têm grande importância para a obtenção de diversos produtos como pesticidas, explosivos, papel, tecidos, tinturas e

fármacos (MAHUGO SANTANA, 2009). Modificações químicas, estruturais como alterações em seus substituintes e síntese de polímeros a partir de unidades de fenóis, apresentam atividades farmacológicas, anticarcinogênicas e antitrombóticas (NEUDÖRFFER, 2004; CHEN, 2010; DE, 2010).

Nas plantas, o metabolismo secundário originará os diversos compostos fenólicos com ampla variedade estrutural. Estes apresentam uma variedade de funções, entre elas, inibição da oxidação lipídica, proteção da proliferação de fungos, participação em processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma das plantas (ANGELO E JORGE, 2007; SIMÕES, 2007).

As formas mais comuns dos compostos fenólicos de plantas são: flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Podemos verificar a estrutura de cada classe destes fenóis na tabela 2, dentro de cada classe há uma vasta variação nas cadeias laterais, podendo ser compostas por hidroxilas, metilas, ácido carboxílicos, entre outras estruturas.

Tabela 2: Estrutura básica para as classes de compostos fenólicos de planta (Angelo e Jorge, 2007).

Classe	Estrutura
Fenólicos simples benzoquinonas	C_6
Ácidos Hidroxibenzoícos	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenil acéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, Fenilpropanoídes	$C_6 - C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estibenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoídes, isoflavonoídes	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoídes	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Os compostos fenólicos são conhecidos como agentes antioxidantes. Estudos realizados com flavonóides demonstram *in vitro e in vivo* ações anticancerígenas (CAMARGO, 2011; 2012). Além desses estudos, outros trabalhos foram realizados com diferentes tipos de compostos fenólicos visando uma nova forma farmacêutica de combate ao câncer, às doenças cardiovasculares e aos processos inflamatórios (SOARES, 2002; GAUTAM E JACHAK, 2009; CHEN, 2010).

Dentre as classes de compostos fenólicos, as que estão mais relacionadas à inibição de processos inflamatórios são: os flavonóides, biflavonóides, ácidos hidroxibenzoícos, ácidos hidroxicinâmicos e ligninas (GAUTAM E JACHAK, 2009).

4.1.1. ÁCIDO P- COUMÁRICO: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

O ácido p-coumárico é um composto fenólico, encontrado nas frutas, legumes e grãos, resultante do metabolismo vegetal (ANDREASEN, 2001; MANACH, 2004; GARRAIT, 2006). Todos os tecidos e células vegetais podem realizar esse metabolismo de acordo com fatores ambientais, ecológicos ou do estágio de crescimento da planta, podendo aumentar a ativação destas vias metabólicas. Esses mecanismos ainda não estão completamente elucidados (SIMÕES, 2007).

A glicose como fonte da maioria dos metabólitos vegetais dará origem ao ácido p-coumárico. Primeiramente, essa será degradada em acetil-CoA e ácido chiquímico, que então originará os aminoácidos fenilalanina e tirosina. A tirosina será convertida no ácido p-coumárico, o aminoácido fenilalanina é convertido primeiramente em ácido cinâmico e posteriormente em ácido coumárico. Estes últimos darão origem aos fenilpropanóides: propenilbenzenos, alilbenzenos, aldeídos aromáticos e coumarinas (SIMÕES, 2007), essa via metabólica está ilustrada na figura 7.

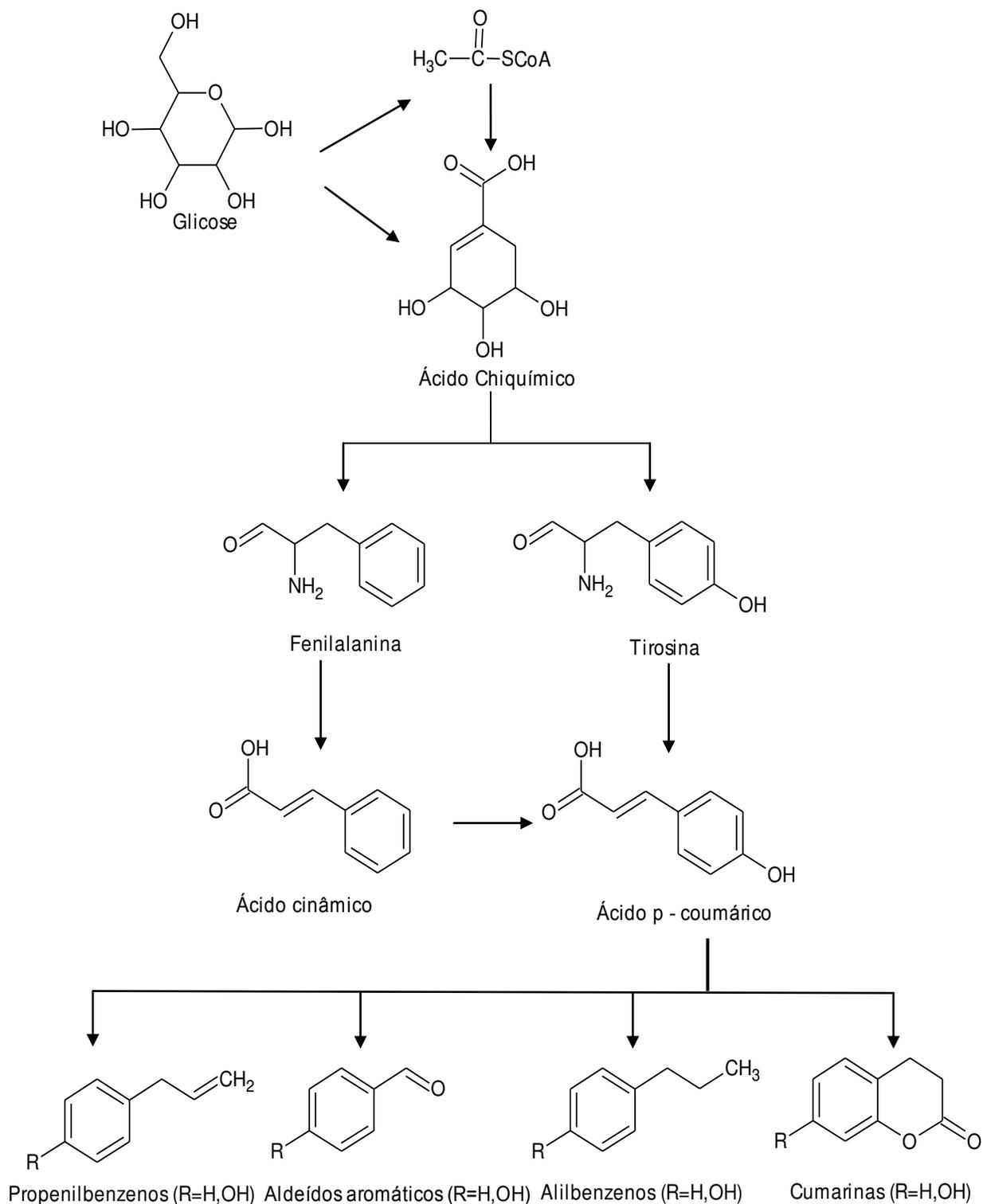


Figura 7: Via de síntese de ácido p-coumárico a partir da glicose e seus compostos derivados. A síntese de ácido p-coumarico pode ser feita de forma direta a partir do aminoácido tirosina e de forma indireta do aminoácido fenilalanina.

O efeito biológico do ácido p-coumárico está relacionado à absorção (independentemente de ser proveniente de alimentos vegetais ou da molécula isolada) deste composto com posterior disponibilidade para as células alvo. Essa absorção é realizada no intestino através de um cotransportador de H⁺ denominado de transportador de ácido monocarboxílico (MCT), que realiza o transporte de compostos monocarboxílicos com a entrada de H⁺ na proporção estequiométrica de 1:1 (KONISHI, 2003; GARRAIT, 2006; KOBAYASHI E KONISHI, 2008; HALESTRAP, 2012).

As células-alvo também apresentam os transportadores MCT, facilitando, assim, a entrada do ácido p-coumárico. Essa classe de transportadores apresenta mais de catorze isoformas, sendo que apenas quatro isoformas estão bem caracterizadas (HALESTRAP E MEREDITH, 2004; WATANABE, 2006).

Garrait e colaboradores (2006), realizaram experimentos, verificaram os sítios de absorção do ácido p-coumárico em todo o sistema gastrointestinal no estômago e no intestino em seus seguintes segmentos: duodeno, jejuno, ílio, ceco e cólon de ratos e observaram também a excreção urinária deste composto, após a administração oral em ratos. Além disso, esses autores compararam a absorção e a excreção do ácido p-coumárico com o ácido trans-cinâmico (também um composto fenólico derivado do metabolismo secundário de plantas), demonstrando que o local de menor absorção para ambos os compostos foi o estômago. No intestino a absorção maior foi para o ácido trans-cinâmico, no entanto, a excreção de ácido coumárico foi 77 vezes menor que o ácido trans-cinâmico, sugerindo uma menor metabolização do ácido coumárico e sugerindo uma maior eficácia farmacológica.

Quanto às atividades farmacológicas, a ação antioxidante atribuída ao ácido p-coumárico tem sido estudada com a finalidade de diminuir a ocorrência de radicais livres e o estresse oxidativo celular, que gera dano no DNA e pode levar ao surgimento de câncer (HUDSON, 2000; GUGLIELMI, 2003; LUCERI, 2004; JANICKE, 2005; GAO E HU, 2010; JANICKE, 2011).

Inicialmente, Guglielmi e colaboradores (2003) demonstraram a proteção do ácido p-coumárico em células CaCO-2 de intestino além de avaliar o RNAm das

enzimas glutatônicas uma classe de enzimas responsáveis por controlar o estresse oxidativo das células. Em outro estudo, Janicke e colaboradores (2011) comprovaram a interferência do ácido p-coumárico no ciclo celular de células CaCO-2 (fase G₂/M) e outros sete sistemas de regulação celular, confirmando o estudo de 2005, destes mesmos autores, no qual foi avaliada a resposta metabólica através da constatação do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons pelo teste de Alamar Blue e MTT frente a diferentes concentrações de ácido p-coumárico durante três dias.

Devido ao seu poder antioxidante e sua estrutura química, diversos autores vêm estudando a ação farmacológica do ácido coumárico frente a diferentes atividades como: aumento do hormônio estradiol em ratas sem os ovários (YAMAGUCHI, 2008; FOLWARCZNA, 2009; ZYCH, 2009); ação antiangiogênica (ANTHONY, 2011); neuroproteção (VAUZOUR, 2010); atividade antiviral (SCHNITZLER, 2010); proteção ocular em coelhos (LODOVICI, 2009); ação antiplaquetária (LUCERI, 2007) e redução de pigmentação da pele (AN, 2008; 2010; SEO, 2011; SONG, 2011).

Por outro lado, estudos relacionados à atividade anti-inflamatória mostram ações do ácido p-coumárico, em ratos tratados por catorze dias (dose de 50 mg/kg), em modelos de colite, com redução da oxidação do DNA e uma supressão na atividade da COX-2 (LUCERI, 2003). Esse efeito anti-inflamatório é, também, comumente observado para compostos fenólicos de uma forma geral (WANG, 2006; PARVEEN, 2007; MADA, 2009; MAPHOSA, 2009; SHI, 2009).

5. NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS DE HIDRÓXIDO DUPLOS LAMELARES (HDL) COMO SISTEMAS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.

Atualmente, são desenvolvidos inúmeros tipos de carreadores com a finalidade de melhorar algumas propriedades de inúmeras moléculas, esses sistemas podem ser orgânicos ou inorgânicos e tem aplicação em diversas áreas,

dentre elas a têxtil, alimentícia e farmacêutica (SANVICENS E MARCO, 2008; CUNHA, 2010).

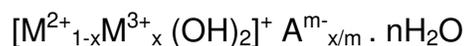
Na área farmacêutica, esses carreadores podem promover a liberação controlada do fármaco, melhorando suas propriedades farmacológicas e diminuindo seus efeitos adversos. Além dessa vantagem, um sistema carreador pode aumentar a estabilidade do fármaco diminuindo sua degradação natural (CEREDA, 2006; BONINA, 2008; GUHAGARKAR, 2009; CUNHA, 2010; de ARAUJO, 2010).

O benefício terapêutico dos vários fármacos administrados na forma tradicional é, algumas vezes, limitado pelas propriedades físico-químicas (solubilidade) e toxicológicas dos mesmos ou até por barreiras fisiológicas. Através do desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos e de novas formulações de liberação modificada é possível manipular algumas dessas propriedades além de melhorar os efeitos terapêuticos, favorecendo a utilização clínica (BREWSTER, 2007; LOFTSSON E DUCHÊNE, 2007).

Com esse intuito, vários tipos de carreadores têm sido estudados, caracterizando um número cada vez maior de novas estratégias para a liberação modificada de fármacos. Entre essas alternativas, pode-se citar desde a encapsulação de fármacos em micros esferas e nanopartículas lipídicas sólidas, a disposição de bioativos em microemulsões e micelas poliméricas, até a complexação com ciclodextrinas (naturais, sintéticas e seus derivados poliméricos) e calixarenos. A caracterização das propriedades biológicas e biofarmacêuticas de sistemas carreadores inorgânicos, como os hidróxidos duplos lamelares (HDL) vêm sendo bastante estudadas (AGUZZI, 2007; VISERAS, 2010).

Os HDL, utilizados como antiácidos pela empresa Bayer desde 1970 com o nome Talcid[®], vêm sendo empregados, mais recentemente, como catalisadores, biosensores, novos cosméticos, liberação controlada de princípios ativos tanto por via oral quanto tópica (LI, 2010a).

O termo hidróxidos duplos lamelares refere-se à presença de dois cátions metálicos nas lamelas destes compostos, que contêm ânions carbonato intercalados entre lamelas de hidróxidos duplos, sendo a fórmula geral dos HDLs descrita como:



onde M^{2+} representa um cátion bivalente, M^{3+} representa um cátion trivalente e A^{m-} representa o ânion intercalado com carga m^- . Os cátions podem ser combinados conforme a característica do material intercalado, gerando assim uma variedade de HDLs (TRONTO, 2006; CUNHA, 2010).

A estrutura dos HDLs pode ser comparada à da brucita $Mg(OH)_2$, onde os cátions magnésio estão localizados no centro de octaedros, que possuem em seus vértices ânions hidroxilas. Tais estruturas compartilham suas arestas formando camadas planas e neutras, que são mantidas juntas por ligações de hidrogênio. Quando, nesse tipo de estrutura, cátions bivalentes são isomorficamente substituídos por cátions trivalentes, a lamela passa a apresentar uma carga residual positiva.

Para que o sistema adquira a eletroneutralidade, é necessária a presença de ânions entre as lamelas, que juntamente com moléculas de água promovem o empilhamento das camadas do hidróxido duplo com um domínio interlamelar pouco ordenado. Neste caso, as lamelas são mantidas juntas não apenas por ligações de hidrogênio, como no caso da brucita, mas pela atração eletrostática entre as lamelas positivas carregadas e os ânions interlamelares (TRONTO, 2006; CUNHA, 2010).

Os HDLs têm apresentado uma vasta aplicação como carreadores de fármacos. Trabalhos com a liberação de antiinflamatórios como ibuprofeno e indometacina mostram as interações HDL-fármacos, descritas minuciosamente, referindo desde diferentes métodos de preparação até as mais diversas técnicas de caracterização (DEL ARCO, 2004A; GORDIJO, 2005; DEL ARCO, 2007; DEL ARCO, 2008; AY, 2009; DEL ARCO, 2009) (Figura 8).

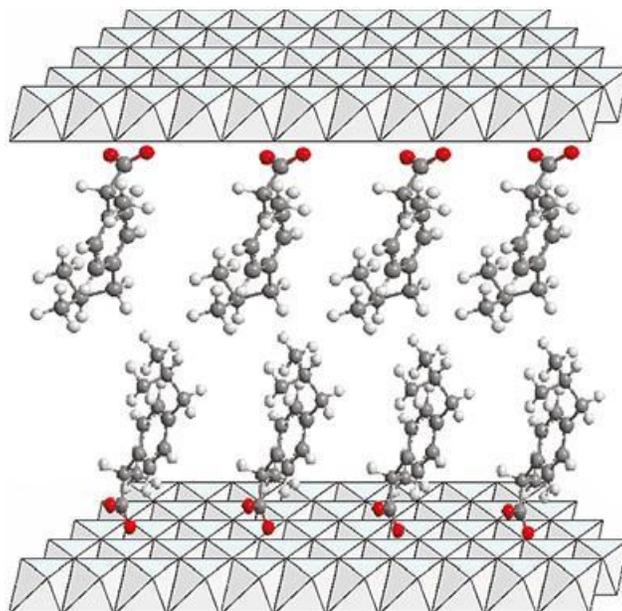


Figura 8: Sugestão de arranjo entre HDL e ibuprofeno, sugerido que a matéria a ser inserida no HDL encontra-se no lugar do ânion. Figura retirada de Ay (2009).

A composição dos HDLs mais utilizada como sistema carreador de fármacos, é composta pelos cátions magnésio e alumínio. Outras combinações como lítio e alumínio (KHAN, 2001) e zinco e alumínio (bin HUSSEIN E LONG, 2004; LI, 2006) também são empregadas.

Para o tratamento da dor inflamatória foram descritos alguns AINEs intercalados em diferentes composições de HDL como: ibuprofeno (GORDIJO, 2005), diclofenaco (BONINA, 2008), fenbufeno (LI, 2004), ácido salicílico (del ARCO, 2004a), ácido mefenâmico (del ARCO, 2007) e celecoxibe (AMBROGI, 2003). Esses trabalhos apresentam a caracterização físico-química (calorimetria, difração de raios-X e espectroscopia no infra-vermelho) da intercalação destes compostos mostrando como estão inseridas entre as lamelas dos hidróxidos que compõem essas nanopartículas.

Outras classes de fármacos também já foram intercaladas, sendo descritos antibióticos, ampicilina e gramicidina (TAMMARO, 2007), antiparkinsonianos como

levodopa (WEI, 2008); antihipertensivos como enalapril e captopril (XIA, 2008), hipolipemiantes pravastatina (CUNHA, 2012) bem como princípios ativos extraídos de plantas (curcumina) utilizados como antineoplásicos (NI, 2008).

Além das propriedades físico-químicas e a possibilidade de desenvolver novos carreadores inorgânicos (AMBROGI, 2003), outras características têm direcionado o uso de HDL como sistemas de liberação de fármacos: o baixo potencial imunogênico e a reduzida citotoxicidade (tanto em culturas de linhagens celulares humanas quanto em eritrócitos) além da relativa inocuidade *in vivo* (avaliada pela determinação da mortalidade e da perda de peso em animais de laboratório tratados com diferentes doses de HDL) (del ARCO, 2004; LI, 2010).

A utilização de nanopartículas inorgânicas como carreadores de fármacos visa melhorar tanto as propriedades biofarmacêuticas (estabilidade, solubilidade, administração *in vivo*) quanto as farmacológicas dos compostos intercalados. Aliada a esses fatores, a utilização de novos princípios ativos que sejam de fácil obtenção e diminuam os efeitos adversos inerentes às classes de fármacos mais comumente utilizadas são de grande interesse para a comunidade científica e para a população (CUNHA, 2010; XU, 2006; SANVICENS, 2008).

Recentemente, têm sido descritos alguns estudos com compostos fenólicos dispostos em sistemas carreadores para liberação modificada. Os trabalhos relatam desde a utilização de quercetina encapsulada em nanopartículas poliméricas no combate ao estresse oxidativo cerebral (DAS, 2008), microemulsões tópicas contendo hesperetina (TSAI, 2010), nanopartículas lipídicas contendo quercetina, miricetina e genisteína (LEONARDUZZI, 2010) e nanopartículas poliméricas contendo silimarina (GUHAGARKAR, 2009). No entanto, para sistemas carreadores inorgânicos há referência apenas às descrições estruturais da imobilização de antocianinas em óxidos lamelares contendo nióbio (TEIXEIRA-NETO, 2009). Dessa forma, dada a vasta aplicação farmacológica do ácido p-coumárico, torna-se interessante o desenvolvimento, a avaliação da biocompatibilidade e da atividade anti-inflamatória deste intercalado

em hidróxidos duplos lamelares como novo sistema carreador inorgânico para liberação modificada de bioativos de origem natural.

Nesse contexto, o estudo das propriedades antiinflamatórias do ácido coumárico associado ao desenvolvimento de sistemas para liberação modificada apresenta-se como uma alternativa para ampliar a aplicação terapêutica de novos princípios ativos e/ou formulações farmacêutica no tratamento da dor de origem inflamatória.

II. OBJETIVOS

Diversos estudos físico-químicos têm sido realizados para caracterizar a interação das nanopartículas inorgânicas com diferentes princípios ativos. No entanto, há poucos relatos sobre as atividades *in vivo* destes híbridos, especialmente tratando-se da intercalação de produtos naturais. Em decorrência disso, o presente estudo tem por objetivo geral avaliar as propriedades biofarmacêuticas, a citotoxicidade e a atividade antiinflamatória do ácido coumárico intercalado em hidróxidos duplos lamelares propondo-o como novo sistema para liberação modificada para no tratamento da dor de origem inflamatória.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de liberação do ácido coumárico a partir das nanopartículas inorgânicas, utilizando um modelo de difusão *in vitro*, simulando a administração oral e comparando-o com o fármaco em solução;
- Realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* para avaliar os efeitos diretos do carreador, do ácido coumárico livre ou das, nanopartículas inorgânicas ácido coumárico-HDL em cultura de células.
- Realizar ensaios *in vivo* para avaliar diferentes mecanismos envolvidos na atividade antiinflamatória do ácido coumárico intercalado em nanopartículas inorgânicas de HDL.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. FÁRMACOS E REAGENTES

- Ácido coumárido (Sigma Aldrich Ltda.)
- Hidróxido de Zinco (Sigma Aldrich Ltda.)
- Hidróxido de Alumínio (Sigma Aldrich Ltda.) Indometacina(Sigma Aldrich Ltda.)
- Cafeína (Sigma Aldrich Ltda.)
- Naloxona (Sigma Aldrich Ltda.)
- Penicilina (Nutricell)
- Vermelho Neutro (Sigma Aldrich Ltda.)
- Soluções:
 - NaCl 0,9%,
 - Flúido intestinal (fosfato de potássio monobásico e hidróxido de sódio) pH 7,5 com 30% de propilenoglicol,
 - Carragenina 1% em solução salina estéril,
 - Solução de formaldeído 1%
 - Líquido de Turk (violeta de gensiana e ácido acético 2%)
 - Meio de cultura Meio Dulbecco Mem- DMEN (Nutricell).
- Membrana sintética de 1000 daltons (Spectra/Pro®)

2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS $Zn^{2+}/Al^{3+}/Cl^{-}$ -HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

A síntese dos $Zn^{2+}/Al^{3+}/Cl^{-}$ - hidróxidos duplos lamelares foi realizada por coprecipitação utilizando Zn^{2+} , Al^{3+} e Cl^{-} em solução aquosa, de acordo com o método descrito por Constantino e Pinnavaia (1994) e Barbosa (2005). A caracterização dos $Zn^{2+}/Al^{3+}/Cl^{-}$ -hidróxidos duplos lamelares foi realizada utilizando técnicas como espectroscopia no infravermelho, difração de raios-X de baixo ângulo, análises termogravimétricas e calorimétricas, além de microscopia eletrônica de varredura.

A síntese, caracterização e o fornecimento do material foram realizados pela doutoranda Vanessa Roberta Cunha, orientada pela Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino (Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo). O composto final apresenta fórmula $[Zn_2Al(OH)_5]C_9H_7O_3 \cdot 3H_2O$, sendo que para cada 100 g de material 35,5 g é do ácido coumárico. O difratograma de raios X do material Zn_2AlCOu obtido pelo método da co-precipitação apresenta perfil análogo ao encontrado para a matriz Zn_2AlCl na região acima de $2\theta = 30^\circ$, ou seja, visualiza-se a presença das reflexões típicas da formação de HDL. Os picos localizados nas regiões de baixos valores de 2θ sugerem a intercalação dos íons coumarato, onde, d_{003} igual a 1,72 nm (conforme anexo 1).

3. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÁCIDO COUMÁRICO

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima do ácido coumárico em solução de NaCl 0,9% utilizaram-se concentrações do fármaco que variaram de 5 a 50 mM. Todos os valores de absorbância foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm.

Os valores de absorbância obtidos no comprimento de onda máximo foram analisados pelo programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., USA) para a aplicação da Lei de Beer, cálculo do ϵ e a obtenção do coeficiente de correlação (R), segundo a equação 1 abaixo:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Equação 1: Fórmula da lei de Beer. Onde: A= absorbância ; ϵ = constante de absorvidade molar para um determinado composto; b= caminho óptico; c= concentração em M.

5. ENSAIOS *IN VITRO*: LIBERAÇÃO DE ÁCIDO COUMÁRICO A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS $Mg^{2+}/Al^{3+}/Cl^-$ -HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

Para os ensaios de liberação *in vitro* foi utilizada uma célula de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação de $0,6 \text{ cm}^2$) e membranas de acetato de celulose (poro de exclusão molecular de 1000 daltons, equivalente à 30 nm), como modelo de barreira (Figura 9).

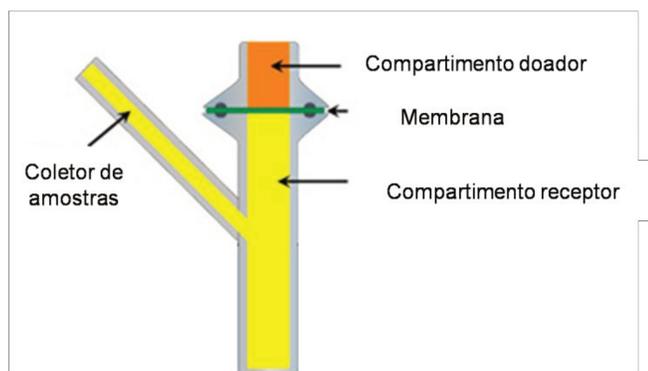


Figura 9: Ilustração de uma célula de Franz utilizada para teste de liberação *in vitro*. Em laranja compartimento doador, em amarelo compartimento receptor e em verde membrana que separa esses compartimentos.

O compartimento doador da célula foi preenchido com 0,5 mL de suspensão de ácido coumárico ou ácido coumárico-HDL, na concentração de $610 \mu\text{M}$ (equivalente a maior dose terapêutica utilizada nos testes *in vivo*, 30 mg/kg) em solução de NaCl 0,9 %. Já o compartimento receptor foi preenchido com uma solução 30 % propilenoglicol em fluido intestinal simulado pH 7.5 (Farmacopéia Brasileira 5^a edição ano 2010)

Em intervalos pré-estabelecidos, alíquotas da solução receptora foram retiradas e analisadas por espectrofotometria UV-VIS para a determinação da liberação do fármaco. A análise do perfil de liberação do fármaco a partir da suspensão em HDL foi realizada utilizando-se a área sob a curva da porcentagem de fármaco liberado em função do tempo (ASC) e pelo modelo de Higuchi (Dumortier, 2006), onde a razão de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do tempo e o fármaco é o único componente que se difunde através do meio) (equação 2):

$$Q_t = K_H t^{\frac{1}{2}}$$

Equação 2 : Fórmula para o modelo de Higuchi . Sendo Q a concentração de fármaco liberado em função do tempo, K é a constante de liberação (coeficiente de difusão) e t o tempo.

Os dados foram analisados utilizando o programa Origin 8.1 (Microcal™ Software, Inc., Northampton, MA, USA) e expressos em média \pm desvio padrão (n= 6).

6. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

6.1. TESTE DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Este teste foi realizado conforme preconizado na ISO 10993-5: 2009, o qual prescreve todas as normas e orientações para o cultivo das células de fibroblastos de camundongos da linhagem 3T3 e o método de citotoxicidade pelo vermelho neutro.

O vermelho neutro uma molécula orgânica $C_{15}H_{17}N_4$ de massa molar 288,78 g/mol (Figura 10), é um composto altamente solúvel que possui capacidade de se inserir na maioria das células, acumulando-se nos lisossomas (ROGERO,2003).

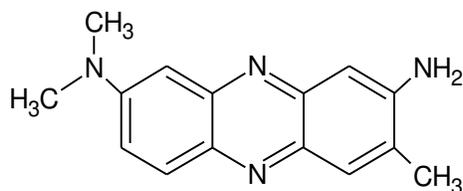


Figura 10: Molécula de Vermelho Neutro (VN)

Quando a membrana celular ou a membrana lisossomal é danificada, o vermelho neutro é pouco retido pela célula. Dessa forma, por meio da coloração é possível determinar a porcentagem de células que estão viáveis.

Para a realização do ensaio de vermelho neutro foram adicionados às cavidades de uma microplaca de cultura (96 cavidades) 100µL das células na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL e submetidos a incubação por 48 horas a 37°C em estufa com 5 % CO₂. Decorridas às 48 horas, o meio de cultura foi substituído por meio contendo ácido coumárico livre, ou intercalado em HDL, ou em HDL livre (composição molecular $[\text{Zn}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nas concentrações de 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5 mM, que correspondem à 0,032; 0,08; 0,16; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 mg/mL.

Após 24 horas do tratamento das células, os compostos foram retirados e as células tratadas com 100 µL do VN 50 µg/mL (preparado com 1 dia de antecedência), aguardou-se 3 horas, então o VN foi removido e adicionou-se 100µL de solução aquosa com 50% etanol e 1% de ácido acético. A placa foi agitada por 20 minutos e a leitura das absorbâncias realizada em 540 nm no espectrofotômetro Bio-Tek® ELx800 (Laboratório de Bioensaios e Transdução de Sinal, IB-Unicamp).

7. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTIINFLAMATÓRIA

Durante a realização deste trabalho foram utilizados camundongos albinos *Swiss* adultos, machos, com peso variando entre 30-35 g. Os animais, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB-Unicamp), foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*, temperatura ambiente monitorada a $22 \pm 3^\circ\text{C}$, alojados coletivamente (n=7/grupo experimental, 5 animais por gaiola) e aclimatados ao local de experimentação por pelo menos 7 dias. Para tanto, os protocolos experimentais foram submetidos à análise e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-UNICAMP) de acordo com os protocolos 2134-1, 2135-1 e 2136-1 (anexo 2, 3 e 4 respectivamente).

Para a realização dos ensaios, os grupos experimentais foram organizados como segue:

- Grupo 1 :Ácido Coumárico livre (AC) 10 mg/ kg
- Grupo 2: Ácido Coumárico livre (AC) 20 mg/ kg
- Grupo 3: Ácido Coumárico livre (AC) 30 mg/ kg
- Grupo 4: Ácido Coumárico intercalado em HDL (AC/HDL) 10 mg/ kg
- Grupo 5: Ácido Coumárico intercalado em HDL (AC/HDL) 20 mg/ kg
- Grupo 6: Ácido Coumárico intercalado em HDL (AC/HDL) 30 mg/ kg
- Grupo 7: Indometacina (Indo) 50 mg/kg (dose comercial)
- Grupo 8: Salina 0,9%
- Grupo 9: Morfina (Morf) 7,5 mg/kg
- Grupo 10: Naloxona (Nalox) 5 mg/kg
- Grupo 11: Cafeína 10 mg/kg

7.1.PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

A análise do exudato peritoneal permite a contagem do número de células inflamatórias após exposição a um estímulo nocivo. Dessa forma,pode-se determinar a ação dos compostos sobre a migração dessas células inflamatórias (GRISWOLD, 1987).

Após 1 hora do tratamento com os fármacos, via oral com o auxílio de uma cânula de gavagem, injetou-se via intraperitoneal, 0,1 ml/10g de solução de carragenina 1 % em solução de NaCl 0,9 % estéril e aguardou-se 4 horas. Após isso, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal preenchida com 2 mL de solução tampão PBS 5mM pH 7,4. Recolheu-se todo o exudado e transferiu-se para um microtubo plástico. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL deste homogenizado foi adicionada a 0,4 mL do líquido de Turck, sob vigorosa agitação, para evitar a formação de aglomerados celulares.

Para quantificar as células, uma alíquota 10 µL desta amostra foi colocada em câmara de Newbauer e as células foram contadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse TS100) no aumento de 10X.

7.2. TESTE DE FORMALINA

O teste de formalina foi realizado para verificar o efeito analgésico-antiinflamatório de diferentes substâncias (DUBUISSON E DENNIS, 1977a) frente a ativação de nociceptores. O comportamento de dor foi determinado pelo ato de “lamber” a pata inflamada e o tempo desse comportamento foi cronometrado. O tempo total de análise foi de 30 minutos, conforme a tabela abaixo:

Tabela 3: Efeito observado durante cada tempo de análise do teste de formalina segundo Abbott (1995)

Tempo (minutos)	Efeito
0	Indução
0 – 5	Dor neurogênica
5 – 15	Interfase
15 – 30	Dor inflamatória

Os animais foram tratados com os compostos testados anteriormente e com a Morfina 7,5 mg/kg (para verificar a participação do sistema opióides no efeito farmacológico dos compostos testados) , 1 hora antes da injeção subplantar de 20 µL de solução de formalina 1 % na pata direita, após essa aplicação o número de lambidas foram computadas para dor neurogênica e dor antiinflamatória sendo que na interfase os animais não lambem a pata.

Em outro teste foi realizada a associação de naloxona 5 mg/kg administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes da injeção subplantar de formalina e 30 minutos após a administração dos compostos a serem testados. Um terceiro teste foi feito com a associação de cafeína 10 mg/kg administrada nas mesmas condições anteriores.

A associação com a naloxona foi realizada para identificar se o ácido coumárico apresentaria ação no sistema opióide, já que, define-se como opióides qualquer substância que tenha o efeito similar à morfina e são bloqueados por antagonistas como a naloxona (FOLEY E INTURRISI, 1987; REISINE, 1996). A cafeína por sua vez foi utilizada para verificar a participação do mecanismo de sinalização via AMPc (DE MIRANDA, 2001).

7.3. CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

A realização deste permitiu avaliar o efeito analgésico e antinociceptivo do ácido coumárico livre e intercalado em nanopartículas inorgânicas de HDL, tendo como principal objetivo a comparação entre o efeito obtido no número de contorções entre os tratamentos..

Inicialmente, os animais foram tratados por via oral nas doses descritas anteriormente na seção 7. Após 1 hora, administrou-se por via intraperitoneal 0,1 mL/10g de ácido acético 0,6 %, aguardou-se 5 minutos para iniciar a contagem das contorções (contração do músculo abdominal e alongamento dos membros posteriores conforme método descrito por Collier (1968)). O número de contorções foi contabilizado de 5 em 5 minutos até completar o tempo total de 20 minutos.

Os dados experimentais obtidos foram expressos graficamente utilizando a soma do nº de contorções de cada grupo no tempo total de 20 minutos, para tal utilizou-se o programa Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., USA) e a análise estatística foi realizada através do método ANOVA com pós teste de Tukey-Kramer.

7.4. TAIL FLICK TESTE

A realização deste teve como objetivo a avaliação da nocicepção, por meio de um estímulo medular acionado pela termopercepção caudal (NESS E GEBHART, 1986; YONATHAN, 2006).

Inicialmente, os animais foram mantidos em contêntores de acrílico e uma porção da cauda (5 cm a partir da base) foi exposta ao calor de uma lâmpada projetora (55 ± 1°C) do aparelho de analgesímetro da Onda Científica (Figura 11).

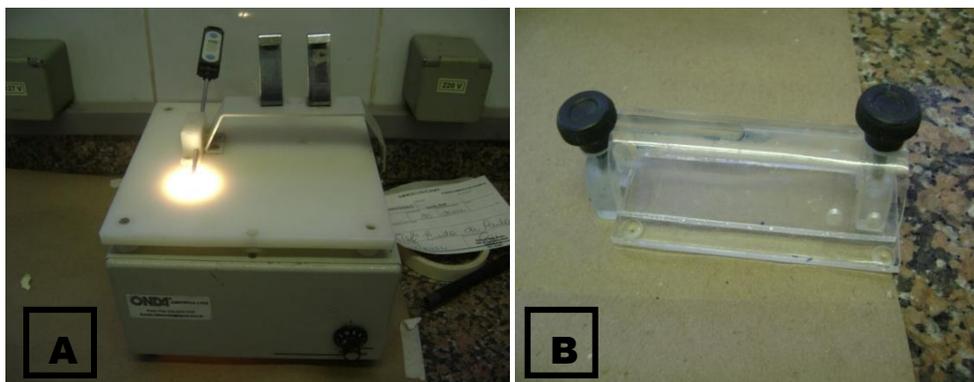


Figura 11: Foto do Analgesímetro utilizado para a realização do teste de tail flick. A- base do analgesímetro emitindo a fonte de calor; B- Contêntor de acrílico utilizado para imobilizar o animal.

O tempo decorrido entre o contato com o estímulo físico e o primeiro movimento de remoção da cauda (*tail flick*) foi considerado como o tempo de latência, sendo avaliado antes da administração dos fármacos (caracterizando a linha basal ou resposta normal ao estímulo) e durante cada tratamento (D'AMOUR E SMITH, 1941). Para evitar injúria térmica, foi estabelecido um tempo máximo (cut off) de 20 segundos para o contato da cauda com o estímulo nocivo. Os resultados foram expressos em número de animais com analgesia em função do tempo, duração da analgesia e em porcentagem de máximo efeito antinociceptivo possível (MPE %), de acordo com a equação 3:

$$\text{MPE (\%)} = (\text{Latência Teste} - \text{Linha basal}) / (\text{Cut off} - \text{Linha basal}) \times 100.$$

Equação 4: Fórmula para a obtenção do valor em porcentagem do efeito antinociceptivo máximo possível (MPE%). Utilizando a linha basal, o tempo de Cut-off e o valor de latência do teste.

8. ANALISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados dos testes de contorção, peritonite e formalina foram realizados testes estatísticos de comparação por análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer. Para análise dos dados de cada tempo do teste de tail flick foi utilizado o teste de variância de duas vias (Two-way ANOVA) com teste posterior de Bonferroni. O programa utilizado foi o GraphPad Prisma (Graph Pad Software Inc., versão 5.0,2007)

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÁCIDO COUMÁRICO

Na literatura encontramos uma faixa de absorção, para compostos fenólicos derivados de ácido cinâmicos estabelecida entre 270 á 360 nm Robbins (2003). Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção do ácido p-coumárico, realizou-se um scan da amostra em diferentes concentrações em solução de NaCl 0,9 % (Figura 12).

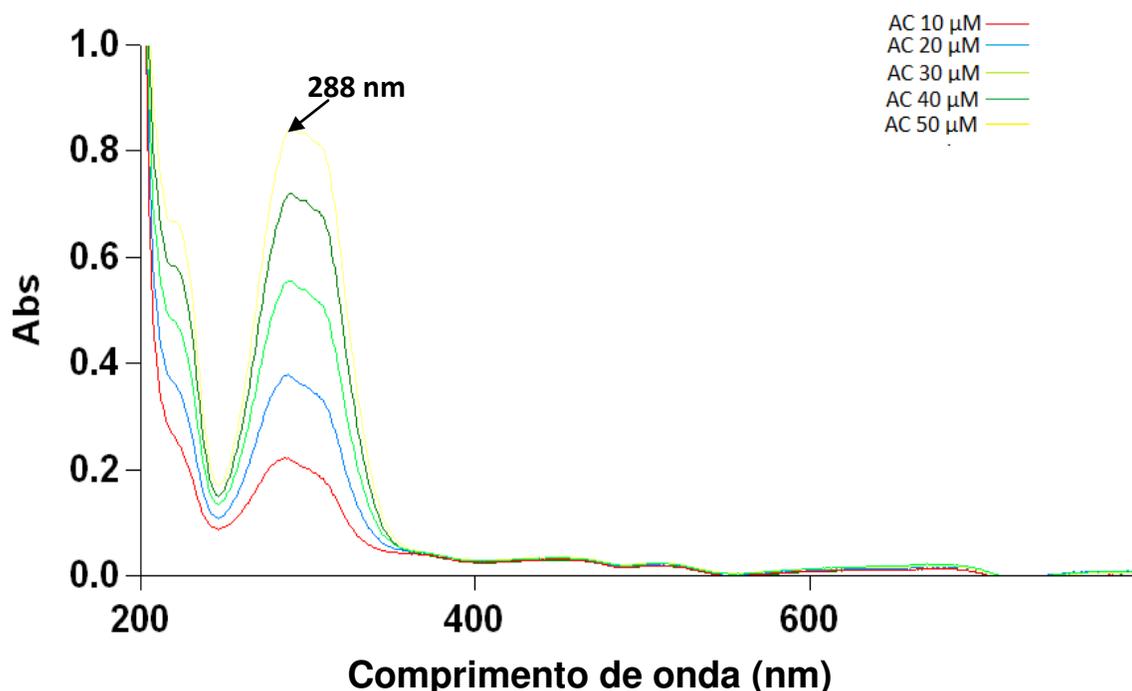


Figura 12: Análise espectrofotométrica de varredura. Diferentes concentrações do Ácido Coumárico com máxima absorção em 288nm.

Através dos scans obtidos foi determinado o comprimento de onda máxima absorção em 288 nm. Este comprimento foi padronizado para a determinação da curva de calibração e para o teste de liberação *in vitro*.

Em seguida, com a determinação da curva de calibração (Figura 13), foi possível obter o valor da constante de absorvidade molar para o ácido coumárico, sendo de $19015 \text{ m}^{-1} \cdot \text{cm}$, com coeficiente de correlação (R^2) de 0,99969 ($y = -0,00404 + 0,01907$).

A curva de calibração aqui obtida (figura 13) foi utilizada durante o trabalho para determinar as concentrações de fármaco liberado a partir de cada formulação, bem como para calcular a constante de liberação.

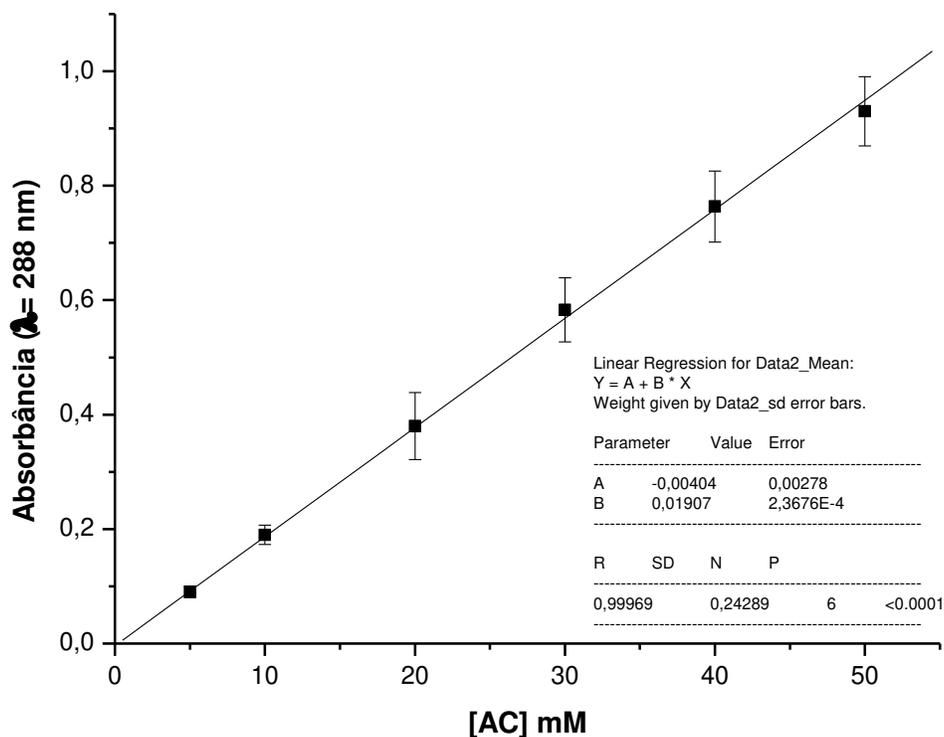


Figura 13: Curva de calibração para o ácido coumárico. Obtida por espectrofotometria UV-VIS em diferentes concentrações (n=6).

1.1. LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O perfil de liberação para o ácido coumárico livre (AC) e intercalado a hidróxidos duplos lamelares (AC-HDL) foi determinado pela quantificação do AC presente na solução aceptora durante um intervalo de tempo de 8 horas.

A solução aceptora utilizada, composta de fosfato de potássio monobásico e hidróxido de sódio (pH 7,5) foi utilizada com a finalidade de mimetizar o fluído intestinal, onde essa classe de compostos é, preferencialmente absorvida no organismo (GARRAIT, 2006).

A figura 14 apresenta o gráfico da porcentagem de liberação do ácido coumárico isolado (AC) ou intercalado em HDL (AC-HDL) em função do tempo. Os dados demonstram uma redução na porcentagem de ácido coumárico liberado quando intercalado ao hidróxido duplo lamelar em relação ao fármaco livre a partir de 4 horas de experimentação. Esses dados são confirmados pela diferença estatística observada nos valores de área sob a curva (ASC_{0-8h}) para o AC livre ($560,3 \pm 54,6$) e AC-HDL ($438,9 \pm 47,4$), com $p < 0,01$.

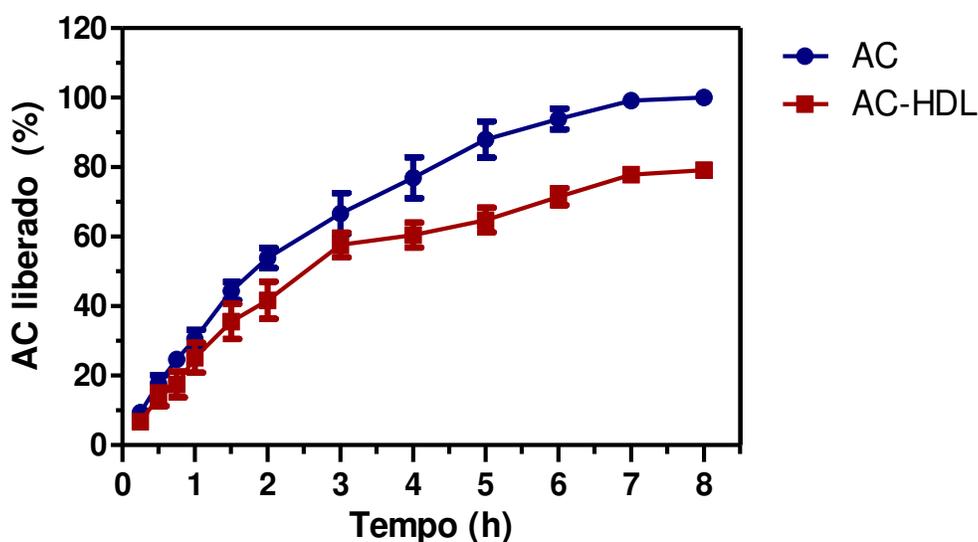


Figura 14: Perfis de liberação do ácido coumárico livre (AC) e intercalado a nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares (AC-HDL). Dados expressos em porcentagem de fármaco liberado em função do tempo. Dados apresentados como média \pm SD ($n=5$).

Os resultados foram, então, tratados pelo modelo de Higuchi (Figura 15), onde a razão de liberação do fármaco é linear em função da raiz quadrada do tempo e o fármaco é o único componente que se difunde através do meio (respondendo à lei de difusão de Fick) (Anderson et al., 2001):

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

sendo, Q a concentração de fármaco liberado em função do tempo, K a constante de liberação (coeficiente de difusão ou fluxo) e t o tempo.

Os valores de fluxo ou constantes de liberação (K_{lib}) foram $41,6 \pm 1,5 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1/2}$ ($R^2 = 0,99347$) e $32,4 \pm 1,5 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1/2}$ ($R^2 = 0,98996$) para o AC em solução e intercalado (AC-HDL), respectivamente, mostrando que a liberação do AC intercalado segue o modelo de difusão de Higuchi, devido a obtenção do alto valor de coeficiente relativo, demonstrando assim que o ácido coumárico é liberado da nanopartícula por meio de troca iônica. Além disso, esses resultados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,01$), apontando para uma pré-formulação capaz de prolongar a liberação do ácido coumárico no local de absorção.

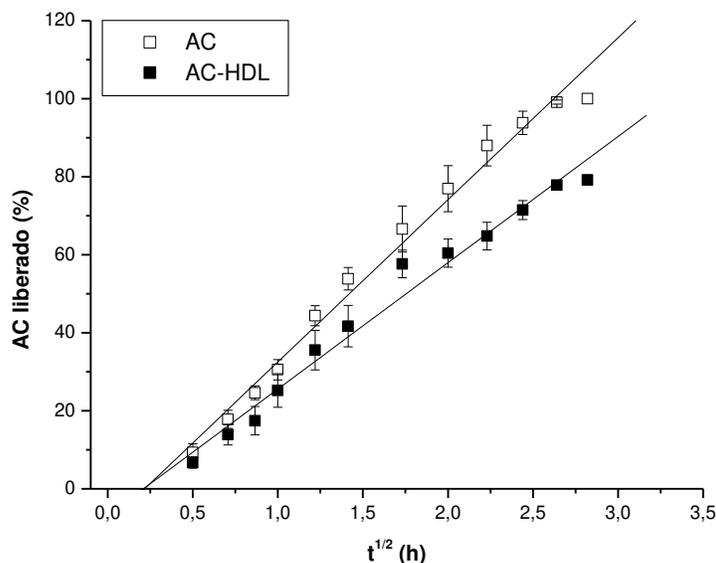


Figura 15: Modelo de difusão de Higuchi. Aplicados aos perfis de liberação do AC livre e intercalado em HDL (AC-HDL).

Um dos principais objetivos da intercalação dos fármacos nos hidróxidos duplos lamelares (HDL) é a liberação controlada de seus compostos intercalados (CUNHA, 2010). Nossos resultados mostram respostas semelhantes aos

resultados obtidas na literatura para outros fármacos como naproxeno (KHAN, 2001), ibuprofeno (GORDIJO, 2005) e diclofenaco (BONINA, 2008).

1.2. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Geralmente, o teste mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é o teste de redução do MTT. Este teste é um dos ensaios mais utilizados para a determinação de células viáveis após o tratamento com fármacos e outros compostos bioativos (DENIZOT E LANG, 1986). As nanopartículas inorgânicas HDL compostas de Zn e Al foram testadas em 3 linhagens celulares diferentes pelo método de MTT e não apresentaram toxicidade nas doses de 0,4 - 50 mM (CHOI, 2007). No entanto, este teste baseia-se em reações óxido-redução que podem sofrer interferência direta do ácido coumárico, uma vez que este já apresenta propriedades antioxidantes descritas em literatura (LEE, 2009).

Embora Song e colaboradores tenham publicado, em 2011, a descrição da utilização do teste de MTT como ferramenta de avaliação de compostos com ação antioxidante, esse teste não representa uma avaliação específica de citotoxicidade no caso do ácido coumárico.

Os testes de citotoxicidade consistem na averiguação do efeito tóxico de substâncias sobre culturas de células. Neste trabalho, foram utilizados fibroblastos da linhagem 3T3, comumente descritas na literatura por apresentarem reprodutibilidade de resultados e um bom desenvolvimento em cultura.

Devido ao objetivo de avaliar o efeito citotóxico da formulação e não o seu efeito antioxidante, optou-se pela utilização do teste de incorporação do vermelho neutro (VN). Essa técnica é baseada na capacidade das células viáveis incorporarem o VN, um corante catiônico fraco que facilmente penetra membranas celulares por difusão e acumula-se nos lisossomos. Assim, quando ocorrem alterações nas membranas celulares, é possível distinguir células viáveis, danificadas ou mesmo mortas, sendo estas últimas à base do ensaio.

A figura 16 apresenta a porcentagem de células viáveis (incorporaram o vermelho neutro) nas concentrações de 0,2 a 12,5 mM de ácido coumárico, determinadas pelo limite de solubilidade das nanopartículas de HDL no meio DMEM.

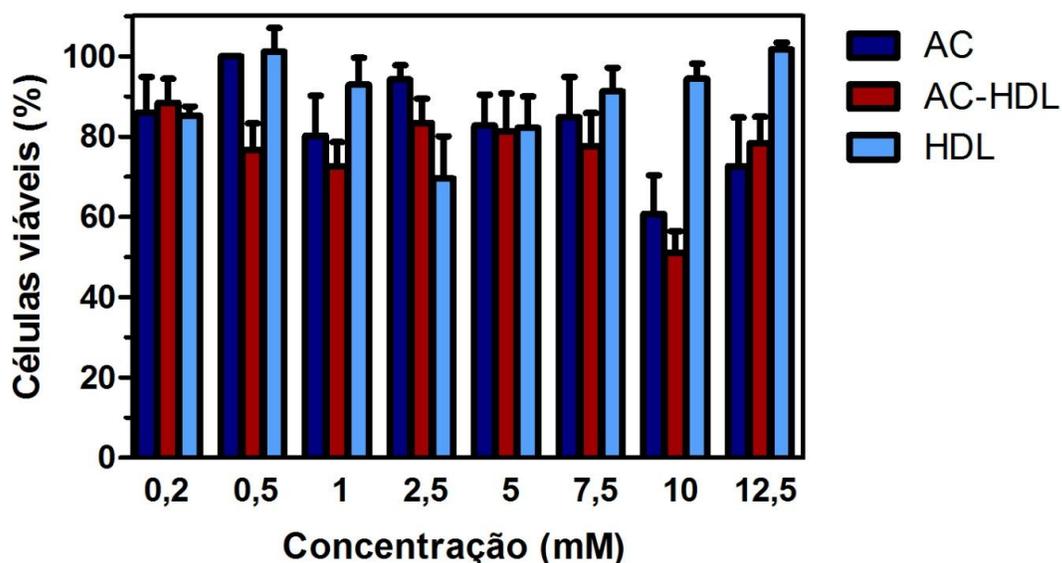


Figura 16: Gráfico da porcentagem de células viáveis. Resultados extraídos pós-tratamentos com diferentes concentrações de ácido coumárico livre e intercalado em HDL, avaliada pelo teste de incorporação do VN. Resultados expressos em média \pm SD (n=6).

Os dados obtidos com esse teste demonstraram que em todas as concentrações testadas de AC e AC-HDL não houve redução significativa da porcentagem de células viáveis, pois não foi observada viabilidade celular menor que 50 % (figura 16).

Testes de citotoxicidade (MTT e hemólises), realizados pelo nosso grupo, com ácido mefenâmico (AINE) intercalado a nanopartículas inorgânicas demonstraram uma baixa toxicidade celular como o demonstrado neste trabalho (CUNHA, 2010 ; GUILHERME, 2011).

Para uma concentração celular de $2,5 \times 10^5$ células/mL uma dose de 2 mg/mL de amostra não causa efeito tóxico e considerando-se a dose máxima utilizada nos testes *in vivo*, de 30 mg/kg a massa de ácido coumárico administrada em cada animal foi de 0,9 mg (para um animal com peso médio de 30 g), esse

valor está dentro da faixa testada no teste de viabilidade celular, não sendo citotóxico.

A intenção desse trabalho foi avaliar inicialmente a toxicidade em linhagens mais gerais, como em fibroblastos para, posteriormente, avaliar a toxicidade em células intestinais e hepatócitos.

2. TESTES FARMACOLÓGICOS

Os testes farmacológicos avaliam, *in vivo*, o desempenho do ácido coumárico livre e intercalado ao HDL (AC e AC-HDL) e compara essas respostas à indometacina (Indo), um AINE comumente utilizado nesses testes, bem como estuda a participação de mecanismos envolvidos nas respostas farmacológicas, especialmente o sistema opióide (controles morfina e naloxona) e a via de sinalização do AMPc (com a utilização de cafeína).

2.1. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA: TESTE DE INDUÇÃO DE PERITONITE

O teste de peritonite permite a contagem das células presentes em um processo inflamatório (leucócitos) induzido pela injeção de carragenina (um agente algógeno) no exudato pleural (D'AMOUR, 1965).

A figura 17 apresenta os resultados obtidos pós-tratamentos com indometacina, AC livre e intercalado em HDL (AC/HDL) em diferentes doses. O tratamento com AC-HDL reduziu significativamente o número de leucócitos em relação ao AC livre na dose de 10 mg/kg ($p < 0,001$). Porém, nesta análise, tanto o AC livre quanto intercalado não apresentaram efeito semelhante à indometacina na dose de 10 mg/kg, uma vez que o tratamento com indometacina apresentou potência cerca de 1,5 vezes maior que o AC, para esse teste. As demais doses testadas livres e intercaladas assim como a dose de AC-HDL 10 mg/kg, apresentaram efeito similar a indometacina.

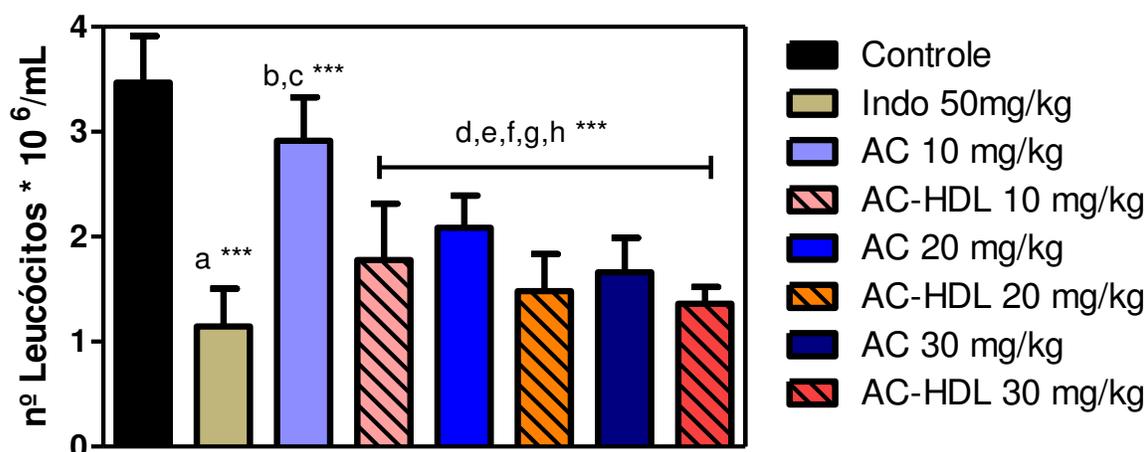


Figura 17: Número de células leucocitárias por mL de líquido pleural pós-tratamentos com AC livre (AC) ou intercalado em HDL (AC-HDL), nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg, comparados à indometacina (Indo, 50 mg/kg). Sendo a- Indo 50mg/kg vs controle; b- AC 10mg/kg vs Indo 50mg/kg; c- AC 10mg/kg vs AC-HDL 10 mg/kg; d- AC-HDL 10mg/kg vs controle; e- AC 20mg/kg vs controle; f- AC-HDL 20mg/kg vs controle; g- AC 30mg/kg vs controle; h- AC-HDL 30mg/kg vs controle . *** $p < 0,001$ (média \pm SD, $n=7$ /grupo).

A apresentação desses dados demonstrou uma similaridade de efeito do ácido p-coumárico com a indometacina. Para esse teste, que avalia a migração celular de leucócitos, a intercalação do composto em HDL não afetou seu efeito nas maiores doses (20 e 30 mg/kg), provavelmente por não haver alteração direta do mecanismo de ação do ácido p-coumárico e sim um possível aumento na duração dos efeitos farmacológicos, como resultado da liberação gradual do fármaco intercalado, como demonstrado nos resultados do teste de liberação *in vitro*.

2.2. ATIVIDADE ANALGÉSICA-ANTIINFLAMATÓRIA: TESTE DA FORMALINA

Por meio deste teste foi possível avaliar a resposta a um estímulo inflamatório (formalina), sendo observados comportamentos dos animais

relacionados à indução de dor neurogênica e de origem inflamatória (DUBUISSON e DENNIS, 1977b; ABBOTT , 1995; DE MIRANDA, 2001)

Os dados foram expressos graficamente pelo número de manifestações de comportamento de dor que foram contados a partir do tempo 0 até 5 minutos e a partir de 15 até 30 minutos.

Para a investigação dos mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos farmacológicos do AC, a formalina foi aplicada com injeção intraplantar para ativar de forma direta neurônios nociceptivos. A resposta inicial de 0-5 minutos é neurogênica (ABBOTT, 1999) e bloqueada apenas pela morfina, resultando em uma diminuição do comportamento de dor (tempo de lambida), como pode ser visto na figura 18A. Com a administração de naloxona, um antagonista de receptores opióides, a ação da morfina é bloqueada, revertendo à atividade analgésica daquele fármaco (figura 18B). Já a administração de cafeína 10 mg/kg foi utilizada para verificar a participação do sistema adenosina, sendo os dados desta associação expressos na figura 18C.

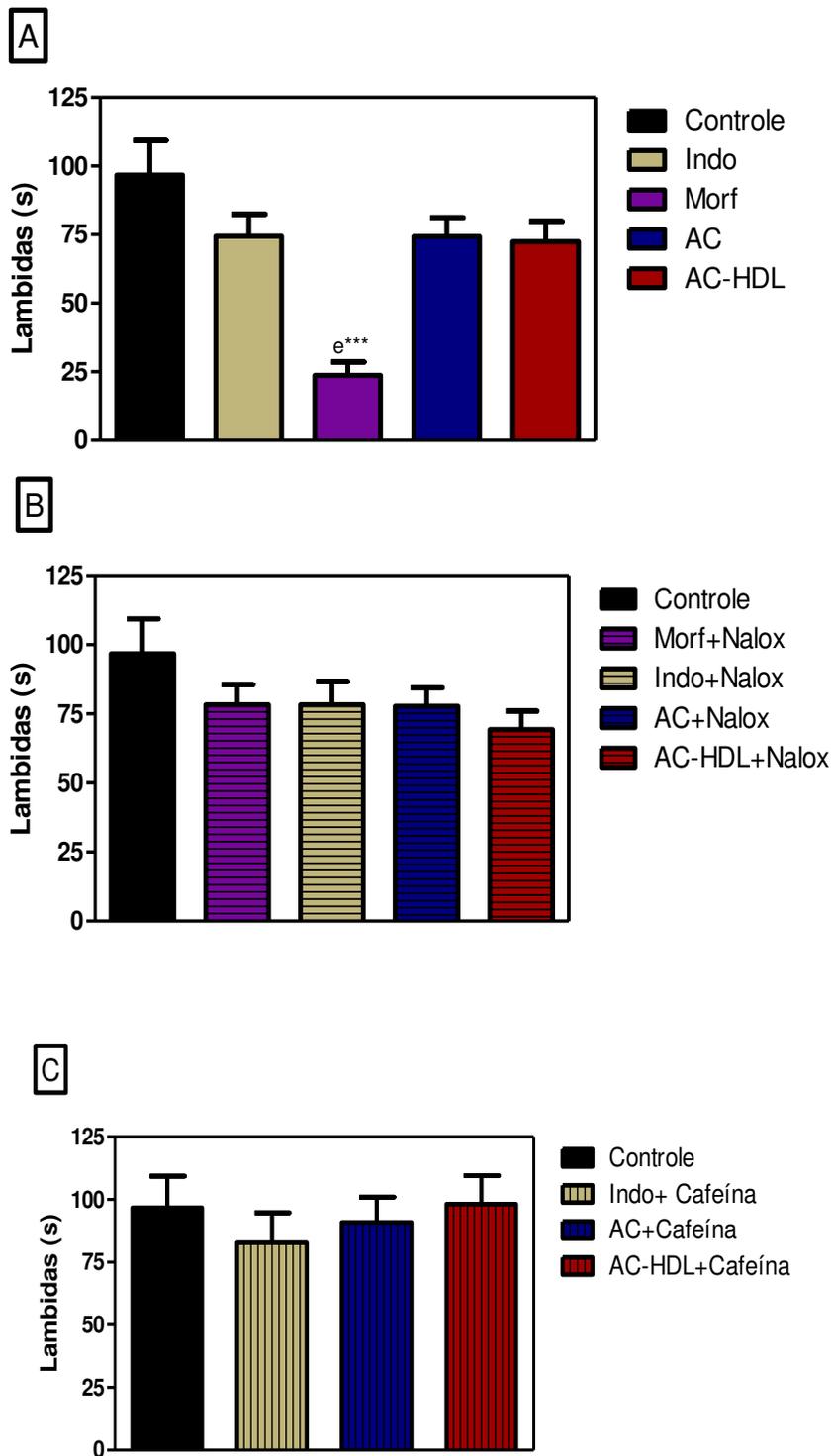


Figura 18: Teste de formalina no tempo de 0-5. A- compostos aplicados sem associação; B- compostos associados à naloxona; C- compostos associados à cafeína. Análise estatística com significância de $***p < 0,001$ (ANOVA) sendo a- indo vs controle; b- Morf vs controle; c- AC vs controle; d- AC-HDL vs controle; e- Morf vs indo .

Na etapa inicial do teste (0-5 min), observou-se que a administração de morfina, indometacina e AC livre ou intercalado reduziram o número de comportamentos relacionados à dor neurogênica, sendo apenas o efeito da morfina revertido pela administração de naloxona. Esses resultados sugerem que na etapa inicial do teste não há participação de mecanismos opióide e da via adenosina na indução dos efeitos farmacológicos do AC.

Na figura 19, a segunda etapa do teste, tempo de 15-30 minutos, reflete a dor inflamatória (ABBOTT, 1999), mostrando também que todos os compostos apresentaram efeito anti-inflamatório com diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,001$). Nessa etapa, o AC apresentou resposta similar à indometacina, enquanto o composto intercalado induziu efeito mais pronunciado ($p < 0,05$), indicando que a intercalação de AC em HDL potencializou seu efeito anti-inflamatório local.

Com relação às vias de indução da dor, no período de 15 a 30 minutos de teste, observou-se que a administração de naloxona ou cafeína não foram capazes de reverter os efeitos farmacológicos da indometacina e nem do AC mostrando que nessa segunda etapa também não há participação do sistema opióide e da via adenosina, comprovando que os efeitos anti-inflamatórios do AC utilizam mecanismos semelhantes aqueles dos AINEs, como a possível inibição da via da ciclooxigenase (LUCERI, 2004; LUCERI, 2007) e que a intercalação do AC em HDL não alterou tais mecanismo

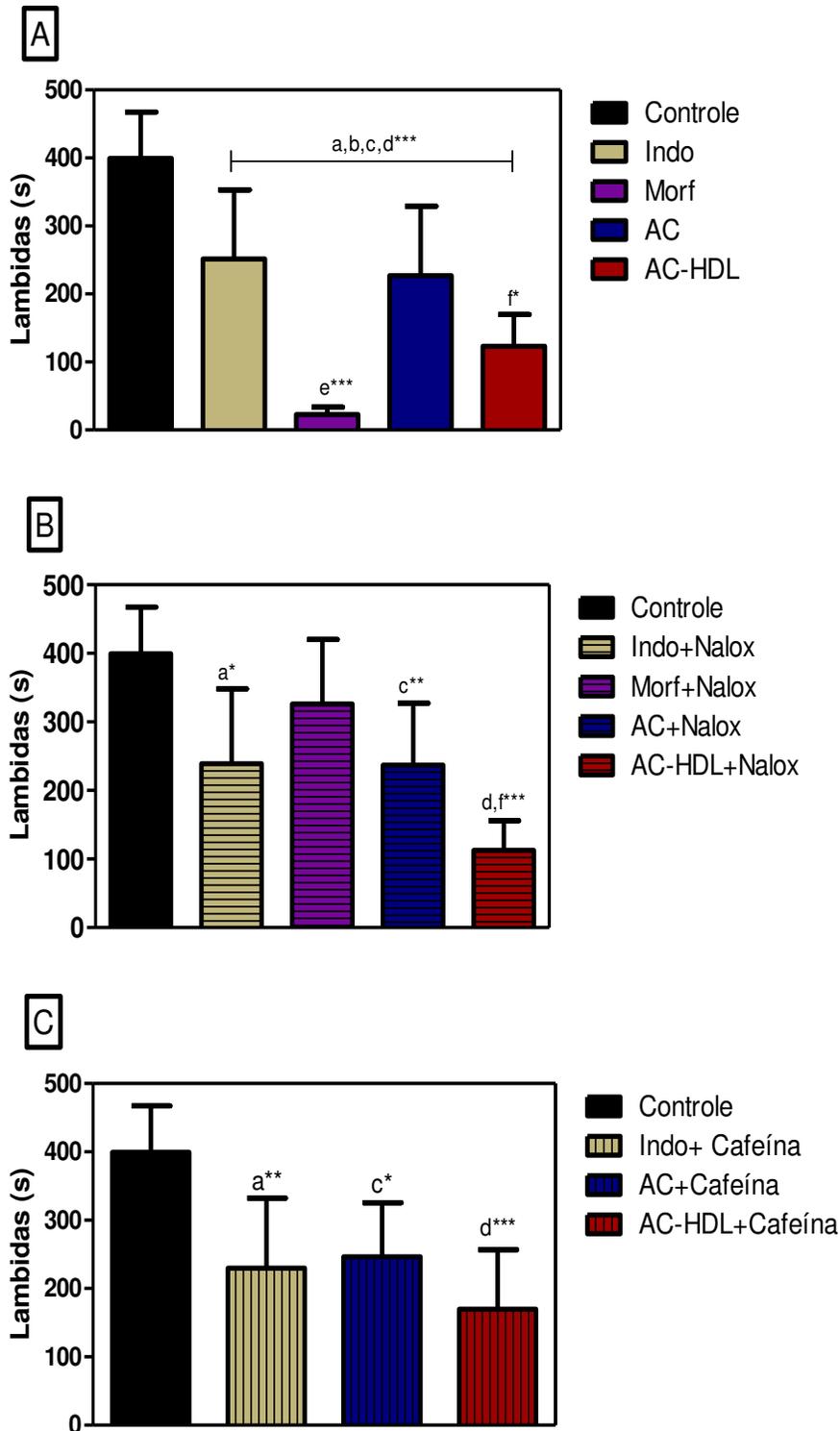


Figura 19: Teste de formalina no tempo de 15-30. A- compostos aplicados sem associação; B- compostos associados à naloxona; C- compostos associados à cafeína. Análise estatística com significância de *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e $p < 0,05$ (ANOVA) sendo a- indo vs controle; b- Morf vs controle; c- AC vs controle; d- AC-HDL vs controle; e- Morf vs indo; f- AC vs AC-HDL.

2.3. ATIVIDADE ANALGÉSICA-ANTIINFLAMATÓRIA: TESTE DE INDUÇÃO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

O teste de contorção abdominal foi realizado para avaliar o efeito do AC livre e intercalado em HDL, perante uma inflamação aguda, deflagrada pela injeção intraperitoneal do ácido acético. Devido ao agente algógeno, os animais apresentam contorções que foram contadas de acordo com os controles (solução salina e indometacina) e tratamentos realizados. A figura 20 apresenta o número de contorções obtidas para cada grupo testado no tempo total de 20 minutos de observação.

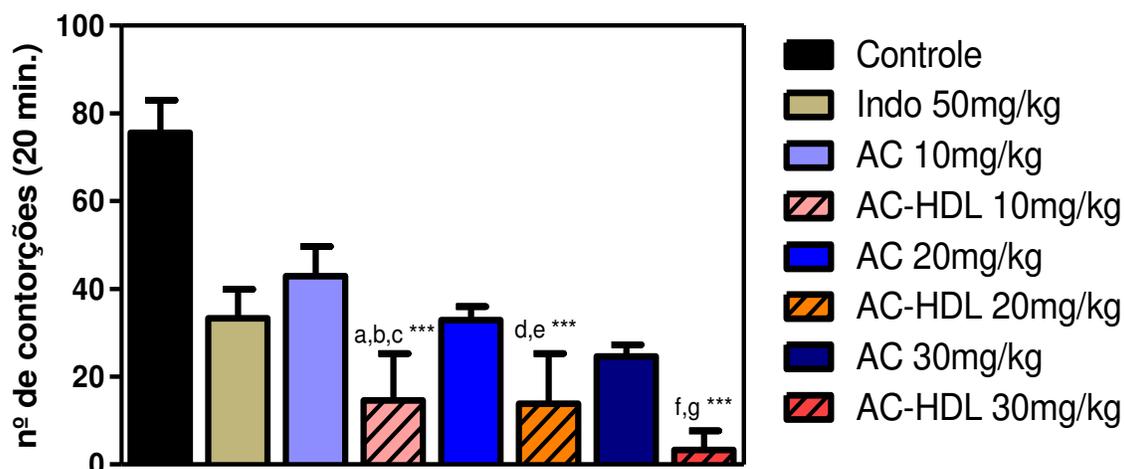


Figura 20: Gráfico do número de contorções em 20 min de experimento. Onde a- AC-HDL 10 mg/kg vs Indo 50mg/kg; b- AC-HDL 10 mg/kg vs AC 10 mg/kg c- AC-HDL 10 mg/kg vs AC 20 mg/kg; d- AC-HDL 20 mg/kg vs Indo 50mg/kg; e- AC-HDL 20 mg/kg vs AC 20 mg/kg; f- AC-HDL 30 mg/kg vs Indo 50mg/kg ; g- AC-HDL 30 mg/kg vs AC 30 mg/kg. *** $p < 0,0001$ (média \pm SD, n=7/grupo).

Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo do AC livre, nas três doses utilizadas, foi semelhante aquele observado para o controle com

indometacina. No entanto, o AC intercalado em HDL apresentou uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de contorções quando comparado à indometacina para todas as doses avaliadas. Além disso, o AC intercalado, na dose de 10 mg/kg apresentou um efeito analgésico maior ($p < 0,001$) que a concentração de AC livre na dose de 20 mg/kg do AC livre já a dose de 20 mg/kg intercalado apresentou efeitos similares ao composto livre na dose de 30 mg/kg.

Dessa forma, com os resultados obtidos neste teste pode-se verificar que a intercalação dos compostos em HDL potencializou o efeito antinociceptivo do AC livre e, provavelmente, por mecanismos similares aqueles utilizados por fármacos da classe dos AINEs, como a indometacina.

Dados para modelos *in vivo* avaliando o efeito anti-inflamatório, são escassos na literatura. Bonina (2008), realizavam testes com géis contendo diclofenaco/HDL com aplicação tópica em humanos ($n=10$) para diminuir o eritema cutâneo, mostrando uma maior eficiência do composto intercalado quando comparado ao diclofenaco livre. Além disso, testes com ibuprofeno e cetoprofeno intercalados também foram realizados com intuito de demonstrar uma redução nos efeitos adversos ao trato gastrointestinal, frequentemente observados após o tratamento prolongado com os fármacos não-intercalados (DEL, 2004b; SILION, 2010).

2.4. ATIVIDADE ANALGÉSICA: TESTE *TAIL FLICK*

O teste de *tail flick* mostra a resposta referente ao efeito analgésico dos compostos testados, os dados estão representados na forma de gráficos separados de acordo com a dose e todas as doses foram comparadas ao controle indometacina (50 mg/kg), conforme a figura 21.

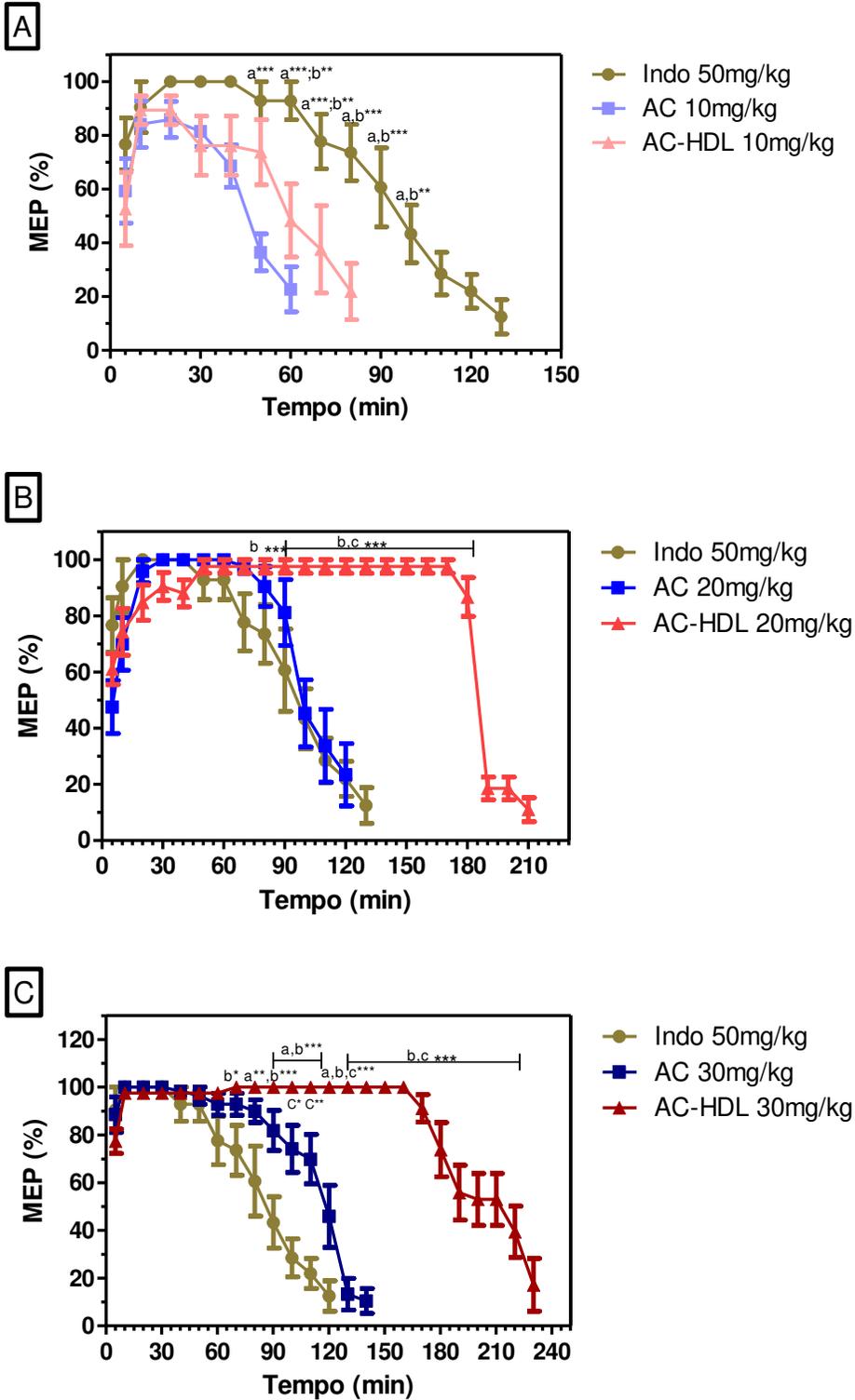


Figura 21: Curvas de máximo efeito percentual (MEP%) versus tempo em minutos obtidas pós-tratamento com AC livre ou AC-HDL, nas doses de 10 mg/kg (A), 20 mg/kg (B) e 30 mg/kg (C), no teste tail flick sendo a- Indo vs AC; b- Indo vs AC-HDL; c- AC vs AC-HDL * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ Two-Way ANOVA (Média \pm SEM, $n = 7$ /grupo).

Para melhor apresentação dos dados foram realizados cálculos de área sob a curva (ASC_{0-240}), e do tempo de recuperação (T_{REC}) em minutos extraídos dos gráficos representados na figura 21, além disso os dados passaram por análises estatísticas e estão representados na tabela 3.

Tabela 4: Área sob a curva (ASC) e tempo de duração da analgesia (T_{REC}). Obtidos para as curvas de efeito versus tempo após o teste tail flick a- AC 10mg/kg vs indo; b- AC-HDL 10mg/kg vs indo; c- AC 10mg/kg vs AC-HDL 10 mg/kg; d- AC-HDL 20mg/kg vs indo; e- AC 20mg/kg vs AC-HDL 20mg/kg; f- AC 30mg/kg vs Indo; g- Indo vs AC-HDL 30mg/kg; h- AC 30 mg/kg vs AC-HDL 30 mg/kg sendo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Média (mínimo. e máximos n=7/grupo).

	ASC_{0-240}	T_{REC} (min)
Indo	106,0 (92,0 - 114,5) ^{d,f,g***}	120 (90 - 130) ^{d,g***}
AC 10 mg/kg	53,5 (33,5 - 54,5) ^{a***}	50 (40 - 60) ^{a***}
AC-HDL 10 mg/kg	74,5 (52,5 - 84,0) ^{b***,c**}	70 (60 - 80) ^{b,c***}
AC 20 mg/kg	111,0 (97,0 - 117,0) ^{e***}	110(100 - 120) ^{e***}
AC-HDL 20 mg/kg	194,0 (190,0 - 201,0)	190 (190 - 210)
AC 30 mg/kg	142,5 (110,0 - 146,0) ^{h***}	130 (120 - 140) ^{h***}
AC-HDL 30 mg/kg	220,0 (210,5 - 242,0)	220 (210 - 230)

Os dados apresentados na tabela 3 e na figura 23 mostram o efeito analgésico do AC livre e intercalado (AC-HDL). Os resultados mostram que tanto o AC livre quanto intercalado, nas doses de 20 e 30 mg/kg, induziram intensidade e duração do efeito analgésico significativamente maiores ($p < 0,001$), em relação à indometacina. Além disso, observou-se que a intercalação de AC em HDL também aumentou a intensidade da analgesia, bem como prolongou o tempo de duração da mesma cerca de 1,7 vezes mais que o AC livre ($p < 0,001$).

Os experimento farmacológicos, demonstram uma melhora na atividade do composto bioativo intercalado em comparação a sua forma livre. Tendo em vista que para que um composto bioativo tenha a sua ação esperada, ele necessita chegar à circulação sistêmica e, então, ser direcionado às células alvo. Para isso, um composto administrado via oral (via de administração do composto bioativo

estudado nesse trabalho) deve ser absorvido no estômago ou no intestino, o quanto deste composto estará disponível para executar a sua ação antes de ser metabolizado, é chamado de biodisponibilidade.

A biodisponibilidade pode ser influenciada pelo tempo de trânsito do trato gastrointestinal, esvaziamento gástrico, biotransformação do composto, grau de conjugação, interação com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, bem como da composição da microflora intestinal e do perfil genético do indivíduo (fatores endógenos).

Compostos fenólicos apresentam uma baixa absorção no estômago, pois sua maior absorção é realizada no intestino onde há a presença dos transportadores para compostos carboxílicos (MCT). No entanto, a parcela que não é absorvida sofrerá ação da microflora bacteriana presente no colón, onde, a primeira reação de biotransformação do ácido p-coumárico é uma hidrogenação e uma hidroxilação formando o composto 3,4-di-hidroxifenilpropiónico que, posteriormente será submetido a uma desidroxilação formando o composto 4-hidroxifenilpropiónico. Esse último, por sua vez, é absorvido e, após sofrer β -oxidação, nos tecidos será originado o ácido hidroxi-benzóico que finalmente será conjugado com a glicina formando o ácido hidroxi-hipúrico e excretado pela urina (OLIVEIRA,2011) .

Considerando-se os resultados obtidos, percebemos uma maior eficiência do composto intercalado em comparação ao composto livre. Este fato provavelmente se dá em decorrência de um aumento na biodisponibilidade do ácido p-coumárico para a circulação sistêmica e para as células-alvo sem sofrer biotransformação pelas bactérias do colón, sugerindo que as nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares exercem uma barreira protetora ao composto e conforme o ácido p-coumárico vai sendo liberado desta matriz vai sendo transportado para a circulação.

Os ensaios in vivo aqui realizados demonstram que o sistema AC-HDL não apresenta atividade farmacológica dose-independente, pois os dados apontam

para uma ação no bloqueio da COX, decorrente da quantidade de enzima presente no local de ação, existindo portanto uma dose de saturação para essas enzimas e, com isso, uma administração maior de composto não irá alterar o padrão desta resposta. Por fim, o aumento da biodisponibilidade observado ressalta a possibilidade de administração de menores doses de ácido coumárico e possível redução dos efeitos adversos, caracterizando um sistema de liberação modificada.

V. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram a liberação mais lenta do ácido coumárico quando intercalado em hidróxidos duplos lamelares, bem como a baixa toxicidade do sistema preparado.

Com a avaliação farmacológica, foi possível demonstrar que os mecanismos utilizados pelo AC para exercer suas atividades anti-inflamatória e analgésica são semelhantes aos da indometacina (um AINE de uso comercial). Além disso, observou-se que a intercalação de AC em HDL potencializou a intensidade e aumentou a duração da analgesia, relação ao AC livre.

Os resultados aqui obtidos apontam para um sistema de liberação, contendo nanopartículas inorgânicas que, embora pouco descritas na literatura, apresentou cinética de liberação lenta, baixa toxicidade e maior eficácia farmacológica que o fármaco não intercalado.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, 91-102, 1995.
- ABBOTT, F. V.; OCVIRK, R.; NAJAFEE, R.; FRANKLIN, K. B. Improving the efficiency of the formalin test. **Pain**,v. 83, 561-569, 1999.
- AGUZZI, C.; CERESO, P.; VISERAS, C.; CAMELLA, C. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. **Applied Clay Science** v. 36, 22-36, 2007.
- ALAFEEFY, A Synthesis, analgesic and anti inflammatory activities of some new fenamate analogues. **Arzneimittelforschung**. Vol 58, 457-63,2008.
- ALMASIRAD, A., TAJIK, M., BAKHTIARI, D., SHAFIEE, A., ABDOLLAHI, M., ZAMANI, M., KHORASANI, R. & ESMAILY, H. Synthesis and analgesic activity of N-Arylhydrazone derivatives of mefenamic acid.J Pharm Pharm Sci.Vol 8, 419-25,2005.
- AMBROGI, V., FARDELLA, G., GRANDOLINI, G., NOCCHETTI, M. & PERIOLI, L. Effect of hydrotalcite-like compounds on the aqueous solubility of some poorly water-soluble drugs. **J Pharm Sci** 92, 1407-18, 2003.
- AN, S. M., KOH, J. S. E BOO, Y. C. p-coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB.**Phytother Res**. Vol. 24, 1175-80,2010.
- AN, S. M., LEE, S. I., CHOI, S. W., MOON, S. W. & BOO, Y. C.. p-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone.**Br J Dermatol**. Vol.159, 292 - 299, 2008.
- ANDREASEN, M. F., KROON, P. A., WILLIAMSON, G. & GARCIA-CONESA, M. T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. **J Agric Food Chem**. Vol.49, 5679-5684, 2001.
- ANDERSON, B. C.; PANDIT, N. K.; MALLAPRAGADA, S. K. Understanding drug release from poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) gels. **Journal of Controlled Release**. Vol. 70, n. 1-2, p. 157-167, 2001.

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. Vol. 66, n. 1, 232-240, 2007.
- ANTHONY, J. P., FYFE, L., STEWART, D. & MCDOUGALL, G. J. Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents. **Parasitology** Vol. 138, 1110-1116, 2011.
- AY, A., ZÜMREOGLU-KARAN, B., TEMEL, A. & RIVES, V. (2009). Bioinorganic magnetic core-shell nanocomposites carrying antiarthritic agents: intercalation of ibuprofen and glucuronic acid into Mg-Al-layered double hydroxides supported on magnesium ferrite. **Inorg Chem**. Vol. 48, 8871-8877, 2009.
- BARBATO, F., LA ROTONDA, M. & QUAGLIA, F. Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes. **J Pharm Sci**. Vol. 86, 225-229, 1997.
- BIN HUSSEIN, M. & LONG, C. Synthesis of organo-mineral nanohybrid material: indole-2-carboxylate in the lamella of Zn-Al-layered double hydroxide. **Materials Chemistry and Physics**. Vol. 1 427-431, 2004
- BONINA, F., GIANNOSSI, M., MEDICI, L., PUGLIA, C., SUMMA, V. & TATEO, F. Diclofenac-hydrotalcite: In vitro and in vivo release experiments. **Applied Clay Science**. Vol. 1, 165-171, 2008
- BOTTING, R. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **J. Thermal Biol.** Vol. 1 208-219, 2006
- BRESOLIN T.A.B., CHENCHINEL FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. Santos: Santos, 2010. 436p.
- BREWSTER, M., NOPPE, M., PEETERS, J. & LOFTSSON, T. Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins. **INT. J. PHARM.** Vol. 1, 250-253, 2007
- CALICH, V. & VAZ, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2 ed., 543 p., 2001.
- CAMARGO, C. A., DA SILVA, M. E., DA SILVA, R. A., JUSTO, G. Z., GOMES-MARCONDES, M. C. & AOYAMA, H. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 406, 638-642, 2011.
- CAMARGO, C. A., GOMES-MARCONDES, M. C., WUTZKI, N. C. & AOYAMA, H. Naringin inhibits tumor growth and reduces interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels in rats with Walker 256 carcinosarcoma. **Anticancer Res**. Vol. 32, 129-133, 2012

- CAVALCANTI, I. L., GOZZANI, J. L., SAMPAIO FILHO, A. A., ALVES NETO, O. & GARCIA, J. B. S. **Dor Pós-Operatória Sociedade Brasileira de Anestesiologia**. Rio de Janeiro: SBA, 2004, 425p.
- CEREDA, C. M., BRUNETTO, G. B., DE ARAÚJO, D. R. & DE PAULA, E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can J Anaesth**. Vol.53, 1092-1097,2006.
- CHANDRASEKHARAN, N., DAI, H., ROOS, K., EVANSON, N., TOMSIK, J., ELTON, T. & SIMMONS, D. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Prod. Nat. Acad. Scienc. USA**, Vol.67, 13926-13931,2002
- CHEN, H. J., SHIH, C. K., HSU, H. Y. & CHIANG, W. Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay. **J Agric Food Chem**. Vol 58, 2596-601,2010.
- CHOI, S.J.; OH, J.M.; Park, T.; Choy J.H. Cellular Toxicity of inorganic Hydroxide Nanoparticles. **J. Nanosc. Nanotec**. Vol. 7, 4017-4020, 2007.
- CUNHA, V., FERREIRA, A., CONSTANTINO, V., TRONTO, J. & VALIM, J. Layered double hydroxides: inorganic nanoparticles for storage and release of species of biological and therapeutic interest. **Quimica Nova**, Vol.33, n.1, 159-171,2010
- CUNHA, V. R. R., CONSTANTINO, V. R. L. & ANDO, R. A. Raman spectroscopy and DFT calculations of para-coumaric acid and its deprotonated species. **Vibrat. Spect**. Vol. 58, 139-145,2012
- DAS, S., MANDAL, A. K., GHOSH, A., PANDA, S., DAS, N. & SARKAR, S. Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. **Curr Aging Sci**. Vol. 1, 169-74, 2008.
- DE ARAUJO, D. R., PADULA, C., CEREDA, C. M., TÓFOLI, G. R., BRITO, R. B., DE PAULA, E., NICOLI, S. & SANTI, P. Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo local anesthetic effect. **Pharm Res**. Vol. 27, 1677-86,2010
- DE MIRANDA, F., VILAR, J., ALVES, I., CAVALCANTI, S. & ANTONIOLLI, A. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellaneda* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacol**. Vol.1, 6-12, 2001.
- DE, P., BALTAS, M., LAMORAL-THEYS, D., BRUYÈRE, C., KISS, R., BEDOS-BELVAL, F. & SAFFON, N. Synthesis and anticancer activity evaluation of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines. **Bioorg Med Chem**. Vol. 18, 2537-2548, 2010.

- DEL ARCO, M., CEBADERA, E., GUTIÉRREZ, S., MARTÍN, C., MONTERO, M., RIVES, V., ROCHA, J. e SEVILLA, M. Mg,Al layered double hydroxides with intercalated indomethacin: synthesis, characterization, and pharmacological study. **J Pharm Sci.** Vol, 93, 1649-1658, 2004
- DEL ARCO, M., FERNÁNDEZ, A., MARTÍN, C., SAYALERO, M. L. & RIVES, V. Solubility and release of fenamates intercalated in layered double hydroxides. **Clay Minerals.** Vol. 43, 255-265, 2008
- DEL ARCO, M., FERNANDEZ, A., MARTIN, C. & RIVES, V. Intercalation of mefenamic and meclofenamic acid anions in hydrotalcite-like matrixes. **Applied Clay Science.** Vol. 33, n 1-3, 133-140, 2007.
- DEL ARCO, M., FERNANDEZ, A., MARTIN, C. & RIVES, V. Release studies of different NSAIDs encapsulated in Mg,Al,Fe-hydrotalcites. **Applied Clay Science.** Vol. 42, n.3-4, 538-544, 2009
- DUBUISSON, D. & DENNIS, S. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** Vol. 4, 161-74, 1977
- DUNDER, R. J. **Avaliação da atividade analgesica e antiinflamatória da fração hexâmica Agave Sisalana.** Campinas, SP.: Unicamp, 2009
- D'AMOUR, F., BLOOD, F. & BELDEN, J. **Manual for laboratory work in Mammalian Physiology.** Chicago: Chicago press, 1965
- FOLEY, K. M. & INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med Clin North Am.** Vol. 71, 207-32, 1987
- FOLWARCZNA, J., ZYCH, M., BURCZYK, J., TRZECIAK, H. & TRZECIAK, H. I. Effects of natural phenolic acids on the skeletal system of ovariectomized rats. **Planta Med.** Vol. 75, 1567-1572, 2009
- GAO, S. & HU, M. Bioavailability Challenges Associated with Development of Anti-Cancer Phenolics. **Mini Rev Med Chem.** Vol. 10, n.6, 550-567, 2010
- GARRAIT, G., JARRIGE, J. F., BLANQUET, S., BEYSSAC, E., CARDOT, J. M. & ALRIC, M. Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and p-coumaric acids in rats. **J Agric Food Chem** 54, 2944-50, 2006
- GAUTAM, R. & JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Med Res Rev.** Vol. 29, 767-820, 2009

- GOLDSBY, R. A. & ET.AL. Immunology. Inglaterra: W.H. Freeman and Company, 2ed., 2003, 765p.
- GORDIJO, C., BARBOSA, C., DA COSTA FERREIRA, A., CONSTANTINO, V. & DE OLIVEIRA SILVA, D. Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides. **J Pharm Sci.** Vol.94, 1135-1148, 2005.
- GRISWOLD, D., MARSHALL, P., WEBB, E., GODFREY, R., NEWTON, J., DIMARTINO, M., SARAU, H., GLEASON, J., POSTE, G. & HANNA, N. Sk+f-86002 - a structurally novel antiinflammatory agent that inhibits lipoxygenase-mediated and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic-acid. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 7, 3463-3470,1987
- GUGLIELMI, F., LUCERI, C., GIOVANNELLI, L., DOLARA, P. & LODOVICI, M. Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. **Br J Nutr.** Vol. 89, 581-587,2003
- GUHAGARKAR, S., MALSHE, V. & DEVARAJAN, P. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. **AAPS PHARMSCITECH.** Vol. 10, n.3, 935-942,2009
- HALESTRAP, A. P. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. **IUBMB Life.** Vol. 64, 1-9,2012
- HALESTRAP, A. P. & MEREDITH, D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond.**Pflugers Arch.** Vol. 447, 619-28,2004
- HARRIS R.C., BREYER M.D. Updates on cyclooxygenase-2 inhibitors. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** Vol. 1, 236-245, 2006.
- HUDSON, E. A., DINH, P. A., KOKUBUN, T., SIMMONDS, M. S. & GESCHER, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** Vol.9, 1163-1170,2000
- TRONTO, J. **Síntese e caracterização e estudo das propriedades de hidróxidos duplos lamelares intercalados com polímeros condutores.** São Paulo,SP. Universidade de São Paulo (USP),2006
- JANICKE, B., HEGARDT, C., KROGH, M., ONNING, G., AKESSON, B., CIRENAJWIS, H. M. & OREDSSON, S. M. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. **Nutr Cancer** Vol.63, 611-22,2011

- JANICKE, B., ONNING, G. & OREDSSON, S. M. Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. **J Agric Food Chem** Vol. 53, 6658-65, 2005.
- KHAN, A., LEI, L., NORQUIST, A. & O'HARE, D. Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide. **Chem Commun (Camb)**, 2342-2343, 2001.
- KING, T. C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 440p.
- KINI, R. M. & EVANS, H. J.. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**. Vol. 33, 1585-1590, 1995.
- KOBAYASHI, S. & KONISHI, Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 368, 23-29, 2008
- KONISHI, Y., KOBAYASHI, S. & SHIMIZU, M. Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. **Biosci Biotechnol Biochem**. Vol. 67, 2317-2324, 2003
- KUMMER, C.L. E COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestiol**. Vol. 52, n.4, 498-512, 2002.
- LEE, S. J., MUN, G. I., AN, S. M. & BOO, Y. C. Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid. **BMB Rep**. Vol. 42, 561-567, 2009.
- NELSON, D. N.; COX M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 4^aed, 2006, 1202p.
- LEONARDUZZI, G., TESTA, G., SOTTERO, B., GAMBA, P. & POLI, G. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. **Curr Med Chem**. Vol. 17, 74-95, 2010.
- LI, B., HE, J., EVANS, D. & DUAN, X. Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. **Int J Pharm**. Vol. 287, 89-95, 2004.
- LI, S. Influence of temperature on the formation of Tyr/LDH nanohybrids. **ACTA CHIMICA SINICA**. Vol. 64, n. 23, 2301-2304, 2006

- LI, Y., LIU, D., AI, H., CHANG, Q., XIA, Y., LIU, S., PENG, N., XI, Z. & YANG, X. Biological evaluation of layered double hydroxides as efficient drug vehicles. **Nanotechnology**. Vol. 21,n. 10, 1-13,2010.
- LIMA, Flavia Oliveira. **Envolvimento dos receptores periféricos de adenosina na hipernocicepção inflamatória**.2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- LODOVICI, M., CALDINI, S., MORBIDELLI, L., AKPAN, V., ZICHE, M. & DOLARA, P. Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. **Toxicology**. Vol. 255, 1-5,2009.
- LOFTSSON, T. & DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int J Pharm**. Vol. 329, 1-11,2007.
- LUCERI, C., GIANNINI, L., LODOVICI, M., ANTONUCCI, E., ABBATE, R., MASINI, E. & DOLARA, P. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **Br J Nutr**. Vol. 97, 458-63, 2007.
- LUCERI, C., GUGLIELMI, F., LODOVICI, M., GIANNINI, L., MESSERINI, L. & DOLARA, P. Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. **Scand J Gastroenterol**. Vol. 39, 1128-33, 2004.
- MADA, S., METUKURI, M., BURUGULA, L., REDDANNA, P. & KRISHNA, D. Antiinflammatory and antinociceptive activities of gossypin and procumbentin--cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition studies. **Phytother Res**. Vol. 23, 878-84,2009
- MAHUGO SANTANA, C., SOSA FERRERA, Z., ESTHER TORRES PADRÓN, M. & JUAN SANTANA RODRÍGUEZ, J. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. **Molecules** Vol. 14, 298-320,2009.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C. & JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**. Vol.79, 727-47,2004.
- MAPHOSA, V., MASIKA, P. J. & MOYO, B. Investigation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of Elephantorrhiza elephantina (Burch.) Skeels root extract in male rats. **African Journal of Biotechnology** Vol. 8, 7068-7072,2009.
- MCCULLOCH, C. A., DOWNEY, G. P. & EL-GABALAWY, H. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. **Nat Rev Drug Discov**. Vol. 5, 864-76, 2006.

- MURAKAMI, A. & OHIGASHI, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. **Internat. J. Cancer**. Vol. 121, n. 11 2357-2363, 2007.
- MURPHY, K. *Imunobiologia*. Poto alegre: Artmed, 7 ed., 2010, 908p.
- NAGAI, H. Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases. **Allergol Int**. Vol. 57, 187-96, 2008
- NESS, T. J. & GEBHART, G. F. Centrifugal modulation of the rat tail flick reflex evoked by graded noxious heating of the tail. **Brain Res**. Vol. 386, 41-52, 1986.
- NEUDÖRFFER, A., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., LEGRAND, A., FLEURY, M. B. & LARGERON, M. 4-hydroxycinnamic ethyl ester derivatives and related dehydrodimers: Relationship between oxidation potential and protective effects against oxidation of low-density lipoproteins. **J Agric Food Chem**. Vol. 52, 2084-2091, 2004.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**. Vol. 75, 311-35, 2012.
- NI, Z., XING, F., WANG, P. & CAO, G. Synthesis, characterization and release of curcumin-intercalated Mg-Al-layered double hydroxides (Retracted article. See vol. 47, pg. 469, 2010). **Apply. Clay Sci.**, Vol. 40, n.1-4, 72-80, 2008
- OLIVEIRA, C. Z. **Caracterização funcional e estrutural de inibidores de fosfolipase A₂ isoladas do plasma de serpentes Bothrops jararacussu**. Ribeirão Preto, SP.: Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto, 2009
- OIVEIRA, D. M., BASTOS D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quim. Nova** Vol. 34, n. 6, 1051-56, 2011
- OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Crit Rev Neurobiol**. Vol. 5, 265-311, 1990.
- PARVEEN, Z., DENG, Y., SAEED, M., DAI, R., AHAMAD, W. & YU, Y. Antiinflammatory and analgesic activities of thesium chinense turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yaku. Zasshi-Journal Pharm. Society Japan**. Vol. 127, n. 8, 1275-1279, 2007
- RANG, H., DALE, M. & RITTER, J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 5ªed., 2003, 901.

- REISINE, T., LAW, S. F., BLAKE, A. & TALLENT, M. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. NY. Acad. Sci.** Vol. 780, 168-75,1996.
- SANVICENS, N. & MARCO, M. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. **Trends in biotech.** Vol. 26, n.8 425-433, 2008.
- SAKURAI M., OISHI K., WATANABE K. Localization of cyclooxygenase-1 and -2, and prostaglandin F synthase in human kidney and renal cell carcinoma. Vol. 338, 82-86, 2005.
- SCHNITZLER, P., NEUNER, A., NOLKEMPER, S., ZUNDEL, C., NOWACK, H., SENSCH, K. H. & REICHLING, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytother Res.** Vol. 24, n. 1, 20-28,2010.
- SEO, Y. K., KIM, S. J., BOO, Y. C., BAEK, J. H., LEE, S. H. & KOH, J. S. Effects of p-coumaric acid on erythema and pigmentation of human skin exposed to ultraviolet radiation. **Clin Exp Dermatol** Vol. 36, 260-266, 2011.
- SHI, Y., DAI, J., LIU, H., LI, R., SUN, P., DU, Q., PANG, L., CHEN, Z. & YIN, K. (2009). Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappa B activity in a murine model of asthma. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** Vol. 87, n. 9, 729-735, 2009.
- SILION, M., HRITCU, D., JABA, I. M., TAMBA, B., IONESCU, D., MUNGIU, O. C. & POPA, I. M. In vitro and in vivo behavior of ketoprofen intercalated into layered double hydroxides. **J Mater Sci Mater Med.** Vol. 21, 3009-3018, 2010.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis: UFRGS, 2007.
- SMITH, R. J. Therapies for rheumatoid arthritis: hope springs eternal. **Drug Discov Today** Vol.10, 1598-1606,2005
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes.**Rev. Nutr.** p. 71-81,2002.
- SONG, K., AN, S. M., KIM, M., KOH, J. S. & BOO, Y. C. Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeabilities. **J Dermatol Sci.** Vol. 63, 17-22,2011.
- STEIN, C., HASSAN, A. H., PRZEWŁOCKI, R., GRAMSCH, C., PETER, K. & HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory

- nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc Natl Acad Sci USA** Vol. 87, 5935-5939,1990.
- STEIN, C., MILLAN, M. J., SHIPPENBERG, T. S., PETER, K. & HERZ, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **J Pharmacol Exp Ther.** Vol. 248, 1269-1275,1989
- STITES D.P., T. A. I., PARSLow T.G. **Imunologia médica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, 245p.
- TAMMARO, L., COSTANTINO, U., BOLOGNESE, A., SAMMARTINO, G., MARENZI, G., CALIGNANO, A., TETÈ, S., MASTRANGELO, F., CALIFANO, L. & VITTORIA, V. Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications. **Int J Antimicrob Agents** Vol. 29, 417-23, 2007.
- TEIXEIRA-NETO, A., SHIGUIHARA, A., IZUMI, C., BIZETO, M., LEROUX, F., TEMPERINI, M. & CONSTANTINO, V. A hybrid material assembled by anthocyanins from açai fruit intercalated between niobium lamellar oxide. **Dalton Trans**, Vol.21, 4136-4145,.2009
- TRONTO, J. **Síntese e caracterização e estudo das propriedades de hidróxidos duplos lamelares intercalados com polímeros condutores.** São Paulo,SP.: Universidade de São Paulo (USP),2006.
- TSAI, Y., LEE, K., HUANG, Y., HUANG, C. & WU, P. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **Int. J. Pharm.** Vol. 388, n. 1-2, 257-262,2010
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol.** Vol. 231, 232-235,1971.
- VANE, S. J. Differential inhibition of cyclooxygenase isoforms: an explanation of the action of NSAIDs. **J Clin Rheumatol** Vol. 4, 3-10,1998.
- VAUZOUR, D., CORONA, G. & SPENCER, J. P. (2010). Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. **Arch Biochem Biophys.** Vol. 501, 106-111, 2010.
- VISERAS, C., CERREZO, P., SANCHEZ, R., SALCEDO, I. & AGUZZI, C. Current challenges in clay minerals for drug delivery. **Applied Clay Science** Vol. 48, 291-295, 2010.
- WANG, L., TU, Y., LIAN, T., HUNG, J., YEN, J. & WU, M. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. **J Agric Food Chem.** Vol. 54, 9798-9804, 2006.

- WATANABE, H., YASHIRO, T., TOHJO, Y. & KONISHI, Y. Non-involvement of the human monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) in the transport of phenolic acid. **Biosci Biotechnol Biochem.** Vol. 70, 1928-1933, 2006.
- WEI, M., PU, M., GUO, J., HAN, J., LI, F., HE, J., EVANS, D. & DUAN, X. Intercalation of L-Dopa into Layered Double Hydroxides: Enhancement of Both Chemical and Stereochemical Stabilities of a Drug through Host-Guest Interactions. *Chem. Mater.* Vol. 20, n. 16, 5169-5180, 2008.
- WILLOUGHBY, D., MOORE, A. & COLVILLE-NASH, P. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **LANCET.** Vol. 355, n. 9204, 646-648, 2000.
- WOOLF, A. D. & PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bull World Health Organ.** Vol. 81, 646-656, 2003
- XIA, S., NI, Z., XU, Q., HU, B. & HU, J. Layered double hydroxides as supports for intercalation and sustained release of anti hypertensive drugs. **J. Solid State Chem.** Vol. 181, n.10 2610-2619, 2008.
- YAMAGUCHI, M., LAI, Y. L., UCHIYAMA, S. & NAKAGAWA, T. (2008). Oral administration of phytochemical p-hydroxycinnamic acid prevents bone loss in ovariectomized rats. **Mol Cell Biochem.** Vol. 311, 31-36, 2008
- YASOJIMA K., SCHWAB C., MCGEER E.G. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. **Brain Res.** Vol. 830, 226-236, 1999
- YONATHAN, M., ASRES, K., ASSEFA, A. & BUCAR, F. In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. **J. Ethnopharmacol** Vol.108, 462-70, 2006.
- ZIDAR N., DONLE-STRAZAR Z., JERUC J., ZUNPAC T., STAJER D. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the normal human heart and in myocardial infarction. **Cardiovasc. Pathol.** Vol. 16, 300-304, 2007
- ZIDAR N., ODAR K., GLAVAC D., JERSE M., ZUNPAC T., STAJER D. Cyclooxygenase in normal human tissues - is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **J.Cell. Mol. Med.** Vol. 13, n.9B, 3753-3763, 2009.
- ZYCH, M., FOLWARCZNA, J. & TRZECIAK, H. I. Natural phenolic acids may increase serum estradiol level in ovariectomized rats. **Acta Biochim Pol.** Vol. 56, 503-507, 2009.

VII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

1. Resumos Publicados em Anais de Congresso

Stoco, SM ; Grillo, R. ; de Mello, NFS ; **Guilherme, V. A.** ; Franz-Montan, M. ; Tofoli, G. R. ; Fraceto, Leonardo Fernandes ; Paula, Eneida de ; de Araujo, D. R. . ROPIVACAINE GEL FOR TOPICAL ANESTHESIA: IN VITRO PERMEATION SKIN AND CYTOTOXIC EFFECTS. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto, 2010.

Cunha V.R.R. **Guilherme V.A.** de Paula E. de Araujo D.R. and Constantino V.R.L. LAYERED DOUBLE HYDROXIDE AS A CARRIER OF AN ANTI-INFLAMMATORY DRUG. XVIII International Conference on Bioencapsulation, Porto, Portugal, October 1-2, 2010.

de Mello, NFS ; GRILLO, R. ; **GUILHERME, V. A.** ; ARAUJO, D.R. ; PAULA, Eneida de ; Rosa, AH ; Lima, R ; FRACETO, Leonardo Fernandes . POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) NANOCAPSULES CONTAINING BENZOCAINE: INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF THE OILY NUCLEOUS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ANESTHETIC ACTIVITY. In: Particles 2011: stimuli responsive particles and particle assemblies, 2011, Berlin. Particles 2011: stimuli responsive particles and particle assemblies, 2011. p. 49-50.

Guilherme, V.A., Cunha V.R.R., Constantino V.R.L., de Paula E., de Araujo D.R. EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF MORIN, COUMÁRICO ACID, LIPOIC ACID AND MEFENAMIC ACID COMPLEXED WITH LAYERED DOUBLE HYDROXIDES INORGANIC NANOPARTICLES. 1º Workshop do programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular (BFM), Campinas, Brasil, Junho 30-Julho 1, 2011.

Guilherme, V.A., Cunha V.R.R., Constantino V.R.L., de Paula E., de Araujo D.R. IN VITRO RELEASE AND PHARMACEUTICAL EVALUATION OF COUMARIC ACID IN LAYRED DOUBLE HYDROXIDE. South-Ameerican Symposium on microencapsulation, Limeira, Brasil, Abrill 30- Maio 2, 2012

2. Artigo completos publicados em periódico:

de Melo, Nathalie Ferreira Silva ; Grillo, Renato ; **Guilherme, Viviane Aparecida** ; de Araujo, Daniele Ribeiro ; Paula, Eneida ; Rosa, André Henrique ; Fraceto, Leonardo Fernandes . POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) NANOCAPSULES CONTAINING BENZOCAINE: INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF THE OILY NUCLEUS ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ANESTHETIC ACTIVITY. Pharmaceutical Research, v. 28, p. 1984-1994, 2011.

3. Artigos submetidos para publicação

Campos, Estefânia ;de Melo, Nathalie Ferreira Silva ; **Guilherme, Viviane Aparecida** ; de Araujo, Daniele Ribeiro ; Paula, Eneida ; Rosa, André Henrique ; Fraceto, Leonardo Fernandes .PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(E-CAPROLACTONE) NANOSPHERES CONTAINING THE LOCAL ANESTHETIC LIDOCAINE. Pharmaceutical Research, 2012.

4. Trabalho técnico

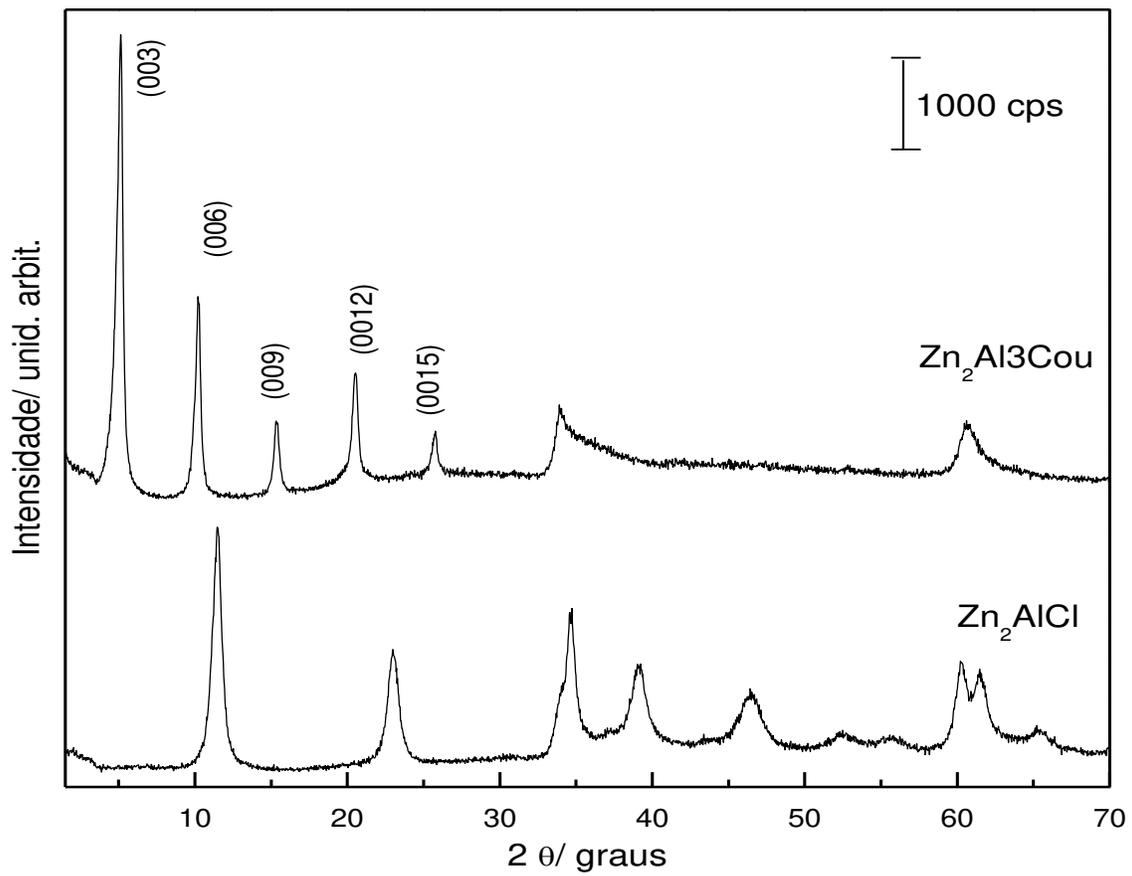
Convênio Takeda/Nycomed- SAE Pesquisa empresa, 2012

5. Atividades didáticas

Programa de estágio docente- PED, (grupo C), no primeiro período letivo de 2012, com dedicação de 8 horas semanais, nas atividades da disciplina BB123-A – Bioquímica Básica, Sob supervisão da Professora Doutora Eneida de Paula –IB-UNICAMP.

VIII. ANEXOS

1



Anexo 1: Difratomogramas de raios X dos materiais Zn_2AlCl e Zn_2Al_3Cou . Imagem cedida pela doutoranda Vanessa Roberta Cunha.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

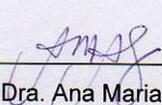
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2135-1, sobre "Avaliação da citotoxicidade e da atividade analgésica-antiinflamatória de flavonóides em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares – teste de tail flick", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo / Viviane Aparecida Guilherme, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

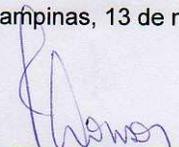
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2135-1, entitled "Citotoxicity and analgesic-antiinflammatory activity evaluation of layered double hydroxides containing flavonoids - tail flick test", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

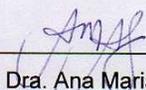
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2134-1, sobre "Avaliação da citotoxicidade e da atividade analgésica-antiinflamatória de flavonóides em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares - contorções abdominais", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo / Viviane Aparecida Guilherme, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

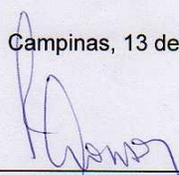
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2134-1, entitled "Citotoxicity and analgesic-antiinflammatory activity evaluation of layered double hydroxides containing flavonoids - writhing test", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



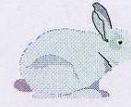
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

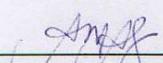
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2133-1, sobre "**Avaliação da citotoxicidade e da atividade analgésica-antiinflamatória de flavonóides em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares - teste da formalina**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo / Viviane Aparecida Guilherme**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

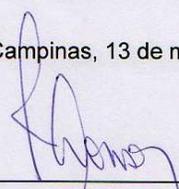
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2133-1, entitled "**Citotoxicity and analgesic-antiinflammatory activity evaluation of layered double hydroxides containing flavonoids - formalin test**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

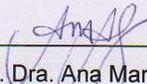
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2136-1, sobre "Avaliação da citotoxicidade e da atividade analgésica-antiinflamatória de flavonóides em nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares - inflamação peritoneal", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo / Viviane Aparecida Guilherme, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 03 de maio de 2010.

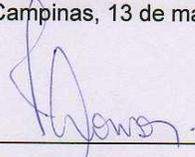
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2136-1, entitled "Citotoxicity and analgesic-antiinflammatory activity evaluation of layered double hydroxides containing flavonoids - peritoneal inflammation", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>