



## **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Associação Ampla entre a  
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



### **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA, CASEÍNA E ALBUMINA.**

Mestrando: Marcio Barbieri

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Guarapuava

2019

**MARCIO BARBIERI**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA, CASEÍNA E ALBUMINA.**

Defesa apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Guarapuava

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, minha família e namorada, pelo apoio e amor incondicionais.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar luz e guiar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Renei e Rosangela pelos conselhos e apoio constante.

A minha namorada Anelize Kloster Veiga, por todo o amor dedicado.

Ao Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil e a Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes pela oportunidade, orientação, confiança e por compreender que a depressão por muitas vezes me limitou nos trabalhos.

Aos meus amigos de laboratório do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas pela ajuda constante no planejamento e execução de experimentos.

A CAPES, pelo auxílio com a bolsa de estudos.

*“O amor é uma maldição abençoada”*

*“Brandon Boyd”*

## RESUMO

Nas últimas décadas, a tecnologia farmacêutica tem buscado estratégias para desenvolver sistemas carreadores inovadores de fármacos visando o aprimoramento do valor terapêutico, considerando principalmente, a redução da toxicidade, e aumento da biodisponibilidade de diversos compostos utilizados na clínica médica. O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados apresenta propriedades físico-químicas interessantes, como proteção do fármaco encapsulado e liberação progressiva e controlada do composto. A avaliação das nanopartículas (NPs) carregadas, em termos biológicos, envolve a avaliação de ensaios, por exemplo, antioxidantes, antifúngicos, citotóxicos sobre linhagens normais e tumorais, além de outras análises. Os ensaios antioxidantes, antifúngicos e citotóxicos são realizados em sistemas nanoestruturados, devido às diversas formulações obtidas, por exemplo, utilizando produtos naturais e fármacos como a anfotericina B e voriconazol, respectivamente. Também, esse mesmo raciocínio é válido para os fármacos antitumorais, que são preconizados como interessantes compostos para encapsulamento em nanopartículas, devido a sua toxicidade sobre células normais e limitadas vias de administração. Contudo, devido a esses ensaios estarem sob a influência não só dos compostos de interesse, no caso antioxidantes, antitumorais e antifúngicos, mas também dos polímeros que os compõem o sistema, é importante avaliar o efeito das nanopartículas vazias. Dessa forma, este trabalho visou o desenvolvimento de NPs de albumina (BSA), caseína (CSNA) e zeína (ZNA), a fim de verificar seus possíveis efeitos sobre sistemas antioxidantes, antifúngico e citotoxicidade. As nanopartículas de albumina (NPS-BSA) e caseína (NPS-CSNA) foram desenvolvidas pela técnica de coacervação e as nanopartículas de zeína (NPS-ZNA) pelo método dispersão líquido-líquido. As NPS-BSA obtidas apresentaram diâmetro médio de  $358 \pm 24$  nm, índice de polidispersão  $0,202 \pm 0,078$ , potencial zeta  $-14,6 \pm 1,97$ , as NPS-CSNA diâmetro médio  $333,4 \pm 26,3$  nm, índice de polidispersão  $0,280 \pm 0,03$ , potencial zeta  $-17,7 \pm 1,04$ , e as NPS-ZNA apresentaram diâmetro médio  $197,7 \pm 2,9$  nm, índice de polidispersão  $0,173 \pm 0,07$  e potencial zeta  $-32,5 \pm 4,28$ . A análise morfológica revelou que as nanopartículas NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA possuem formato esférico e liso. A aplicabilidade das NPs foi avaliada frente ao potencial antioxidante de inibição do 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido hipocloroso (HOCl). Os resultados da atividade antioxidante das NPS-BSA,

NPS-CSNA e NPS-ZNA mostram capacidade sequestrante sobre radical ABTS<sup>•+</sup> e HOCl, porém não ao radical DPPH. O estudo antifúngico mostrou que as NPS-ZNA tem efeito no crescimento de unidade formadora de colônia, exibindo atividade superior quando comparadas as NPS-BSA e NPS-CSNA. O ensaio citotóxico, sobre células Hep2, mostrou que apenas as NPS-ZNA exerceram atividade significativa sobre esse sistema. Dessa maneira, pode-se concluir que as NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA obtiveram um perfil físico-químico adequado, com a possibilidade de carreamento, com baixa interferência entre polímero e possível composto encapsulado, e que exercem influência nos ensaios antioxidantes, antifúngicos e de citotoxicidade, dependendo da nanopartícula utilizada e de sua concentração, demonstrando a importância das análises dos sistemas nanoestruturados vazios em ensaios biológicos.

**Palavras chave:** Albumina sérica bovina, caseína, zeína, antioxidante.

## ABSTRACT

In recent decades, pharmaceutical technology has sought strategies to develop innovative drug delivery systems aimed at improving therapeutic value, mainly considering the reduction of toxicity and increased bioavailability of various compounds used in the medical clinic. The development of nanostructured systems has interesting physicochemical properties, such as protection of the encapsulated drug and progressive and controlled release of the compound. The evaluation of biologically loaded nanoparticles (NPs) involves the evaluation of assays, for example, antioxidants, antifungal, cytotoxic on normal and tumor lineages, in addition to other analyzes. Antioxidant, antifungal and cytotoxic assays are performed in nanostructured systems, due to the various formulations obtained, for example, using natural products and drugs such as amphotericin B and voriconazole, respectively. Also, this same rationale is valid for antitumor drugs, which are advocated as interesting compounds for encapsulation in nanoparticles, due to their toxicity on normal cells and limited routes of administration. However, because these assays are under the influence not only of the compounds of interest, in the case of antioxidants, antitumor and antifungals, but also of the polymers composing the system, it is important to evaluate the effect of the empty nanoparticles. Thus, this work aimed at the development of NPs of albumin (BSA), casein (CSNA) and zein (ZNA), in order to verify its possible effects on antioxidant, antifungal and cytotoxic systems. The albumin nanoparticles (NPS-BSA) and casein (NPS-CSNA) were developed by the coacervation technique and zein nanoparticles (NPS-ZNA) by the liquid-liquid dispersion method. The NPS-BSA obtained had a mean diameter of  $358 \pm 24$  nm, polydispersity index  $0.202 \pm 0.078$ , zeta potential  $-14.6 \pm 1.97$ , NPS-CSNA mean diameter  $333.4 \pm 26.3$  nm, polydispersity index  $0.280 \pm 0.03$ , zeta potential  $-17.7 \pm 1.04$ , and NPS-ZNA had mean diameter  $197.7 \pm 2.9$  nm, polydispersion index  $0.173 \pm 0.07$  and zeta potential  $-32.5 \pm 4.28$ . The morphological analysis revealed that the NPS-BSA, NPS-CSNA and NPS-ZNA nanoparticles have a spherical and smooth shape. The applicability of NPs was evaluated against the antioxidant potential of 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazila (DPPH) and hypochlorous acid (HOCl). The results of the antioxidant activity of NPS-BSA, NPS-CSNA and NPS-ZNA show sequestering ability on ABTS  $\cdot$  + and HOCl radical, but not on the DPPH radical. The antifungal study showed that NPS-ZNA has an effect on colony-forming unit growth, exhibiting superior activity when compared to NPS-BSA and NPS-CSNA. The cytotoxic assay on Hep2 cells showed that only NPS-ZNA exerted significant activity on this system. In this way, it can be concluded that the NPS-BSA, NPS-CSNA and NPS-ZNA obtained an adequate physical-chemical profile, with the possibility of carrying, with low interference between polymer and possible encapsulated compound, and that exert influence in the tests antioxidants, antifungal and cytotoxicity, depending on the nanoparticles used and their concentration, demonstrating the importance of the analysis of empty nanostructured systems in biological assays.



**Key words:** bovine serum albumin, casein, zein, antioxidant.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 3  |
| 2.1 CÂNCER .....   | 3  |
| 2.2 NANOTECNOLOGIA .....   | 4  |
| 2.2.2 Nanopartículas proteicas .....   | 5  |
| 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO (EO) .....  | 7  |
| 2.3.1 Radicais livres .....  | 7  |
| 2.3.2 Espécies reativas de oxigênio.....   | 8  |
| 2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....  | 9  |
| 2.5 CITOTOXICIDADE` .....  | 10 |
| 2.6 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....                                  | 11 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 13 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....   | 13 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 13 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 14 |
| 4.1 REAGENTES.....   | 14 |
| 4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....   | 16 |
| 4.3 METODOLOGIA.....   | 17 |
| 4.3.1 Preparação das NPS-BSA.....  | 17 |
| 4.3.2 Preparação das NPS-CSNA. ....  | 18 |
| 4.3.3 Preparação das NPS-ZNA.....  | 20 |
| 4.3.4 Caracterização de nanopartículas .....                                     | 22 |
| 4.3.5 Análise de proteínas totais, Micro Lowry, com modificação de Peterson..... | 23 |
| 4.3.6 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....                  | 23 |
| 4.3.7 Avaliação da atividade antifúngica.....                                    | 25 |
| 4.3.8 Ensaio de Citotoxicidade .....   | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....  | 27 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA .....   | 27 |
| 5.1.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão .....                             | 27 |
| 5.1.2 Potencial zeta .....   | 31 |
| 5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo .....             | 32 |
| 6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....                                  | 35 |

|   |    |
|---|----|
| 6.1 CAPTURA DO RADICAL ABTS <sup>•+</sup> ..... | 35 |
| 6.2 CAPTURA DO RADICAL DPPH .....               | 38 |
| 6.3 INIBIÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl) .....  | 40 |
| 7. ATIVIDADE ANTI FUNGICA <i>IN VITRO</i> ..... | 41 |
| 8. ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> .....   | 43 |
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                    | 47 |
| 10. CONCLUSÕES.....                             | 48 |
| REFERÊNCIAS.....                                | 49 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Metástase .....   | 3  |
| Figura 2: formação de radicais livres e ação antioxidante.....  | 7  |
| Figura 3: espécies reativas de oxigênio.....  | 8  |
| Figura 4: Processo de obtenção de NPs de albumina pelo método de coacervação.....   | 18 |
| Figura 5: Processo de obtenção de nanopartículas de caseína pelo método de coacervação.<br>.....  | 19 |
| Figura 6: Processo de obtenção de nanopartículas de zeína pelo método de dispersão<br>líquido-líquido.....  | 21 |
| Figura 7: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-BSA (Diâmetro<br>médio da amostra de 358 nm, IPD 0,202, onde 100% das partículas encontram-se com<br>diâmetro entre 352 a 364nm) .....  | 28 |
| Figura 8: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-CSNA (Diâmetro<br>médio da amostra de 333,4 nm, IPD 0,280, onde 29% das partículas encontram-se com<br>diâmetro entre 59 a 98nm e 71% entre 245 a 683nm).....                                 | 29 |
| Figura 9: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-ZNA (Diâmetro<br>médio da amostra de 197,7 nm, IPD 0,173, onde 9% das partículas encontram-se com<br>diâmetro entre 59 a 70nm e 91% entre 182 a 244nm).....                                   | 30 |
| Figura 10: Micrografias das NPS-BSA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 50.000 X.....  | 33 |
| Figura 11: Micrografias das NPS-CSNA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 50.000 .....  | 34 |
| Figura 12: Micrografias das NPS-ZNA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 75.000 X e<br>B)15.000 X.....  | 34 |
| Figura 13: Atividade antifúngica de variadas concentrações de NPS-BSA, NPS-CSNA e<br>NPS-ZNA, comparação com a AmB e controles positivo, negativo e solventes sobre a cepa<br>de Candida albicans Vitroids TM 0546, após plaqueamento em ágar Sabouraud-dextrose. ... | 43 |
| Figura 14: Efeito calorimétrico a partir da redução de MTT a formazana .....  | 44 |
| Figura 15: Atividade citotóxica em porcentagem de viabilidade celular das NPS-ZNA, NPS-<br>CSNA E NPS-BSA frente à linhagem celular HÉp-2 por 24 horas.....   | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-BSA.....  | 28 |
| Tabela 2: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-CSNA. ....  | 29 |
| Tabela 3: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-ZNA. ....   | 31 |
| Tabela 4: formulação e potencial zeta das NPS-ZNA, NPS-CSNA e NPS-BSA .....  | 32 |
| Tabela 5: Porcentagem de inibição do radical ABTS <sup>•+</sup> pelas nanopartículas em tampão<br>fosfato salino (50 mM, pH 7,4), na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda$ = 734nm).....  | 36 |
| Tabela 6: Média da absorvância das nanopartículas sobre o radical DPPH em etanol 99,5%<br>na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda$ = 517nm) (média $\pm$ DP). ....  | 39 |
| Tabela 7: Média da absorvância de inibição do ácido hipocloroso HOCl pelas nanopartículas<br>com revelador (3,3',5',5' - Tetrametilbenzidina) TMB, nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20<br>$\mu$ g/mL na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda$ = 652nm). .... | 40 |
| Tabela 8: Efeito antifúngico de variadas concentrações de NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-<br>ZNA, e comparativo da AmB livre sobre a cepa de Candida albicans Vitroids TM 0546 .....  | 42 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ABTS                          | 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).         |
| AmB                           | Anfotericina B   |
| BSA                           | Albumina Sérica Bovina   |
| HSA                           | Albumina Sérica Humana   |
| CAM                           | Medicina Alternativa Complementar                                |
| CIM                           | Concentração mínima inibitória                                   |
| CSA                           | Caseína  |
| DLS                           | <i>Dynamic Light Scattering</i>                                  |
| DPPH                          | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila                                   |
| EO                            | Estresse Oxidativo   |
| EROs                          | Espécies reativas de oxigênio                                    |
| FDA                           | <i>Food and Drug Administration</i>                              |
| H                             | Hidrogênio   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrogênio   |
| HCl                           | Ácido Clorídrico   |
| HOCl                          | Ácido Hipocloroso  |
| IPD                           | Índice de Polidispersão  |
| MEV                           | Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo         |
| MTT                           | Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil )-2,5-difenil-2H-tetrazólio |
| FEG                           | <i>Field Emission Electron Guns</i>                              |
| nm                            | Nanômetros   |
| NaClO                         | Hipoclorito de Sódio   |
| NPs                           | Nanopartículas   |
| NPS-BSA                       | Nanopartículas de Albumina                                       |
| NPS-CSNA                      | Nanopartículas de Caseína  |
| NPS-ZNA                       | Nanopartículas de Zeína  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Radical superóxido   |
| OH <sup>-</sup>               | Radical Hidroxila  |
| OMS                           | Organização Mundial da Saúde                                     |
| OVA                           | Ovalbumina   |
| PBS                           | Tampão Fosfato de Sódio  |
| PZ                            | Potencial Zeta   |

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| RL  | Radicais livres               |
| rpm | Rotação por minuto            |
| SOD | Superóxido Dismutase          |
| TMB | 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina |
| TPP | Tripolifosfato de Sódio       |
| UFC | Unidade formadora de colônia  |

## 1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres (RL) são espécies químicas reativas que possuem um átomo com um elétron não emparelhado, em sua órbita externa. Essa condição gera instabilidade química e cinética, e para que se mantenha a estabilidade é necessário retirar um elétron de outra molécula. Os RL desencadeiam o estresse oxidativo (EO), processo que gera danos celulares e alterações em proteínas (LILIAN et al., 2004). O EO resulta na peroxidação de ácidos graxos que constituem a dupla camada lipídica, levando a morte celular. Para combater os efeitos causados pelo EO o corpo humano usa um mecanismo chamado de antioxidantes, constituídos por enzimas, vitaminas e agentes quelantes de íons metálicos (KWON et al., 2013). O excesso de produção de EO ao longo do tempo tem sido implicado em condições debilitantes, como câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças crônicas do processo inflamatório (VURAL et al., 2005). Portanto, a busca por alternativas de tratamento para este dano tem sido um dos focos da indústria farmacêutica.

Porém, a maioria dos compostos antioxidantes possuem limitações físico-químicas, como por exemplo, baixa solubilidade e estabilidade em soluções fisiológicas (RODRIGUES et al., 2016). Nesse sentido, a nanotecnologia vem sendo empregada no carregamento de compostos para tratamento de várias doenças, como moléculas com capacidade antioxidante (GANTA et al., 2008). Polímeros naturais como a zeína (ZNA), caseína (CSNA) e a albumina (BSA) tem sido utilizados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, tanto em NPs proteicas, como em NPs poliméricas, dendrímeros, entre outros (SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Para o desenvolvimento de NPs tem-se utilizado a ZNA, um polímero natural derivada do milho, que é constituída de 80% de conteúdo proteico; proteínas como glutelina, globulina e prolamina, que se encontram localizadas na região do endosperma da semente (TAYLOR; CHA; CHINNAN, 2010). A ZNA é versátil, e vem sendo utilizada em aplicações no uso de fibras, adesivos, revestimentos, cerâmicas, tintas, cosméticos e plásticos biodegradáveis. Na



área farmacêutica é usada na fabricação de NPs, geralmente associada à outra proteína, como por exemplo, a Caseína (CSNA) (LI et al., 2012)

A proteína do leite consiste em 80% de CSNA e 20% de soro de leite, a CSNA tem quatro subtipos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ . A CSNA  $\alpha$ , consiste de um subgrupo: caseínas  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -, que formam a principal fração de proteína do leite (PARK et al., 2014). A CSNA apresenta uma característica anfipática com interações moleculares hidrofóbicas e hidrofílicas, em meio biológico sua principal função é o transporte de fosfato de cálcio e proteína (ZIMET; ROSENBERG; LIVNEY, 2011).

A albumina é uma proteína abundante e pode ser encontrado em diferentes formas, como albumina sérica humana (HSA) presente no plasma sanguíneo; albumina sérica bovina (BSA) e como ovalbumina (OVA) encontrada na clara do ovo (PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011; RUTENBERG; VINOGRADOV; AVNIR, 2013). É uma proteína não tóxica e biodegradável, e apresenta propriedades de interação com a massa tumoral, sendo com isso uma das proteínas mais utilizadas para o carreamento de compostos para liberação em órgãos específicos (PRESS, 2010).

Desse modo, as formulações de NPs proteicas tem se tornado um sistema viável, devido seu baixo custo de produção, tornando-se uma alternativa para a diminuição de efeitos tóxicos e melhora no carreamento de medicamentos, atuando no campo biomédico no tratamento de doenças como diabetes e câncer (NITTA; NUMATA, 2013).

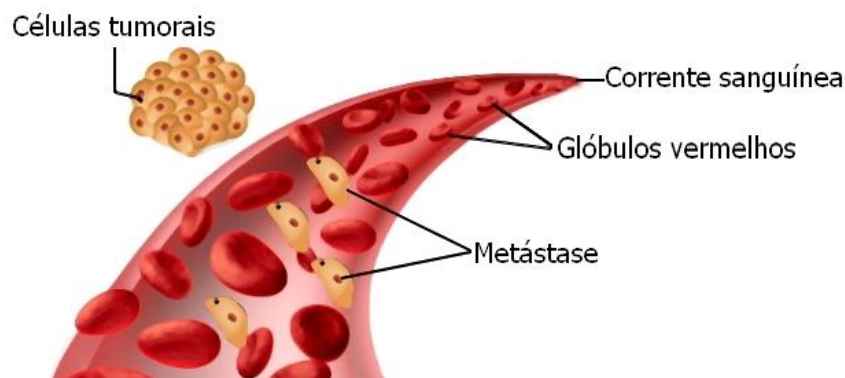
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é definido como um conjunto de doenças e/ou processos fisiopatológicos em que ocorre o desenvolvimento e propagação de células anormais no organismo. Vários fatores podem induzir o câncer, como o tabaco, alimentação, mutações genéticas, radiações e alteração hormonal. No corpo humano as células tem seu período de vida e morte, seguindo um ciclo natural (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). O câncer acontece quando esse ciclo sofre uma anormalidade, modificando os genes de uma célula, levando a formação de células tumorais. Com essa desordem o sistema imunológico fica incapaz de controlar e reparar células novas, gerando cada vez mais células anormais (INCA, 2008).

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) também induzem a modificação celular por estímulos endógenos ou exógenos. Agem atacando os fosfolipídios, através de reativos secundários, com capacidade de inibir a reparação do DNA, fazendo com que ocorram mutações (RUMYANTSEV, 2010; TARLOVSKY, 2013). Essas alterações levam a formação de células anormais que podem desenvolver metástase, deslocando-se de seu local de origem através da corrente sanguínea ou do sistema linfático e atingindo outro tecido, através da permeabilização do interstício e parênquima. Esta ação é responsável por 90% das mortes envolvendo o câncer (ZHOU; BENNETT; ZHOU, 2016).

**Figura 1:** Metástase



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2019)

Para que haja possibilidade de tratamento é necessário classificar o tipo de “estágio do câncer”, esse termo é utilizado para retratar as condições do paciente e da doença. Os recursos terapêuticos para o câncer envolvem cirurgia, tratamento hormonal, antioxidativo e sessões de quimioterapia ou radiologia (INCA, 2008). Em conjunto com os medicamentos que podem ser utilizados para reduzir os problemas causados pelo câncer, há a medicina alternativa complementar (CAM) que visa o bem estar do paciente através de práticas naturais, usada para minimizar os efeitos causados pelo tratamento (TABATABAEE et al., 2016).

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer está caracterizado como um problema de saúde pública. Estima-se que até 2025 20 milhões de novos casos irão surgir, atingindo em sua grande maioria a população de países subdesenvolvidos (INCA, 2018). Dessa forma, novos estudos estão sendo direcionados sobre a otimização farmacocinética para o tratamento da doença, sendo que uma das alternativas mais modernas é a nanotecnologia (REIS; NEUFELD, 2006).

## 2.2 NANOTECNOLOGIA

A ciência da nanotecnologia possibilita a obtenção de sistemas nanoestruturados a partir da manipulação de átomos e moléculas associados em fenômenos quânticos, tendo como base no desenvolvimento materiais orgânicos e inorgânicos, em que se destacam cerâmicas, metais e polímeros como matérias-primas (LIU; WEBSTER, 2007). Na área farmacêutica é aplicada como um vetor na distribuição localizada e controlada de compostos e apresenta vantagens como proteção contra a degradação gastrointestinal, aumento da absorção e farmacocinética prolongada (MOGHIMI, 2005; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Para o direcionamento específico são utilizados nanocarregadores sintetizados como NPs lipídicas sólidas, NPs poliméricas, NPs de peptídeos, NPs de ouro, nanoesferas, nanotubos de carbono, dendrímeros, lipossomas e NPs proteicas (GAO et al., 2013).

### 2.2.2 Nanopartículas proteicas

Biopolímeros naturais têm gerado um interesse da indústria farmacêutica por apresentar uma biocompatibilidade, biodegradabilidade e menor toxicidade com relação a materiais sintéticos (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011). As proteínas, por exemplo, além de apresentar um valor nutricional, podem gerar sistemas de entrega coloidais a partir da encapsulação de compostos, sendo que uma das mais utilizadas são as BSA, CSNA e ZNA (LUO et al., 2013).

A ZNA é uma prolamina derivada da proteína do milho, que apresenta em sua composição dois terços de lipofilicidade e um terço de hidrofiliabilidade (WANG; YIN; PADUA, 2008). Em sua estrutura apresenta 20% de leucina, 10% de prolina e 10% alanina. É comercializada como ZNA amarela, cuja característica é derivada de sua alta concentração de xantofilas, luteína, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina. É aplicada na indústria alimentícia para o revestimento de embalagens, e aprovada pela *food and drug administration* (FDA) como excipiente em produtos farmacêuticos (PODARALLA; PERUMAL, 2012). Ainda na área farmacêutica é utilizada como polímero no desenvolvimento de NPs, apresentando a capacidade de proteger os compostos encapsulados do ácido do estômago. Derivada de uma fonte renovável e biodegradável apresenta características como flexibilidade, compressibilidade e alta resistência (DASHDORJ et al., 2015; LUO et al., 2013; PENALVA et al., 2015).

Para estabilizar as NPS-ZNA, utiliza-se a CSNA, uma proteína anfifílica extraída do leite. A CSNA corresponde a 80% de proteína do leite e apresenta quatro grupos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ ). A CSNA  $\alpha$ , apresenta um subgrupo, as CSNA  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -, que são mutações genéticas em que foram adicionados um ou mais aminoácidos em sua estrutura primária (LUO et al., 2013). A CSNA  $\beta$ , utilizada no presente trabalho, possui sete variações genéticas e oito fragmentos proteicos, formados a partir da hidrólise enzimática responsável pela formação de caseína  $\gamma$ . A CSNA  $\kappa$  apresenta resíduos de aminoácidos dicarboxílicos glicosilados, identificados na região carboxiterminal, localizada em sua estrutura secundária e terciária (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

Em sua superfície apresenta propriedades físico-químicas como ligações de íons e pequenas moléculas. A CSNA também pode interagir com outras macromoléculas para formar complexos conjugados formando propriedades de combinações sinérgicas, além de apresentar uma resistência contra radiação UV (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011; SGARBIERI, 2005).

Outra proteína utilizada no desenvolvimento de NPs é a albumina. Comercialmente encontram-se três tipos de albuminas, a ovalbumina (OVA), albumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (BSH) (RUTENBERG; VINOGRADOV; AVNIR, 2013).

OVA exibe várias funcionalidades interessantes, como a sua capacidade de estabilizar emulsões e espumas. Devido à sua propriedade sensível ao pH e à temperatura, tem um alto potencial para uso como transportadora para liberação controlada de compostos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). A OVA é uma glicoproteína globular, apresenta 386 aminoácidos e peso molecular de 45 kDa (PALACIO; OROZCO; LÓPEZ, 2011).

BSA é constituída de um peso molecular de 69,323 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 4,7 amplamente utilizado em técnicas de entrega controlada de medicamentos, devido sua abundância e baixo custo de produção. A HSA é altamente solúvel em água e se liga a compostos e substâncias inorgânicas não covalentes. Sua estrutura é homóloga comparada à estrutura tridimensional da HSA (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012)

As albuminas séricas são proteínas abundantes e são responsáveis por funções fisiológicas como ligações, transporte e entrega de ácidos graxos, porfirinas, bilirrubina e esteroides (RAVINDRAN et al., 2010). A BSH é uma proteína globular bastante solúvel, constituída por 585 resíduos de aminoácidos, apresenta um peso molecular de 66,500 kDa, contém 35 resíduos de cisteinil, formando grupos sulfidrilo com 17 pontes dissulfureto. Possui um pH estável no faixa 4-9 com capacidade de aquecimento de até 60°C (ZHAO et al., 2010). É caracterizada por sua não toxicidade e não imunogenicidade. A BSH também mostra uma ligação com o tecido tumoral por mediação da transcitose. Em sua camada superficial apresenta grupos aminos e carboxílicos, que podem ser marcados com fluorescência para aprimorar sua funcionabilidade como regulador da pressão osmótica e transportador de

ácidos graxos e hormônios mediados pela tireoide (GENG et al., 2017; KIM et al., 2017; UHLE et al., 2017).

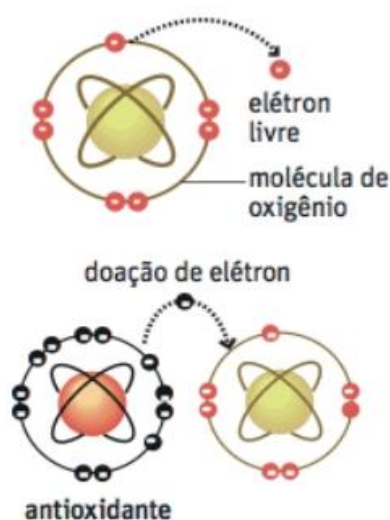
## 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO (EO)

### 2.3.1 Radicais livres

Um radical livre (RL) pode ser definido como qualquer espécie molecular ligado a um ou mais átomos. Esses átomos constantemente ganham e perdem elétrons, ficando com elétrons não pareados (BALASAHEB; PAL, 2015). Átomos que perderam elétrons são definidos como RL (figura 2) que ao adquirir elétrons de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos se tornam instáveis e atacam macromoléculas importantes, levando ao dano celular e a interrupção homeostática (LOBO et al., 2010).

O primeiro RL formado pela adição de elétrons é o superóxido. O superóxido ligado a mais um elétron resulta na formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Tecnicamente o  $H_2O_2$  não é um RL, porque não possui elétrons pareados, mas apresenta um forte perfil oxidante, que ao reagir com o superóxido, resulta em um radical hidroxílico, com capacidade de danificar células (HARRIS, 1994).

Figura 2: formação de radicais livres e ação antioxidante



Fonte: <http://rspress.com.br/health4life/>

### 2.3.2 Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) se originam de forma endógena no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial ou de interações com fontes exógenas com compostos xenobióticos. Os três principais ERO's são: radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^{\bullet-}$ ), representados na figura 3. O EO resulta em danos diretos ou indiretos mediados pelos ERO's em ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e atualmente têm sido implicado no envelhecimento, carcinogênese, neurodegeneração, aterosclerose e diabetes (RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

Figura 3: espécies reativas de oxigênio



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2019)

Para contrabalançar os danos mediados pelos ERO's, as células ativam um sistema de proteção conhecido como antioxidantes. Esse sistema é classificado como enzimático, e consiste em superóxido dismutase, catalase e glutationaperoxidase (TARLOVSKY, 2013).

O superóxido dismutase (SOD) é responsável pela conversão do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e água ( $H_2O$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Sua cadeia lateral é composta de três tipos de isoformas: SOD1, SOD2 e SOD3. A isoforma SOD1 é dependente de zinco e cobre e está localizado no citoplasma celular. A isoforma SOD2 é uma enzima homotetrâmera mitocondrial e a SOD3, ou SOD extracelular, possui uma sequência de peptídeos como um sistema de sinalização localizado no retículo endoplasmático, em que se expressa em níveis mais elevados nos pulmões, fígado e coração (DAVIS; PENNYPACKER, 2016).

A catalase é uma enzima tetramérica catalisadora do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ . A catalase possui duas atividades enzimáticas, que dependem da concentração de  $H_2O_2$ . Se a concentração de  $H_2O_2$  for alta, a catalase atua

cataliticamente, removendo  $H_2O_2$  formando  $H_2O$  e  $O_2$ . Em baixa concentração de  $H_2O_2$  ocorre uma reação peroxidativa, em que na presença de um doador de hidrogênio (H) ocorre a oxidação do seu substrato (DAVIS; PENNYPACKER, 2016).

A glutatona peroxidase é um oligopeptídeo que apresenta átomos de selênio em forma de selênio cisteína em seu sítio ativo e atua como nucleófilo para quebrar ligações de dissulfeto em proteínas oxidadas. Ao reduzir essas proteínas elas se tornam incapazes de interagir com outros componentes celulares e causar futuros danos (DAVIS; PENNYPACKER, 2016)

## 2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O aumento dos casos de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* spp, é de grande preocupação na clínica médica, onde podem acometer, em especial, pacientes imunossuprimidos, sendo uma importante causa de mortalidade em todo mundo (AHMAD *et al*, 2011). Inúmeros fatores resultam em uma grave infecção sistêmica, como o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antifúngicos disponíveis, e a alta toxicidade desses fármacos, tornando necessária a pesquisa de novas terapias para essas patologias (ZUZARTE *et al*, 2012).

Nos últimos anos as infecções fúngicas aumentaram a taxa de morbidade e mortalidade em 40% se tornando um problema de saúde pública, sendo assim, estudos sobre produtos naturais estão sendo desenvolvidos além de suas propriedades antioxidantes (WU; LUO; WANG, 2012a). Atualmente o potencial antimicrobiano e antifúngico está sendo visado por estar presente na maioria dos compostos naturais, como por exemplo, em produtos fitoterápicos, como óleos essenciais, utilizados em infecções bacterianas e fúngicas (KALEMBA; KUNICKA, 2003)

Dentre a gama de antifúngicos disponíveis, destaca-se a anfotericina B, pertencente à classe dos polienos seguido pelo fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol que fazem parte da classe dos triazóis, e os equinocandinas como a caspofungina, micafungina e anidulafungina (KOLA *et al.*, 2009).



A anfotericina B é um dos antifúngicos mais utilizados e vem sendo aplicada em tratamento de infecções fúngicas sistêmicas graves desde 1959. Anfotericina B se liga ao ergosterol, responsável pelo esterol da membrana plasmática fúngica, qual altera sua permeabilidade por originar poros permeáveis à saída de água e de pequenas moléculas essenciais como íons de potássio, amônio e fosfato. Em consequência da fragmentação da membrana, ocorre deterioração metabólica e morte celular (STONE et al., 2016).

Os relatos descritos sobre os efeitos colaterais da anfotericina B ou fungizon® são bastante preocupantes, onde 80% dos pacientes sofrem com febre, calafrios, vômito, dor de cabeça ou náusea durante a administração intravenosa do fármaco (VEN et al., 2012). Atualmente, estudos nanotecnológicos estão sendo desenvolvidos com um copolímero de ácido polilático-poliglicólico (PLGA-PEG), com intuito de que haja a possibilidade de administração por via oral, visando melhorar a solubilidade da anfotericina B, controlar sua liberação e reduzir sua toxicidade (RADWAN et al., 2017).

O crescente uso de nanosuspensões para formulações lipídicas tem despertado interesse do meio farmacêutico, devido seu alto tempo de vida útil e seu baixo custo de produção, sendo a segunda mais bem sucedida no mercado, ficando atrás somente de lipossomas (VEN et al., 2012).

## 2.5 CITOTOXICIDADE`

A nanotecnologia vem se expandindo rapidamente nos últimos anos, gerando impactando econômico em diversas áreas. Neste contexto, o número de produtos gerados comercialmente de nanomateriais está se expandindo. Atualmente os materiais nanométricos são visados com o intuito de diminuir a citotoxicidade de determinados compostos. (LIMA; SEABRA; DURÁN, 2012).

Atualmente as nanopartículas de prata têm atraído interesse intensivo de pesquisas para aplicações biomédicas devido a sua proeminente atividade antimicrobiana e antitumoral. Embora as metodologias comerciais tenham se mostrado tão eficientes para sintetizar NPs de prata, seu uso contínuo pode representar grande ameaça à saúde humana e ao meio ambiente, devido sua

composição, com capacidade se ligar e alterar a atividade de determinados compostos (VENUGOPAL et al., 2017)

Para a quantificação de determinados compostos antitumorais é utilizado o MTT que mede a taxa de proliferação celular de modo inverso, através da redução na viabilidade celular quando eventos metabólicos levam a apoptose ou necrose celular. A reação química ocorre através da redução do composto amarelo MTT a desidrogenases mitocondriais ao composto de formazano azul insolúvel em água, dependendo da viabilidade celular (BENDALE; BENDALE; PAUL, 2017).

## 2.6 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados se dá por métodos de polimerização a partir de polímeros pré-formados, gerando partículas sólidas coloidais com limite de tamanho de até 1000nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As NPs se diferem em nanoesferas e nanocápsulas. Nanoesferas possuem uma estrutura de matriz com capacidade de reter o composto em seu interior ou em sua superfície. As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o composto é absorvido em um núcleo líquido rodeado por uma membrana polimérica. O método de obtenção de NPs varia de acordo com o polímero e composto utilizado, visando obter propriedades físico-químicas adequadas (PARK et al., 2014; REIS; NEUFELD, 2006).

Dentre os métodos para encapsular compostos hidrofóbicos e hidrofílicos destaca-se a dispersão líquido-líquido, em que o início da formação das NPs está ligado ao fato de que o etanol mantém a solubilidade da proteína para que não ocorra a precipitação e a formação de partículas sólidas (WU; LUO; WANG, 2012a). Assim, se a junção das fases ocorrer antes da solidificação, ocorrerá à formação de NPs. Porém, se ocorrer à solidificação antes da coalescência, ou coalescência parcial, pode ocorrer à formação de estruturas irregulares. Por isso, faz-se necessário a presença de um agente estabilizante (ZHONG e JIN, 2009).

Outro método utilizado é a dessolvatação ou coacervação, o processo ocorre a partir da solubilidade de um polímero em uma fase aquosa frente a um agente de dessolvatação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Sobre

agitação magnética o processo de coacervação ocorre a partir da emulsão de óleo e água, onde fase orgânica (óleo, composto e solvente) é vertida sobre a fase aquosa (água, polímero e agente estabilizante). A coacervação ocorre a partir da separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais, em que a fase mais concentrada é coacervada e a outra fase é estabilizante (WEBER et al., 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento, caracterização e avaliação das atividades antioxidantes, antifúngica e citotóxicas das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Obtenção de NPS-BSA e NPS-CSNA pelo método de coacervação;
- B) Obtenção NPS-ZNA pelo método de dispersão líquido-líquido;
- C) Caracterizar os sistemas obtidos quanto ao diâmetro médio, distribuição do tamanho, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG);
- D) Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das NPs pela inibição dos radicais 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido hipocloroso (HOCl).
- E) Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*;
- F) Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

- Albumina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich®)
- Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (Sigma Aldrich®)
- Ácido clorídrico (Química Moderna®)
- Ácido hipocloroso (Sigma-Aldrich®)
- Ágar Soboraud – dextrose (Sigma Aldrich®)
- Álcool isopropílico
- Água Ultrapura resistividade de 18,2 mΩ/cm (Sistema Milli-Q Gradiente Millipore®)
- American Type Culture Collection (ATCC)
- Anfotericina B (Sigma-Aldrich®)
- *Candida albicans* Vitroids 0546 (Sigma-Aldrich®)
- Caseína (Sigma-Aldrich®)
- Dimetilsulfóxido (Química moderna®)
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Sigma Aldrich®)
- Dulbecco Iscove (IMDM) (Sigma-Aldrich®),
- Estreptomicina (Sigma Aldrich®)
- Etanol 99,5% (BIOTEC® Reagentes Analíticos)
- Célula HEp-2
- Meio de ultra Dulbecco modificado por Iscove's (Sigma Aldrich®)
- Penicilina (Sigma Aldrich®)
- RPMI (Sigma-Aldrich®)
- Solução MTT Bromulo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- soro bovino fetal (FBS) (Gibco®)
- NaCl Tampão PBS pH 7,4
- Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma-Aldrich®)
- Tripsina (Gibco, EUA)

- TPP tripolifosfato de sódio (Sigma-Aldrich®)
- Zeína (Sigma-Aldrich®)

#### 4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Agitador de tubos tipo Vórtex (Quimis®)
- Autoclave vertical AV Plus (Phoenix®) 15
- Balança analítica-M214A (Tecnal®)
- Banho Ultrassônico (Tecnal®)
- Capela de fluxo laminar vertical (Veco®)
- Capela para exaustão de gases (Lucadema®)
- Espectrofotômetro Jasco v 630
- Equipamento para análise do Potencial Zeta - ZetaSizer ZS, Malvern®
- Equipamento para medida de espalhamento dinâmico de luz - Dynamic Light Scattering (Brookhaven® 90Plus).
- Incubadora de bancada com agitação orbital Q816M22 (Quimis®)
- Leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®)
- Liofilizador. LD1500 (Terroni ®)
- Micropipetas (Labmate®)
- Microscópio Eletrônico de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG) MIRA3 LM (Tescan® Orsay Holding)
- Placa de aquecimento com agitação (Go-Stirrer®)
- Placa de Elisa
- Placa de Petri
- Ultracentrífuga refrigerada Z36HK1 (Hermle®)

### 4.3 METODOLOGIA

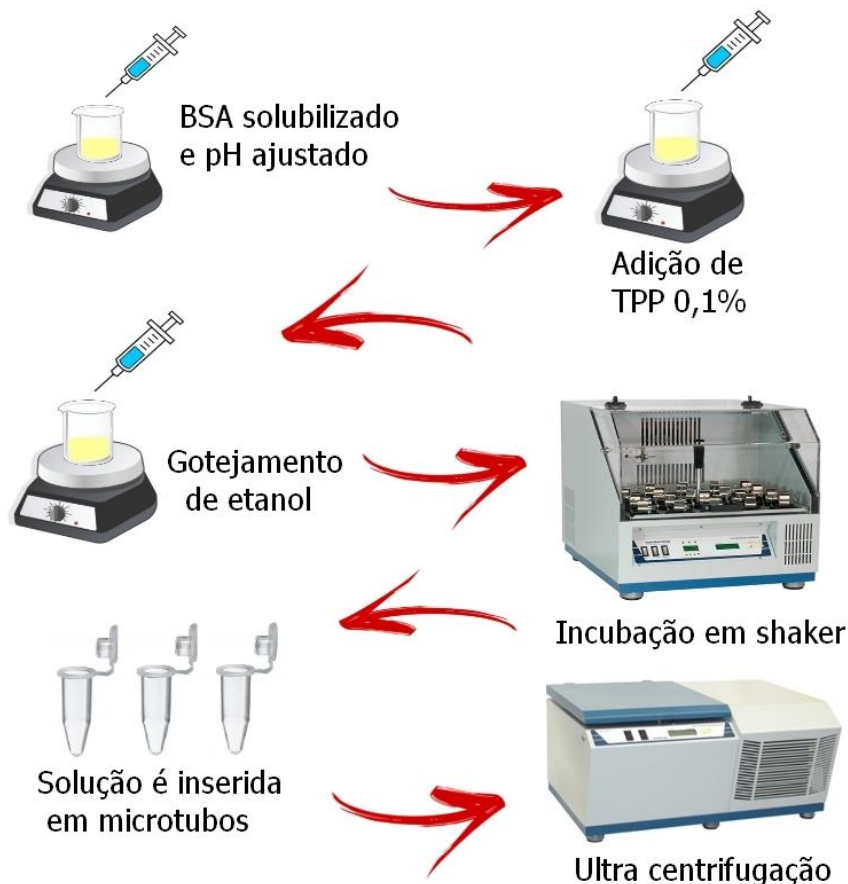
#### 4.3.1 Preparação das NPS-BSA

As NPS-BSA foram desenvolvidas pelo método de coacervação, conhecido como a interação de substâncias com cargas opostas, é realizada por diversos fatores, como por exemplo, a precipitação dos polímeros, mudança de temperatura, controle de pH ou a adição de um não solvente (STRAUSS; GIBSON, 2004). A BSA é altamente hidrofílica, apresenta possibilidade de direcionamento a alvo específico e capacidade de se ligar a compostos inorgânicos não covalentes (UHLE et al., 2017).

Inicialmente, para o desenvolvimento das NPs sobre a metodologia de coacervação (figura 4), 100 mg de BSA foram pesadas e dissolvidas em 4mL de água MilliQ compondo a fase aquosa. Logo, o pH foi então estabilizado em 5,0 com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. Posteriormente 50 µL de uma solução aquosa de Tripolifosfato de Sódio (TPP) 0,1% foi adicionado à solução de albumina gota-a-gota, sob agitação constante. A seguir, sobre a fase aquosa 1,5 ml de etanol foi gotejado ocorrendo a turvação da solução. Finalmente, a suspensão permaneceu sob agitação em shaker por 24 horas, a temperatura ambiente, com posterior ultracentrifugação a 23000 x g por 30 minutos/4°C. As NPS-BSA foram mantidas em suspensão aquosa e apresentaram uma leve turbidez branca.



**Figura 4:** Processo de obtenção de NPs de albumina pelo método de coacervação.



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2018)

#### 4.3.2 Preparação das NPS-CSNA.

A obtenção das NPs de CSNA é realizada conforme a metodologia de coacervação descrita por WEBER e colaboradores (2000) representada na figura 5. A fase orgânica é composta por 9 mL de etanol 99,9% a qual é gotejada sob a fase aquosa, 100 mg de CSNA em 2 mL de água. Após o gotejamento a suspensão é estabilizada por 45 minutos, sob agitação. Em sequência, é adicionada uma solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) 0,1%, e submetida à incubação em shaker por 24 horas, a temperatura de 25°C/150 rpm. Por fim, a solução é inserida em micro tubos e submetida à centrifugação, a 21 x g /15°C, por 20 minutos. Após a centrifugação o

sobrenadante é descartado. O precipitado é ressuspenso em água ultrapura, aliquotado e analisado.

**Figura 5:** Processo de obtenção de nanopartículas de caseína pelo método de coacervação.



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2018)

As NPS-CSNA foram armazenadas em suspensão aquosa e demonstravam uma leve turbidez branca opaca. A CSNA apresenta um perfil anfifílico e boa solubilidade em meio aquoso, com capacidade de formar estruturas esféricas uniformes com possibilidade de carreamento de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

#### 4.3.3 Preparação das NPS-ZNA.

A metodologia da dispersão líquido-líquido foi utilizada para a obtenção das NPS-ZNA (figura 6). Essa técnica é bastante utilizada tanto para a encapsulação de compostos hidrofóbicos quanto hidrofílicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A obtenção das NPs proteicas de ZNA é realizada conforme a metodologia de dispersão líquido-líquido descrito por HUERTA e colaboradores (2010), iniciada pela fase orgânica, em que 60 mg de ZNA é solubilizada em 3ml de uma solução hidroalcoólica sobre agitação magnética. Após 30 minutos a fase orgânica é gotejada em uma solução de 12 ml de CSNA 2,5% (fase aquosa). Ao término do gotejamento a solução permanece em agitação por mais uma hora. A seguir, a solução é inserida em microtubos e submetida à centrifugação, a  $21 \times g$  /15°C, por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é descartado. O precipitado é ressuspenso em água ultrapura, aliquotado e analisado.

**Figura 6:** Processo de obtenção de nanopartículas de zeína pelo método de dispersão líquido-líquido.



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2018)

As NPS-ZNA foram armazenadas em suspensão aquosa, denotando um aspecto branco leitoso. As NPs obtiveram um diâmetro médio de 194 nm com um índice de polidispersão de 0,2. Essas características se deve a interação entre a ZNA e a CSNA, onde a CSNA é utilizada como agente estabilizante eletrostérico. A CSNA age como um revestimento na superfície das NPS-ZNA, induzindo repulsões eletrostáticas e estéricas, evitando agregação entre as NPs e melhorando sua distribuição (PATEL; OUWENS; ELIKOV, 2010).

#### 4.3.4 Caracterização de nanopartículas

##### 4.3.4.1 Determinação de diâmetro médio e índice de polidispersão

A determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão (IPD) das NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA são realizados por espectroscopia de correlação de fótons ou *dynamic light scattering* (DLS). As diluições das suspensões foram preparadas em água purificada (1:200 v/v) e acondicionadas em uma cubeta. As amostras foram analisadas com ângulo de espalhamento de 90°, à 25°C e comprimento de onda de 659 nm. Todo processo foi realizado em triplicata, em corridas de 1 minuto. Os resultados foram obtidos como média do tamanho e do IPD. A média final e o desvio padrão com relação ao tamanho e IPD foi calculado entre 3 amostras diferentes (n=3).

##### 4.3.4.2 Determinação do potencial zeta

A análise do potencial zeta (PZ) das NPS-ZNA, NPS-CSNA e NPS-BSA foi verificada por determinação eletroforética das NPs, onde as amostras foram diluídas (1:100 v/v) com solução de KCl 1mM, para permanecer uma força iônica, mantendo a concentração de todos os íons presentes na solução durante a medida, e colocadas na célula eletroforética com um potencial de  $\pm 150$  mV, determinando então o PZ. Os valores obtidos do PZ foram utilizados como média e desvio padrão, com análise sendo realizada em triplicata (n=3).

##### 4.3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

A determinação do aspecto geral das NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma gota da dispersão das NPs foi gotejada sob o apoio de amostra (*stubs*) e, após a secagem, a amostra é revestida com ouro coloidal sob vácuo. As amostras, então, são designadas a câmara de microscopia, obtendo-se fotomicrografias utilizando feixe de elétrons de 15 e 30 kV.

#### 4.3.5 Análise de proteínas totais, Micro Lowry, com modificação de Peterson

Para o ensaio, fez-se a diluição das nanopartículas na escala 1:32 e então transferiu-se 100  $\mu$ L das amostras para microtubos, nestes acrescentou-se 100  $\mu$ L da Solução Reagente de Lowry e manteve-se a solução sob temperatura ambiente por 20 minutos, após adicionou-se 50  $\mu$ L da Solução de Trabalho do Reagente Folin & Ciocalteu e foi permitido o desenvolvimento de coloração por 30 min. As amostras foram então avaliadas utilizando espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 749 nm. Após verificadas as absorvâncias, estas foram avaliadas conforme a equação da reta, sendo esta obtida a partir da construção de uma curva de calibração utilizando o padrão de albumina do kit.

#### 4.3.6 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

##### 4.3.6.1 Captura do radical ABTS<sup>•+</sup>

O teste antioxidante *in vitro* que avalia a inibição do ABTS<sup>•+</sup> foi desenvolvido conforme a metodologia descrita por Re e colaboradores (1999), com algumas alterações.

A formação do radical ABTS<sup>•+</sup> foi feita a partir da mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio, e esta foi incubada à temperatura ambiente na ausência de luz por 12h à 16h. Após esse período a solução foi diluída em tampão fosfato (PB) 50 mM e pH 7,4 mantendo a absorvância na faixa de 0,70 em 734nm.

As NPs foram incubadas juntamente com a solução do radical por 30min. A análise da interação entre o ABTS<sup>•+</sup> e as NPS-BSA, NPS-ZNA e NPS-CSN foi testada nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75  $\mu$ g/mL, sendo avaliada em um espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 734 nm. O estudo sobre o IC<sub>50</sub> também foi realizado (concentração que apresenta 50% da capacidade sequestrante total do ABTS<sup>•+</sup>). As análises estatísticas foram feitas no software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc.), sendo utilizado o teste ANOVA seguido do pós-teste de tukey, com diferença estatística significativa de  $p < 0,05$ .

Todo o procedimento foi realizado em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada a partir da porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup>, seguindo a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \times 100$$

#### 4.3.6.2 Inibição do ácido hipocloroso (HOCl)

A avaliação do teste antioxidante *in vitro* para a inibição do ácido hipocloroso (HOCl) seguiu a metodologia de PAINO et al. (2005) com algumas alterações. O HOCl foi preparado a partir de uma solução de Hipoclorito de sódio (NaOCl) em água basificada (pH:12) em que a concentração foi determinada espectrofotometricamente pelo coeficiente de extinção molar 350 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>, em 292 nm. O revelador, (3,3',5,5' Tetrametilbenzidina) (TMB) foi diluído em dimetilformamida (0,014mol/L), acrescentando iodeto de potássio (0,01 mol/L).

As suspensões de NPs foram incubadas nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20 µg/mL por 10 min junto a solução de HOCl (80µM) e tampão PB (50 mmo/L, pH 7,4). Logo a solução de TMB foi adicionada e incubada por mais 5 min, na ausência de luz, a 37°C. A leitura da oxidação do HOCl foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 642 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.3.6.3 Captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A ação antioxidante *in vitro* sobre o radical DPPH seguiu a metodologia de MOLYNEUX (2003) com algumas alterações. O DPPH foi solubilizado em etanol e em seguida foi verificada a absorbância a 517 nm em um leitor de microplacas. Em cada poço da placa de ELISA foi adicionado 10 µL de cada solução de nanopartícula e 190 µL DPPH para resultar em um volume final de 200 µL, como controle foi utilizado a solução tampão na presença do DPPH. Todas as determinações foram realizadas em triplicata nas concentrações de

5, 10, 15, 20, 25, 40 µg/mL, a atividade antioxidante foi calculada a partir da porcentagem de inibição do DPPH, seguindo a equação:

$$Inibição = \frac{Abs\ do\ controle - Abs\ da\ amostra}{Abs\ do\ controle} \times 100$$

#### 4.3.7 Avaliação da atividade antifúngica

O ensaio para a determinação da atividade antifúngica foi realizado conforme o documento M27-A2 (2002) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com modificações, utilizando cepa de *Candida albicans* 0546 Vitroids<sup>TM</sup> cultivada em ágar Sabouraud-dextrose.

A *Candida albicans* foi incubada por 24h, em ágar Sabouraud-dextrose antes do ensaio. Após, 5 unidades formadoras de colônia (UFC) foram diluídas em 5mL de solução salina estéril, e agitadas até completa dissolução. A densidade celular foi ajustada no espectrofotômetro, obtendo uma absorvância correspondente a 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 530nm. A suspensão do inóculo foi diluída em RPMI, numa concentração de 1:50 e 1:20 sucessivamente.

No presente ensaio foi testada as NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA nas concentrações de 80, 26,6 e 8,8 µg/mL. Para comparação, também foi testada a atividade antifúngica da Anfotericina B (AmB), esta obtida comercialmente (Sigma), nas concentrações 1, 2,5 e 5 µg/mL. As NPs e a AmB foram diluídas previamente em meio RPMI até atingirem a concentração desejada.

100 µL das soluções dos compostos foram adicionados aos poços a microplaca, e o volume final de 200 µL acertado com o inóculo diluído em RPMI. Também foi incluído ao ensaio o controle positivo (200 µL RPMI contendo o inóculo), controle negativo (200 µL de RPMI) e o controle dos solventes (100 µL de DMSO/água e 100 µL RPMI contendo o inóculo). O ensaio foi realizado em triplicata, e a microplaca incubada a 35°C por 24h.



A eficácia *in vitro* dos compostos foi verificada pela concentração mínima inibitória (CIM) através da observação visual do crescimento fúngico. A CIM foi confirmada por meio da semeadura em placas de Petri com ágar Sabouraud incubadas por 24 horas, e então realizada a contagem das UFCs das concentrações plaqueadas.

#### 4.3.8 Ensaio de Citotoxicidade

Para a realização do ensaio, foi utilizada linhagem de células HEp-2 obtidas do American Type Culture Collection (ATCC) cultivadas em meio Dulbecco Iscove modificado (IMDM), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS), penicilina (10.000 UI/mL), estreptomicina (10 mg/mL), e semeadas em placas de cultura na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, incubadas a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h de incubação, o meio foi removido por aspiração e as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de solução de tampão fosfato salino pH= 7,4 (PBS). Assim, as células foram expostas as NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA por 24 h com diferentes faixas de concentrações (15, 30, 60 e 90 µg/mL). Como controle foi utilizado etanol e NPs vazias. Após, foi adicionados 0,05mL de MTT (0,5 mg/mL) e as placas incubadas por 3 h, após esse tempo este foi removido por aspiração e em seguida foram adicionados 150 µL de isopropanol:PBS (1:1) para a dissolução dos cristais formados. As placas foram agitadas durante 15 minutos. Finalmente, realizou-se a leitura da absorbância em 570 nm e 630 nm, utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190). O ensaio foi realizado em quadruplicada e os resultados expressos em percentual de viabilidade celular (média ± desvio padrão) e analisados estatisticamente por ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

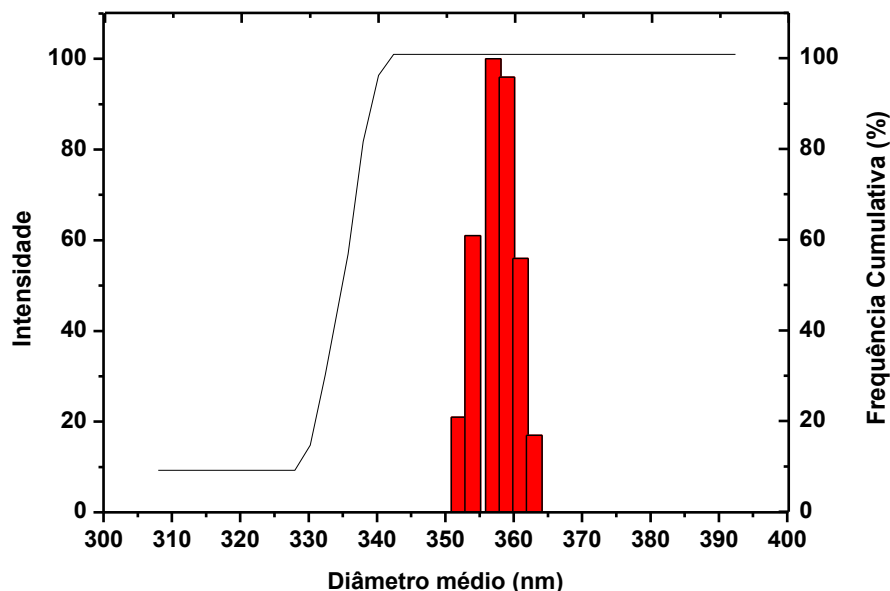
### 5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA

#### 5.1.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão

A metodologia de escolha para a análise do tamanho das NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA foi determinado pelo DLS, que ao refletir um espalhamento de luz dinâmico, reconhece o movimento browniano das partículas e determina o diâmetro médio e homogeneidade sobre a dispersão das partículas, determinado como IPD (KITTLER et al., 2010). O IPD entre 0,1 a 0,3 indicam um perfil de estreitamento das NPs, já os valores superiores a 0,5 indicam uma distribuição mais ampla. Quanto menor os valores de IPD melhor a homogeneidade da distribuição de tamanho (CHO et al., 2014).

As NPS-BSA atingiram o diâmetro médio de 358nm em um sistema monomodal com um índice de polidispersão de 02 apresentado na figura 7 e tabela 01. Ravindran et al. (2010) destaca que o diâmetro médio das NPs em meio a pH ácido aparece reduzido, e com maior uniformidade na distribuição no IPD das NPs, logo, em pH 7,0 a 10,0 é possível se obter NPs com diâmetro de 400nm, com maior possibilidade de agregação entre as NPs (RAVINDRAN et al., 2010). No presente trabalho as NPS-BSA foram obtidas em pH 5,0. A alteração do pH muda significativamente a carga de superfície proteica da partícula onde há uma interação entre íons e aminoácidos, quando ocorre um desequilíbrio entre o ponto isoelétrico e o pH da solução, tende a ocorrer agregados amorfos entre as NPs (UHLE et al., 2017).

Figura 7: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-BSA (Diâmetro médio da amostra de 358 nm, IPD 0,202, onde 100% das partículas encontram-se com diâmetro entre 352 a 364nm)

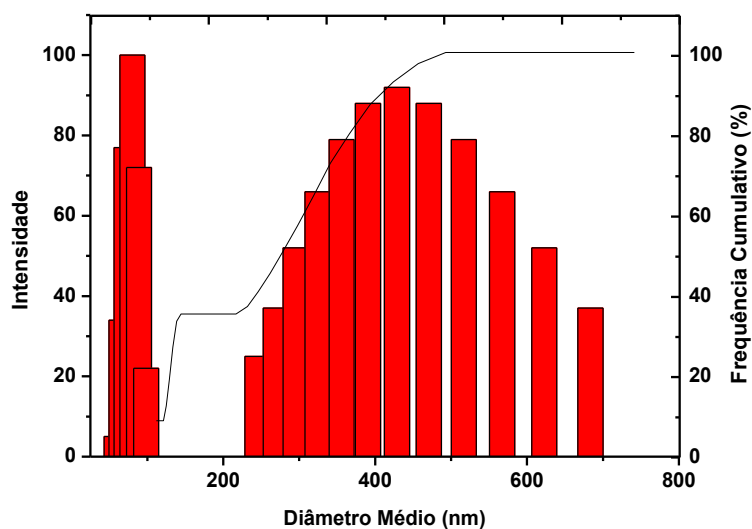


| Formulação | Diâmetro médio | IPD          |
|------------|----------------|--------------|
| NPS-BSA    | 358 ± 24       | 0,202± 0,078 |

Tabela 1: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-BSA

Com a técnica de coacervação foi possível obter NPS-CSNA com diâmetro médio abaixo de 300nm em um sistema bimodal, representado na figura 8. De acordo com Lohcharoenkal e colaboradores (2014) é possível se obter micelas de CSNA na faixa de 100 a 200nm. As nanopartículas de CSNA possuem um caráter anfipático e com alta estabilidade, o qual gerou interesse para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados. As micelas de CSNA não possuem uma estrutura química fixa, qualquer mudança de temperatura, pH, força iônica e hidrostática irá influenciar no tamanho e homogeneidade das partículas (LOHCHAROENKAL et al., 2014).

Figura 8: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-CSNA (Diâmetro médio da amostra de 333,4 nm, IPD 0,280, onde 29% das partículas encontram-se com diâmetro entre 59 a 98nm e 71% entre 245 a 683nm).



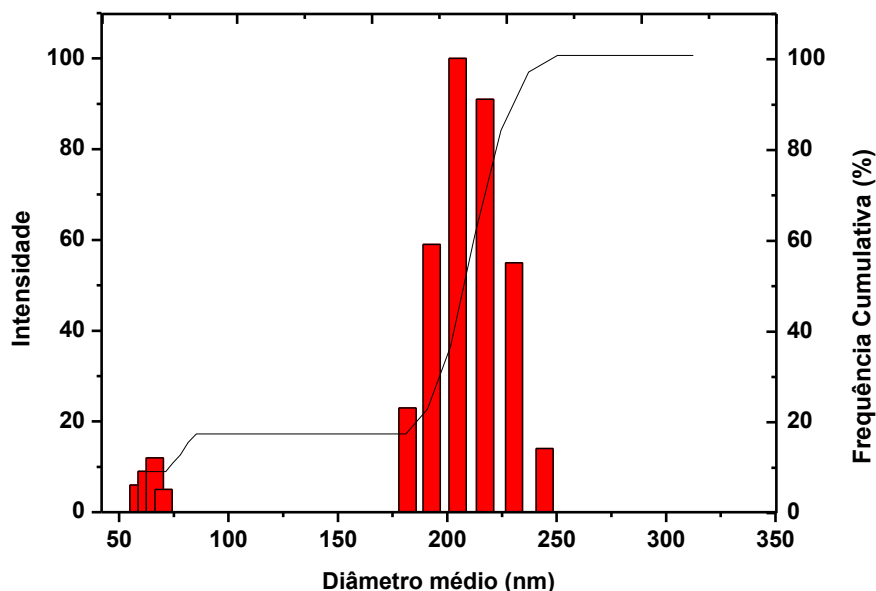
As NPS-CSNA atingiram um índice de polidispersão na faixa de 0,3 (tabela 2) em que segundo Elzoghby et al. (2013), ao desenvolverem NPS-CSNA carregada de flutamida, pelo método de emulsão óleo em água, obtiveram um diâmetro médio de 100 nm, porém com um IPD de 0,2, que pode ser explicado pelo tamanho e composição das micelas de caseína, sendo que algumas micelas podem atingir o tamanho médio de até de 500nm (ELZOGHBY et al., 2013).

| Formulação | Diâmetro médio (nm) | IPD         |
|------------|---------------------|-------------|
| NPS-CSNA   | 333,4 ± 26,3        | 0,28 ± 0,03 |

Tabela 2: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-CSNA.

Com o uso da metodologia de dispersão líquido-líquido, foi possível obter NPS-ZNA com um diâmetro inferior a 200nm, como mostra a figura 9. Entretanto, houve a formação de um sistema bimodal, o que se pode considerar irrelevante, pois representa apenas 9% do total, apresentando tamanhos nanométricos entre 59 a 70nm.

Figura 9: Distribuição de tamanho de uma amostra representativa das NPS-ZNA (Diâmetro médio da amostra de 197,7 nm, IPD 0,173, onde 9% das partículas encontram-se com diâmetro entre 59 a 70nm e 91% entre 182 a 244nm)



O tamanho das NPS-ZNA e o IPD estão relacionados ao pH, quanto mais próximo do ponto isoelétrico da proteína menor o tamanho da partícula e maior homogeneidade na distribuição das NPs (CHO et al., 2014; PODARALLA; PERUMAL, 2012). Como se pode observar na tabela 3, o valor do IPD está na faixa de 0,2, devido ao pH que as NPs foram produzidas (7,0). Wu et al. (2012) desenvolveram NPS-ZNA usando o método de dispersão líquido-líquido para encapsular dois óleos essenciais, timol e carvacrol, compostos com estruturas químicas semelhantes. Foi estudado a morfologia, estrutura e propriedade antioxidante sob diferentes condições de pH, incluindo pH 4 (ácido) ajustado com ácido clorídrico, pH 7,5 (neutro) e pH 10 (básico) ajustado com hidróxido de sódio. As formulações obtidas em pH neutro e básico apresentaram diâmetros médios e índices de polidispersão melhores do que quando submetidas a pH ácido (WU; LUO; WANG, 2012b).

| Formulação     | Diâmetro Médio (nm) | IPD          |
|----------------|---------------------|--------------|
| <b>NPS-ZNA</b> | 197,7 ± 2,9         | 0,173± 0,007 |

Tabela 3: Resultados do diâmetro médio e índice de polidispersão das NPS-ZNA.

### 5.1.2 Potencial zeta

Potencial Zeta (PZ) define a carga de superfície da partícula através da mobilidade eletroforética. Geralmente é aplicado para prever a estabilidade e nível de agregação das NPs (CHANG et al., 2017).

Polímeros que constituem uma partícula são o principal componente para influenciar o PZ, especialmente polímeros derivados de lecitinas, que fornecem um potencial negativo. NPs com PZ acima (+/-) de 30 mV indica uma boa estabilidade físico-química, isso porque diminui as chances de agregação das NPs. Outro fator que se deve levar em consideração é o pH, pois alterações no pH geram mudanças no valor do potencial zeta, além de serem responsável pela estabilidade da suspensão (MOHANRAJ; CHEN, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A mobilidade eletroforética é uma forma de medir o parâmetro e velocidade das NPs. Através desse parâmetro é possível avaliar a energia e a interação das NPs com íons presentes no meio, dessa forma determinando a sua estabilidade (HUNTER, 1986).

A carga da superfície das NPS-BSA varia conforme o pH, assim o PZ negativo obtido para essas NPs está associado ao pH no qual as NPs foram preparadas (pH=5,0). Outro fator importante que deve ser levado em consideração é o ponto isoelétrico da albumina (5,3) desse modo, o potencial zeta tende a ser convertido para negativo (LANGER et al., 2003).

O PZ das NPS-CSNA também se mostraram negativos. Zhang et al. (2014) utilizaram a CSNA em sua formulação para inverter o PZ de positivo para negativo, mostrando que as partículas de CSNA alteram a adsorção da carga superficial das NPs, aumentando sua estabilidade (ZHANG et al., 2014). Micelas de CSNA contêm fosfato de cálcio em seu núcleo, utilizado para estabilizar as partículas, o qual também pode induzir a alteração da carga em sua superfície (LOHCHAROENKAL et al., 2014).

De acordo com a tabela 4 os valores negativos do potencial zeta das NPS-ZNA podem ser explicados devido ao ponto isoelétrico (pI) da zeína (6,8), juntamente com a CSNA, que pode agir como estabilizante nas NPS-ZNA e alterar sua carga superficial (PODARALLA; PERUMAL, 2012). Vários outros compostos podem ser usados para alterar a carga superficial de uma partícula, por exemplo, Luo et al. (2013) utilizou o cálcio associado a carboximetilquitosana para transformar o potencial zeta de negativo para positivo (LUO et al., 2013).

| <b>Formulação</b> | <b>Potencial Zeta</b> |
|-------------------|-----------------------|
| <b>NPS-BSA</b>    | $-14,6 \pm 1,97^a$    |
| <b>NPS-CSNA</b>   | $-17,7 \pm 1,04^a$    |
| <b>NPS-ZNA</b>    | $-32,5 \pm 4,28^b$    |

Tabela 4: formulação e potencial zeta das NPS-ZNA, NPS-CSNA e NPS-BSA

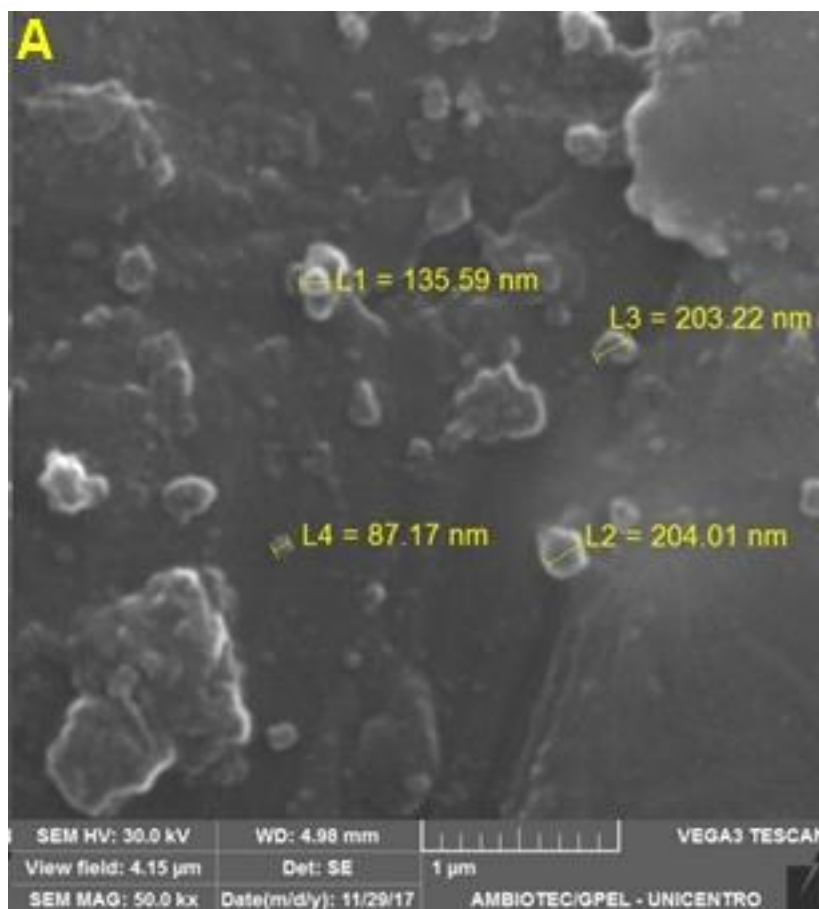
### 5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

A microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV) é um instrumento de observação para análises e características de microestruturas de materiais sólidos. A técnica do MEV consiste em espalhar um feixe de elétrons de ponta a ponta sobre a superfície de uma amostra. Conforme ocorre a varredura sobre a amostra, os sinais emitidos pelos elétrons sofrem alterações conforme as variações presentes na superfície da amostra.

Field Emission Electron Guns (FEG) é uma fonte de emissão eletrostática, onde um cristal de tungstênio possibilita maior reconhecimento do campo elétrico. Com a conexão MEV-FEG, se tem uma maior emissão de elétrons e densidade decorrente (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

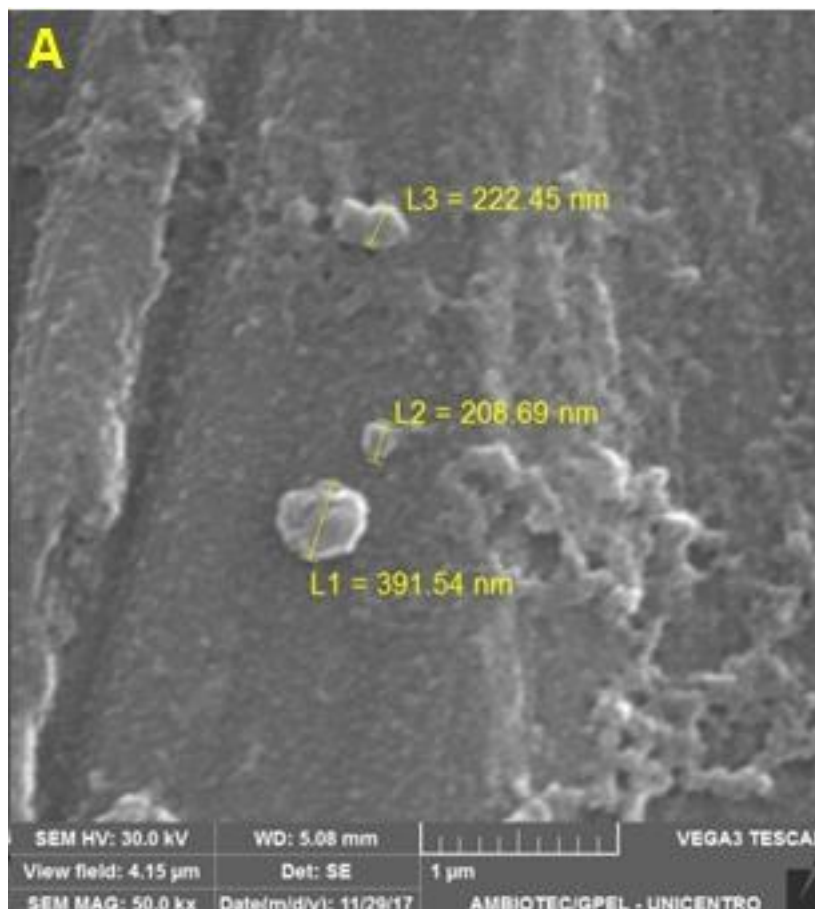
De fato, como se pode observar nas fotomicrografias de MEV-FEG das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA todas apresentam um formato esférico e o diâmetro médio corresponde aos dados obtidos.

**Figura 10:** Micrografias das NPS-BSA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 50.000 X

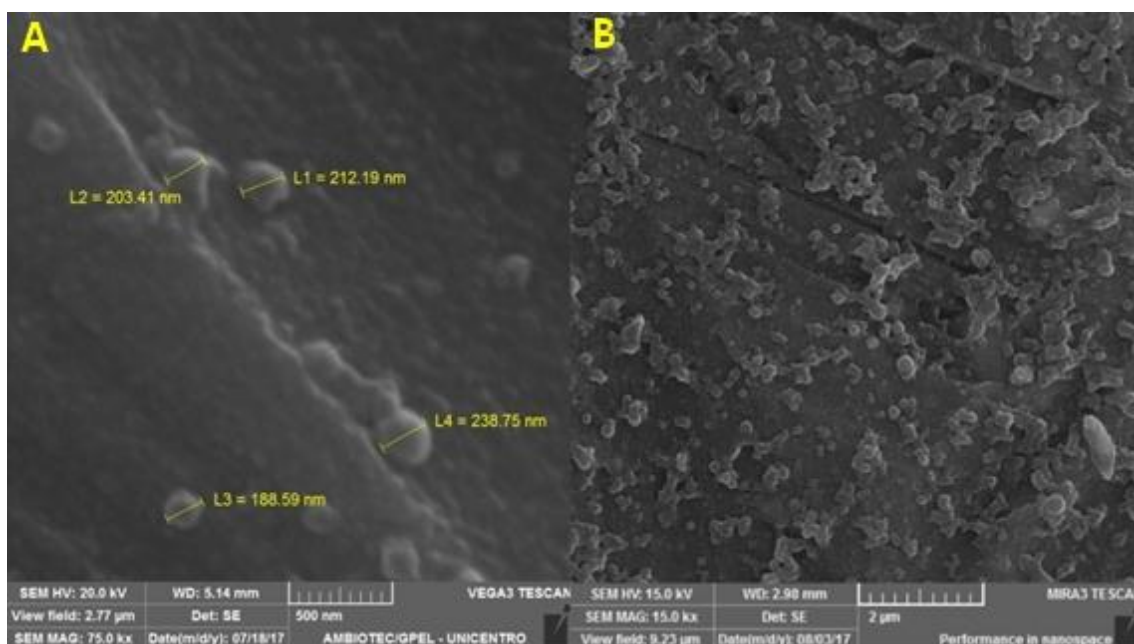




**Figura 11:** Micrografias das NPS-CSNA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 50.000



**Figura 12:** Micrografias das NPS-ZNA obtidas por MEV-FEG: A) Aumento de 75.000 X e B) 15.000 X.



## 6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

O termo antioxidante está diretamente ligado à quebra da peroxidação lipídica, fazendo com que os danos causados pelos RL a alvos como o DNA, proteínas e pequenas moléculas sejam minimizados (HALLIWELL, 1995).

Os ensaios antioxidantes *in vitro* estabelecidos para avaliar as NPS-ZNA, NPS-CSNA e NPS-BSA foram: captura do radical ABTS<sup>•+</sup>, DPPH e HOCl. Esses ensaios são revelados espectrofotometricamente através da transferência e captação de elétrons (SHABESTARIAN et al., 2017).

### 6.1 CAPTURA DO RADICAL ABTS<sup>•+</sup>

Entre diversas técnicas utilizadas como modelos de radicais livres para avaliar o perfil antioxidante de um composto, destaca-se o radical ABTS<sup>•+</sup>. Sua atividade é gerada a partir de ligações eletroquímicas ou enzimáticas tanto em substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas, incluindo flavonóides, carotenóides e antioxidantes plasmáticos (RE et al., 1999).

No presente estudo, a atividade antioxidante das NPs foi avaliada pela redução do radical ABTS<sup>•+</sup>. Na reação química o radical catiônico ABTS<sup>•+</sup> (azul esverdeado) é convertido em ABTS<sup>•+</sup> estável (incolor) pela doação de elétrons ou hidrogênio. Sugere-se que o mecanismo dos compostos antioxidantes baseia-se na transferência de hidrogênio ou na oxidação de aminoácidos para o radical ABTS<sup>•+</sup>, estabilizando então o ABTS<sup>•+</sup> como o produto final (SHAZLY et al., 2017).

Os resultados da porcentagem de inibição do radical obtida pelos sistemas em diferentes concentrações de maneira atemporal são apresentados na Tabela 5. As NPs mostraram que sua atividade é dependente da concentração, sendo tal atividade ampliada com o aumento na concentração.

| <b>Concentrações<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>NPS-BSA</b>   | <b>NPS-CSNA</b>  | <b>NPS-ZNA</b>   |
|--|------------------|------------------|------------------|
| <b>5</b>   | 13,03 $\pm$ 1,01 | 27,34 $\pm$ 0,07 | 12,03 $\pm$ 1,42 |
| <b>10</b>  | 20,18 $\pm$ 1,30 | 53,72 $\pm$ 4,80 | 19,81 $\pm$ 1,45 |
| <b>15</b>  | 24,15 $\pm$ 2,14 | 67,42 $\pm$ 0,80 | 30,32 $\pm$ 1,23 |
| <b>20</b>  | 26,85 $\pm$ 1,50 | 73,93 $\pm$ 2,24 | 38,09 $\pm$ 1,47 |
| <b>25</b>  | 31,14 $\pm$ 1,33 | 86,07 $\pm$ 0,67 | 46,40 $\pm$ 2,67 |
| <b>50</b>  | 48,51 $\pm$ 1,71 | 94,65 $\pm$ 1,32 | 66,84 $\pm$ 1,75 |
| <b>75</b>  | 59,79 $\pm$ 0,38 | 95,93 $\pm$ 0,64 | 79,29 $\pm$ 0,56 |

Tabela 5: Porcentagem de inibição do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pelas nanopartículas em tampão fosfato salino (50 mM, pH 7,4), na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda = 734\text{nm}$ ).

Espera-se que as proteínas empregadas apresentem atividade antioxidante devido seus aminoácidos constituintes. Como observado na Tabela 5, as NPS-CSNA apresentaram maior atividade antioxidante nas maiores concentrações, seguido das NPS-ZNA e finalmente as de BSA. Todas as nanopartículas apresentaram atividade antioxidante mesmo em concentrações mais baixas.

A maioria das propriedades antioxidantes da NPS-BSA pode ser atribuída à sua estrutura bioquímica. A BSA contém 35 resíduos de cisteína (cys), dos quais 34 estão envolvidos em ligações dissulfeto intramoleculares, contribuindo assim para sua estrutura terciária geral (AN; ZHANG, 2017). A fração tiol da cys-34 é reativa e é um potente inibidor de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/RNS) que suportam um importante papel regulador no compartimento extracelular.

Outra parte das propriedades antioxidantes da BSA deve-se à sua capacidade de ligação. A parte N-terminal da BSA (N-Asp-Ala-His-Lys) forma um local de alta afinidade para íons. Em virtude do seu sítio de ligação de alta afinidade, a albumina limita o potencial dos íons metálicos catiônicos para gerar ERO's após uma reação com oxigênio e, conseqüentemente, para danificar outras biomoléculas (PLANTIER et al., 2016).

Fonseca e colaboradores (2017) demonstraram resultados semelhantes ao deste estudo, indicando que a atividade antioxidante das NPS-BSA vazias se deve à capacidade redutora de grupos químicos presentes nos aminoácidos da albumina, devido sua capacidade de interagir diretamente com os radicais livres (FONSECA; KHALIL; MAINARDES, 2017).

Cheng e colaboradores obtiveram resultados que sugerem que a BSH pode ser usada como um bom material na produção de transportadores eficazes, garantindo a proteção contra a perda da atividade antioxidante do polifenol resveratrol (CHENG et al., 2018).

Em relação às NPS-CSNA, suas propriedades antioxidantes estão relacionadas à sua composição, estrutura e hidrofobicidade, posição dos resíduos de aminoácidos e peso molecular (KUMAR et al., 2016a, 2016b).

A CSNA possui altas concentrações de histidina, lisina, prolina e tirosina, e todos esses aminoácidos foram previamente reportados por atuar como antioxidantes por agirem como doadores de hidrogênio ou como antioxidantes proteicos endógenos. Muitos autores mostraram também que a atividade antioxidante da caseína pode estar relacionada à sua alta tendência a quelar metais e à sua capacidade de doar elétrons e átomos (PERNA et al., 2013; RIVAL; BOERIU; WICHERS, 2001). Além disso, pode agir como antioxidante inibindo a auto-oxidação lipídica catalisada pela lipoxigenase, devido à oxidação de resíduos de aminoácidos presentes nela (SUETSUNA; UKEDA; OCHI, 2000). Esmaili e colaboradores observaram que micelas de beta-caseína melhoram a atividade antioxidante da curcumina (ESMAILI et al., 2011), bem como Pan e colaboradores com nanocápsulas de caseína (PAN; ZHONG; BAEK, 2013), devido às características previamente citadas.

Por fim, em relação às NPS-ZNA, sabe-se que sua atividade antioxidante está relacionada ao peso molecular e à hidrofobicidade dos peptídeos constituintes. Os peptídeos identificados na zeína são compostos por aminoácidos hidrofóbicos, tais como leucina, prolina e fenilalanina, e o alto conteúdo destes pode aumentar sua atividade antioxidante. Tem sido relatado que a fenilalanina pode atuar como um sequestrador direto de radicais, uma vez que doa prótons facilmente a radicais deficientes em elétrons e ainda permanece estável via ressonância eletrônica em seu anel. Além disso, a presença da leucina terminal também foi associada à atividade antioxidante

(KONG; XIONG, 2006; TANG; ZHUANG, 2014). Tal atividade também está relacionada a sua capacidade de ligar-se a lipídios insaturados. Dessa forma, a zeína previne a oxidação lipídica estabilizando os radicais livres (GÜÇBILMEZ; YEMENICIOĞLU; ARSLANOĞLU, 2007).

Outros estudos avaliaram NPS-ZNA vazias, bem como carregadas, e constataram o potencial antioxidante do polímero, além do aumento da capacidade antioxidante das NPs quando carregadas (WU; LUO; WANG, 2012a; ZHANG; HAN, 2018).

Dessa forma, compostos que demonstram atividade antioxidante *in vitro* são provavelmente e na eficientes na eliminação de radicais livres gerados por processos metabólicos a nível celular, e o seu potencial terapêutico pode ser otimizado por nanoencapsulação, conduzindo a características biofarmacêuticas e farmacocinéticas melhoradas. Assim, os resultados encontrados neste estudo demonstram a potencialidade dos sistemas desenvolvidos, seja para sua utilização de maneira isolada, seja para carregamento de compostos com atividade antioxidante, visando sinergismo e potencialidade da ação.

## 6.2 CAPTURA DO RADICAL DPPH

O DPPH apresenta uma coloração púrpura sendo avaliado na absorvância de 517nm. É bastante utilizado para determinar atividade antioxidante de extratos e compostos isolados, como substâncias fenólicas. Quando o DPPH aceita um elétron doado por um composto antioxidante, a superfície da solução é descolorada, o que pode ser medida quantitativamente a partir de mudanças em sua absorvância (SHABESTARIAN et al., 2017).

Durante a realização do teste de captura do radical DPPH, podemos notar que não houve descoloração nem mudanças significativas nas absorvâncias das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA, quando comparado ao controle (tabela 6).

| <b>Concentrações<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>NPS-BSA<br/>(Abs.Cont.: 0.790)</b> | <b>NPS-CSNA<br/>(Abs.Cont.: 0.865)</b> | <b>NPS-ZNA<br/>(Abs.Cont.: 0.878)</b> |
|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>5</b>   | 0,934 $\pm$ 0,013                     | 0,883 $\pm$ 0,003                      | 0,919 $\pm$ 0,010                     |
| <b>10</b>  | 0,913 $\pm$ 0,003                     | 0,891 $\pm$ 0,009                      | 0,915 $\pm$ 0,005                     |
| <b>15</b>  | 0,917 $\pm$ 0,001                     | 0,898 $\pm$ 0,017                      | 0,914 $\pm$ 0,004                     |
| <b>20</b>  | 0,923 $\pm$ 0,007                     | 1,075 $\pm$ 0,251                      | 0,906 $\pm$ 0,016                     |
| <b>25</b>  | 0,919 $\pm$ 0,002                     | 0,924 $\pm$ 0,012                      | 0,923 $\pm$ 0,026                     |
| <b>50</b>  | 0,909 $\pm$ 0,005                     | 0,938 $\pm$ 0,026                      | 0,966 $\pm$ 0,043                     |
| <b>75</b>  | 0,875 $\pm$ 0,003                     | 0,923 $\pm$ 0,001                      | 0,926 $\pm$ 0,029                     |

Tabela 6: Média da absorvância das nanopartículas sobre o radical DPPH em etanol 99,5% na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda = 517\text{nm}$ ) (média  $\pm$  DP).

Quando submetido a um composto antioxidante o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é reduzido formando o difenil-picril-hidrazina, denotando uma coloração amarelada (SHON et al., 2004), o que não aconteceu com as amostras das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA, permanecendo estável por 30 minutos e mantendo a coloração púrpura, os valores das absorvâncias comprovam a estabilidade do radical.

Quando comparado à atividade antioxidante das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA sobre o ABTS<sup>•+</sup>, podemos analisar que com relação ao DPPH não houve um decréscimo das absorvâncias quando comparadas ao controle, indicando que não há atividade antioxidante sobre o radical DPPH.

Sendo que a quantidade necessária para que determinado composto apresente tal atividade é necessário que ocorra a redução da concentração inicial de DPPH em 50% sendo denominada em concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

### 6.3 INIBIÇÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)

O HOCl é um oxidante natural que pode ser sintetizado a partir de cloreto e peróxido de hidrogênio via catálise da mieloperoxidase, em células fagocíticas. Sob condições fisiológicas, se torna um poderoso oxidante natural, porém sua produção excessiva pode causar danos a tecidos e células, devido a sua alta reatividade com biomoléculas (WU et al., 2010; YI et al., 2012).

Com relação à atividade de inibição do HOCl (tabela 7) nota-se que as médias de porcentagem da atividade antioxidante das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA ficaram abaixo do IC<sub>50</sub>. Assim, é possível desenvolver NPS-BSA e NPS-CSNA e NPS-ZNA carregadas com compostos antioxidantes, onde não haverá interação do polímero com o radical testado, assegurando a eficácia do composto encapsulado.

| <b>Concentrações<br/>(µg/mL)</b> | <b>NPS-BSA</b> | <b>NPS-CSNA</b> | <b>NPS-ZNA</b> |
|----------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| <b>1</b>                         | 11,28 ± 9,49   | 7,02 ± 3,61     | 10,58 ± 5,12   |
| <b>5</b>                         | 10,60 ± 4,82   | 18,10 ± 3,41    | 14,61 ± 5,62   |
| <b>10</b>                        | 16,71 ± 12,13  | 25,79 ± 3,50    | 18,04 ± 1,01   |
| <b>15</b>                        | 13,51 ± 3,72   | 25,48 ± 3,32    | 24,88 ± 3,46   |
| <b>20</b>                        | 12,71 ± 5,69   | 27,58 ± 1,51    | 32,85 ± 3,11   |

Tabela 7: Média da absorvância de inibição do ácido hipocloroso HOCl pelas nanopartículas com revelador (3,3',5',5' - Tetrametilbenzidina) TMB, nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20 µg/mL na ausência de luz e temperatura ambiente ( $\lambda = 652\text{nm}$ ).

Verifica-se que com o aumento da concentração proteica, existe um aumento da atividade antioxidante assim NPS-ZNA em concentrações acima de 20 µg/mL mostram atividade antioxidante frente ao radical HOCl, essa alteração na absorvância das NPS-ZNA deve-se a composição da zeína, constituída por 21,4% de glutamina, 19,3% de leucina, 9,0% de prolina, 8,3% de alanina, 6,8% de fenilalanina, 6,2% de isoleucina, 5,7% de serina e 5,1% de tirosina, todos antioxidantes respectivamente (ZHANG; LUO; WANG, 2011; ZHANG; HAN, 2018).

O tratamento de proteínas isoladas com HOCl resulta principalmente da alteração de cadeias laterais de aminoácidos, com alguma fragmentação e reticulação de proteínas (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2003). Além de propriedades tecnológicas, as proteínas apresentam funções nutricionais e biológicas. Sua ação antioxidante, por exemplo, é sintetizada a partir da ligação de peptídeos bioativos liberados após hidrólise. Em alimentos os são utilizados para diminuir a peroxidação lipídica (WU; CHEN; SHIAU, 2003).

## 7. ATIVIDADE ANTI FUNGICA *IN VITRO*

A atividade antifúngica *in vitro* das diferentes concentrações de NPS-BSA NPS-CSNA, NPS-ZNA e AmB está apresentada na Tabela 8 e na figura 13. Comparando com o controle positivo, todas as concentrações testadas das NPs obtiveram uma ação antifúngica frente à *Candida albicans*, porém um efeito semelhante foi obtido pelo Controle do solvente DMSO. Para fins comparativos, também foi testada a AmB, que apresentou total inibição da cepa nas três concentrações testadas.

Comparando o efeito antifúngico entre as NPs, as NPS-BSA apresentaram uma menor eficácia, as nanopartículas de BSA apresentam propriedades antifúngicas e antimicrobianas associado à sua baixa citotoxicidade (CASA et al., 2015) a qual proporcionou um crescimento de uma unidade formadora de colônia (UFC) semelhante aos solventes.

As NPS-CSNA apresentaram um efeito intermediário, e verificou-se que com sua concentração menor (8,8 µg/mL) a inibição do crescimento da *C. albicans* foi melhor que a maior concentração (80 µg/mL) semelhante ao trabalho desenvolvido por BORA et al (2016) em que nanopartículas conjugadas de caseína e nanopartículas de caseína de prata contendo pectina e alginato de sódio foram desenvolvidas como um filme de revestimento de duas camadas onde foram obtidas por meio de dessolvatação e obtiveram resultados antimicrobianos dependentes de sua concentração (BORA; MISHRA, 2016). O resultado mais expressivo foi obtido com as NPS-ZNA, onde o crescimento de UFC foi relativamente baixo. Assim como o trabalho de Li et al, (2013), que ao desenvolverem nanopartículas de zeína revestidas com caseinato de sódio carregadas de timol, em uma técnica antisolvente obtiveram

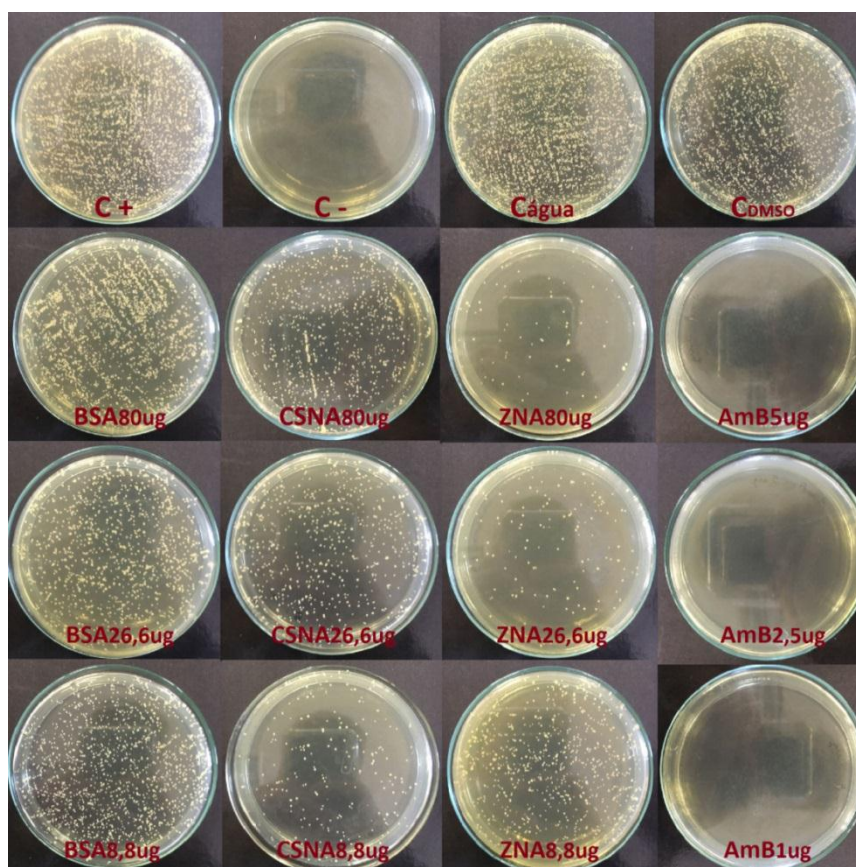


atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Salmonella*, (LI et al., 2013) inverso as NPS-CSNA, onde sua maior concentração apresentou um resultado inferior comparado a sua maior concentração.

| <b><i>Candida albicans</i></b> |             |        |
|--------------------------------|-------------|--------|
|                                | Média (UFC) | DP     |
| <b>Controle positivo</b>       | 3240,00     | 173,30 |
| <b>Controle água</b>           | 2032,00     | 128,70 |
| <b>Controle DMSO</b>           | 1773,00     | 175,70 |
| <b>NPS-BSA 80 µg/mL</b>        | 1482,00     | 8,40   |
| <b>NPS-BSA 26,6 µg/mL</b>      | 1448,00     | 300,10 |
| <b>NPS-BSA 8,8 µg/mL</b>       | 1380,00     | 5,60   |
| <b>NPS-CSNA 80 µg/mL</b>       | 1021,00     | 30,29  |
| <b>NPS-CSNA 26,6 µg/mL</b>     | 722,70      | 28,94  |
| <b>NPS-CSNA 8,8 µg/mL</b>      | 238,70      | 52,20  |
| <b>NPS-ZNA 80 µg/mL</b>        | 84,00       | 8,70   |
| <b>NPS-ZNA 26,6 µg/mL</b>      | 101,30      | 8,30   |
| <b>NPS-ZNA 8,8 µg/mL</b>       | 1064,00     | 169,70 |
| <b>AmB livre 1 µg/mL</b>       | 0           | 0      |
| <b>AmB livre 2,5 µg/mL</b>     | 0           | 0      |
| <b>AmB livre 5 µg/mL</b>       | 0           | 0      |

Tabela 8: Efeito antifúngico de variadas concentrações de NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA, e comparativo da AmB livre sobre a cepa de *Candida albicans* Vitroids TM 0546

Figura 13: Atividade antifúngica de variadas concentrações de NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA, comparação com a AmB e controles positivo, negativo e solventes sobre a cepa de *Candida albicans* Vitroids TM 0546, após plaqueamento em ágar Sabouraud-dextrose.



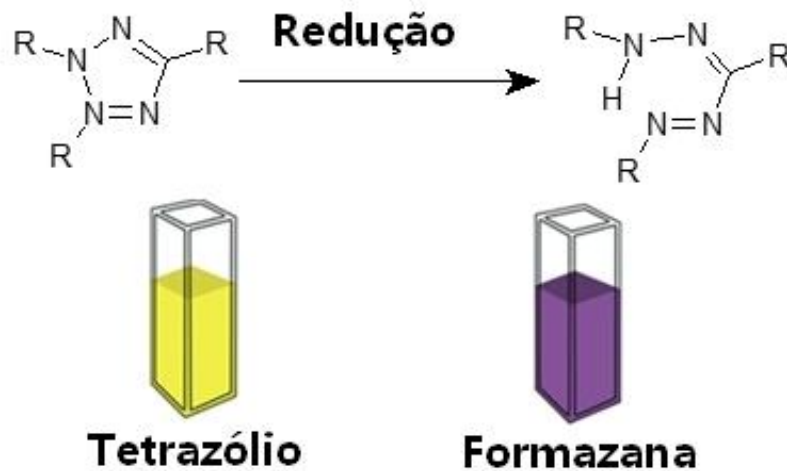
Diante do resultado da atividade antifúngica das NPs brancas, principalmente das NPS-ZNA, ressalta-se a importância no desenvolvimento de novos compostos nanoparticulados utilizando a ZNA como carreadora, e possíveis interações com antifúngicos já existentes, a fim de se descobrir futuros ativos com propriedades antifúngicas.

## 8. ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

A atividade citotóxica foi avaliada usando o teste colorimétrico do MTT. Avaliação da atividade citotóxica é medida pelo efeito colorimétrico (figura 14) obtido através da redução de MTT (coloração amarelada) a formazana (coloração roxa). Desse modo, a redução do MTT a formazana, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. O

ensaio colorimétrico mede o número e a atividade das células vivas sob apoptose de células tumorais (MOSMANN, 1983)

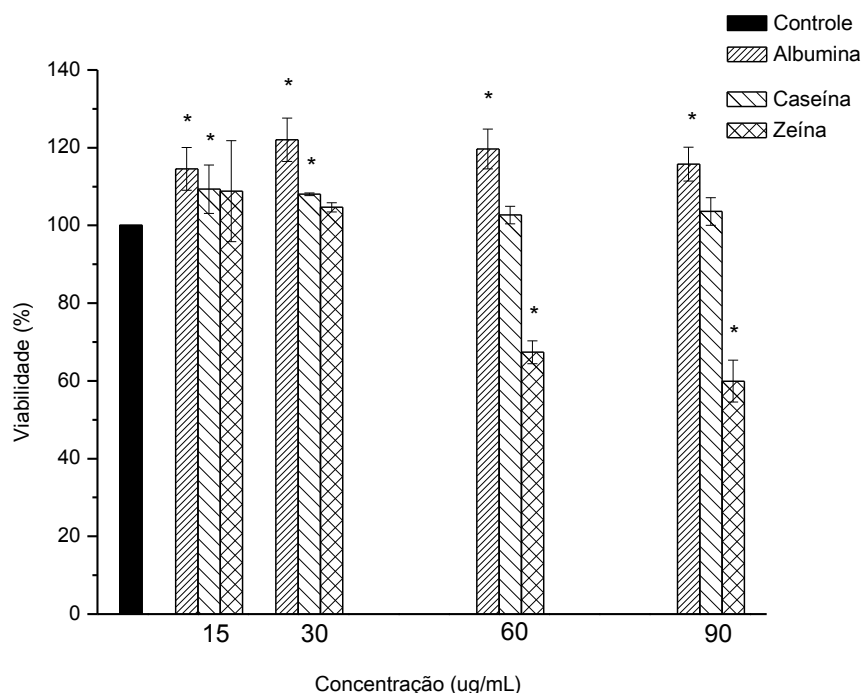
Figura 14: Efeito calorimétrico a partir da redução de MTT a formazana



Fonte: esquema elaborado pelo autor (2019)

A atividade citotóxica *in vitro* das NPs foi testada sob linhagem de células HEP-2 em diferentes concentrações (15, 30, 60 e 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas. Esses dados são apresentados na figura 15.

Figura 15: Atividade citotóxica em porcentagem de viabilidade celular das NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA frente à linhagem celular HEP-2 por 24 horas



Ao analisar os resultados das NPS-BSA, observa-se que a mesma não apresenta um efeito citotóxico, nas concentrações testadas. Os estudos realizados por LOMIS et al. (2016) demonstram que NPS-BSA contendo paclitaxel são uma interessante ferramenta para a terapia anticancerígena, devido sua eficácia e com o mínimo de efeitos colaterais indesejáveis, devido a não interferência entre polímero e possível composto antitumoral testado, aumentando ainda mais o seu efeito anticancerígeno *in vitro* e *in vivo* (LOMIS et al, 2016)

Assim como as NPS-BSA, as NPS-CSNA mantiveram seu perfil inerte quando submetidas ao estudo em todas as concentrações testadas. Shapira et al. (2012), destaca em seu estudo um potencial sistema de liberação de paclitaxel encapsulado em nanopartículas de  $\beta$ -caseína, testando sua citotoxicidade em células de carcinoma em um sistema gástrico humano, comprovando que as nanopartículas de  $\beta$ -caseína vazias são inertes quando submetidas a um sistema citotóxico, assegurando somente a eficácia do paclitaxel. Tornando-se viável como um sistema carreamento para liberação controlada (SHAPIRA et al., 2012)

Quanto aos resultados das NPS-ZNA, observa-se efeito sobre a linhagem de células Hep-2, nas concentrações 60 e 90 ug/mL. Zou et al (2012) desenvolveram nanopartículas zeína para encapsulamento de procianidinas de Cranberry através do método dispersão líquido-líquido e submetidas ao estudo citotóxico frente a células HL-60 de Leucemia promielocítica, nos quais foram testada a atividade citotóxica. As nanopartículas vazias de zeína incubadas com células HL-60, indicaram que sua citotoxicidade está relacionada com sua concentração. Além disso, as nanopartículas carregadas com procianidinas de Cranberry induziram o estágio inicial de apoptose, diminuindo a citotoxicidade das procianidinas nas células HL-60.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos resultados obtidos, pode-se concluir que os sistemas de NPS-ZNA, NPS-CSNA E NPS-BSA apresentaram tamanhos nanométricos com IPD inferiores a 0,3 e potencial zeta negativo. A atividade antioxidante mostrou que os resultados da porcentagem de inibição das NPS-CSNA sob o radical ABTS é superior quando comparado as NPS-ZNA e NPS-BSA. O ensaio antifúngico demonstrou que as NPS-BSA apresentaram uma menor eficácia com relação às NPS-ZNA e NPS-CSNA. Por fim, o ensaio citotóxico evidenciou que o sistema NPS-ZNA apresenta uma atividade cito-dependente nas concentrações de 60 e 90  $\mu\text{g/mL}$ . Com isso, os resultados demonstram que há necessidade de se realizar uma padronização das análises de sistemas nanoestruturados, tanto com as nanopartículas carregadas quanto vazias, visto que, dependendo do composto utilizado para a obtenção do sistema nanoestruturado e da concentração utilizada, pode haver resultados significativos no ensaio realizado.

.

## 10. CONCLUSÕES

- ✓ As NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA foram obtidas pelas técnicas de coacervação e dispersão líquido-líquido.
- ✓ Por meio das análises físico-químicas obtidas observou-se que as NPs apresentam formato esférico, diâmetro médio reduzido (nanométrico), IPD inferior a 0,3 e potencial zeta negativo.
- ✓ As atividades antioxidantes *in vitro* das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA sobre o radical ABTS<sup>•+</sup>, demonstraram que as NPS-CAS apresentam maior atividade sobre esse radical.
- ✓ A atividade das NPS-BSA, NPS-CSNA e NPS-ZNA com relação ao radical DPPH e HOCl, se mostraram similares, onde ambas as absorbâncias ficaram próximas ao valor do controle.
- ✓ A avaliação da atividade antifúngica mostrou que as NPS-BSA e NPS-CSNA apresentam uma atividade inferior relação às NPS-ZNA.
- ✓ A avaliação da atividade citotóxica mostrou que, NPS-CSNA E NPS-BSA não apresentam efeito sobre células Hep-2, nas concentrações testadas; as NPS-ZNA apresentam concentração-dependente efeito sobre essas células.

## REFERÊNCIAS

American Cancer Society. **Cancer Facts & Figure**, p. 1–56, 250 Williams Street, NW, Atlanta 2015.

AN, Fei-fei; ZHANG, Xiao-hong. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery. **Theranostics**, [s.l.], v. 7, n. 15, p.3667-3689, 2017. Ivyspring International Publisher.

A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. -Rio de Janeiro: **INCA**, 2006.

AHMAD, Aijaz et al. Antifungal activity of Coriaria nepalensis essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. **Yeast**, [s.l.], v. 28, n. 8, p.611-617, 13 jul. 2011. Wiley.

BALASAHEB, S.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, p. 27986–28006, 2015.

BARBER, Dustan A.; HARRIS, Steven R.. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A Review. **American Pharmacy**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.26-35, set. 1994. Elsevier BV.

BENDALE, Yogesh; BENDALE, Vineeta; PAUL, Saili. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. **Integrative Medicine Research**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.141-148, jun. 2017. Elsevier BV.

BORA, Anupama; MISHRA, Poonam. Characterization of casein and casein-silver conjugated nanoparticle containing multifunctional (pectin–sodium alginate/casein) bilayer film. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 53, n. 10, p.3704-3714, out. 2016. Springer Nature.

CASA, Diani Meza et al. Bovine Serum Albumin Nanoparticles Containing Amphotericin B: Characterization, Cytotoxicity and In Vitro Antifungal Evaluation. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.10183-10188, 1 dez. 2015. American Scientific Publishers

CHA, Dong Su; CHINNAN, Manjeet S.. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.223-237, jul. 2004. Informa UK Limited.

CHANG, Chao et al. Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 104, p.117-124, nov. 2017. Elsevier BV.

CHENG, Hao et al. Complexation of trans - and cis -resveratrol with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin or  $\alpha$ -lactalbumin. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 81, p.242-252, ago. 2018. Elsevier BVb.



CHO, Eun Jung et al. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.2093-2110, 21 mar. 2013. American Chemical Society (ACS).

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma aprovada**. 2.ed. Norma m27-A2 do CLSI. Pennsylvania, 2008. 51p.

DASHDORJ, Uyanga et al. Fabrication and characterization of electrospun zein/Ag nanocomposite mats for wound dressing applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 80, p.1-7, set. 2015. Elsevier BV.

DAVIS, Stephanie M.; PENNYPACKER, Keith R.. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 107, p.23-32, jul. 2017. Elsevier BV.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores (recurso eletrônico). p. 60, 2007.

ELZOGHBY, Ahmed; HELMY; SAMY. Novel ionically crosslinked casein nanoparticles for flutamide delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], p.1721-1732, maio 2013. Dove Medical Press Ltd.

ELZOGHBY, Ahmed O.; EL-FOTOH, Wael S. Abo; ELGINDY, Nazik A.. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 153, n. 3, p.206-216, ago. 2011. Elsevier BV.

ELZOGHBY, Ahmed O.; SAMY, Wael M.; ELGINDY, Nazik A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 157, n. 2, p.168-182, jan. 2012. Elsevier BV.

ESMAILI, Mansoor et al. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 44, n. 10, p.2166-2172, dez. 2011. Elsevier BV.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2018.

FERREIRA, A.I.a.; MATSUBARA, L.s.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.1-8, mar. 1997. Elsevier BV.

FONSECA, Dyenefer Pereira; KHALIL, Najeh Maissar; MAINARDES, Rubiana Mara. Bovine serum albumin-based nanoparticles containing resveratrol: Characterization and antioxidant activity. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 39, p.147-155, jun. 2017. Elsevier BV.

FUCHS-TARLOVSKY, Vanessa. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.15-21, jan. 2013. Elsevier BV.

GANTA, Srinivas et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 126, n. 3, p.187-204, mar. 2008. Elsevier BV.

GAO, Yu et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.761-777, jul. 2014. Elsevier BV.

GENG, Tao et al. Resveratrol-Loaded Albumin Nanoparticles with Prolonged Blood Circulation and Improved Biocompatibility for Highly Effective Targeted Pancreatic Tumor Therapy. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-10, 30 jun. 2017. Springer Nature

GÜÇBILMEZ, Çiğdem Mecitoğlu; YEMENICIOĞLU, Ahmet; ARSLANOĞLU, Alper. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. **Food Research International**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.80-91, jan. 2007. Elsevier BV.

HALLIWELL, Barry. Antioxidant characterization. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 49, n. 10, p.1341-1348, maio 1995. Elsevier BV.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J.. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, [s.l.], v. 25, n. 3-4, p.259-274, 29 jul. 2003. **Springer Nature**.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A.. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.813-829, 1 maio 2003. Bentham Science Publishers Ltd.

KIM, Bomi et al. Albumin nanoparticles with synergistic antitumor efficacy against metastatic lung cancers. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 158, p.157-166, out. 2017. Elsevier BV.

KITTLER, S. et al. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. **J. Mater. Chem.**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.512-518, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC).

KONG, Baohua; XIONG, Youling L.. Antioxidant Activity of Zein Hydrolysates in a Liposome System and the Possible Mode of Action†. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 16, p.6059-6068, ago. 2006. American Chemical Society (ACS).

KUMAR, Devendra et al. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. **Dairy Science & Technology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.391-404, 5 jan. 2016. Springer Nature.

KUMAR, Devendra et al. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. **Small Ruminant Research**, [s.l.], v. 139, p.20-25, jun. 2016. Elsevier BV.

KWON, Jeongil et al. Inflammation-Responsive Antioxidant Nanoparticles Based on a Polymeric Prodrug of Vanillin. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.1618-1626, 29 abr. 2013. American Chemical Society (ACS).

LANGER, K. et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 257, n. 1-2, p.169-180, maio 2003. Elsevier BV

LI, Kang-kang et al. Fabrication and Characterization of Novel Antimicrobial Films Derived from Thymol-Loaded Zein–Sodium Caseinate (SC) Nanoparticles. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 46, p.11592-11600, 9 nov. 2012. American Chemical Society (ACS).

LI, Kang-kang et al. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal Of Food Engineering**, [s.l.], v. 119, n. 2, p.343-352, nov. 2013. Elsevier BV.

LILIAN, L. et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p.418-426, 2004.

LIMA, Renata de; SEABRA, Amedea B.; DURÁN, Nelson. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Journal Of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.867-879, 13 jun. 2012. Wiley.

LIU, Huinan; WEBSTER, Thomas Jay. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.354-369, jan. 2007. Elsevier BV.

LOBO, V et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.118-126, 2010. Medknow.

LOHCHAROENKAL, Warangkana et al. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-12, 2014. Hindawi Limited.

LUO, Yangchao et al. Cellular Uptake and Transport of Zein Nanoparticles: Effects of Sodium Caseinate. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 31, p.7621-7629, 29 jul. 2013. American Chemical Society (ACS).

MOGHIMI, S. Moein; HUNTER, A. Christy; MURRAY, J. Clifford. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.311-330, mar. 2005. FASEB.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** v. 5, n.1, p. 561–573, junho, 2006.

MORA-HUERTAS, C.e.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 385, n. 1-2, p.113-142, jan. 2010. Elsevier BV.

NITTA, Sachiko; NUMATA, Keiji. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1629-1654, 14 jan. 2013. MDPI AG.

PALACIO, Juliana; OROZCO, Víctor H.; LÓPEZ, Betty L.. Effect of the molecular weight on the physicochemical properties of poly(lactic acid) nanoparticles and on the amount of ovalbumin adsorption. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.52-59, 2011.

PAN, Kang; ZHONG, Qixin; BAEK, Seung Joon. Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 25, p.6036-6043, 14 jun. 2013. American Chemical Society (ACS).

PANÁČEK, Aleš et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, [s.l.], v. 30, n. 31, p.6333-6340, out. 2009. Elsevier BV

PARK, Sung-woo et al. A Milk Protein, Casein, as a Proliferation Promoting Factor in Prostate Cancer Cells. **The World Journal Of Men's Health**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.76-82, 2014. Korean Society for Sexual Medicine and Andrology (KAMJE).

PARVEEN, Suphiya; MISRA, Ranjita; SAHOO, Sanjeeb K.. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.147-166, fev. 2012. Elsevier BV.

PATEL, Ashok R.; BOUWENS, Elisabeth C. M.; VELIKOV, Krassimir P.. Sodium Caseinate Stabilized Zein Colloidal Particles. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 23, p.12497-12503, 8 dez. 2010. American Chemical Society (ACS).

PEÑALVA, Rebeca et al. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 30, p.450-457, dez. 2015. Elsevier BV.

PERNA, A. et al. Effect of genetic type and casein haplotype on antioxidant activity of yogurts during storage. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 96, n. 6, p.3435-3441, jun. 2013. American Dairy Science Association.

PLANTIER, Jean-luc et al. Comparison of antioxidant properties of different therapeutic albumin preparations. **Biologicals**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.226-233, jul. 2016. Elsevier BV.

PODARALLA, Satheesh; PERUMAL, Omathanu. Influence of Formulation Factors on the Preparation of Zein Nanoparticles. **Aaps Pharmscitech**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.919-927, 26 jun. 2012. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS).

RADWAN, Mahasen A. et al. Oral administration of amphotericin B nanoparticles: antifungal activity, bioavailability and toxicity in rats. **Drug Delivery**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.40-50, jan. 2017. Informa UK Limited

RAVINDRAN, Aswathy et al. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.32-37, mar.

2010. Elsevier BV.

RAY, Paul D.; HUANG, Bo-wen; TSUJI, Yoshiaki. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.981-990, maio 2012. Elsevier BV.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 9-10, p.1231-1237, maio 1999. Elsevier BV.

REIS, Catarina Pinto et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.8-21, mar. 2006. Elsevier BV.

RIVAL, Sandrine G.; BOERIU, Carmen G.; WICHERS, Harry J.. Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoyxygenase Inhibition. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.295-302, jan. 2001. American Chemical Society (ACS)..

RODRIGUES, Tiago et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.531-541, 25 abr. 2016. Springer Nature.

RUMYANTSEV, Sergey. Hypothesis: Towards the origin of cancer epidemics and pathogenesis. **Journal Of Carcinogenesis**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.2-9, 2010. Medknow.

RUTENBERG, Avi; VINOGRADOV, Vladimir V.; AVNIR, David. Synthesis and enhanced thermal stability of albumins@alumina: towards injectable sol-gel materials. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 49, n. 50, p.5636-5638, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.726-737, out. 2003. FapUNIFESP (SciELO)

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian journal of food technology**. v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SHABESTARIAN, Hoda et al. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. **Materials Research**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.264-270, 22 dez. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

SHAZLY, Ahmed Behdal et al. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 232, p.753-762, out. 2017. Elsevier BV..

SHON, Mi-yae et al. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.659-666, abr. 2004. Elsevier BV.

SHUKLA, Rishi; CHERYAN, Munir. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.171-192, maio 2001. Elsevier BV.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.351-355, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO).

STONE, Neil R. H. et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. **Drugs**, [s.l.], v. 76, n. 4, p.485-500, 27 jan. 2016. Springer Nature.

STRAUSS, George; GIBSON, Suzanne M.. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.81-89, jan. 2004. Elsevier BV.

SUETSUNA, Kunio; UKEDA, Hiroyuki; OCHI, Hirotomo. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.128-131, mar. 2000. Elsevier BV.

TABATABAEE, Amir et al. Effect of Therapeutic Touch in Patients with Cancer: a Literature Review. **Medical Archives**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.142-147, 2016. ScopeMed International Medical Journal Management and Indexing System.

TANG, Ning; ZHUANG, Hong. Evaluation of Antioxidant Activities of Zein Protein Fractions. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v. 79, n. 11, p.2174-2184, 28 out. 2014. Wiley.

VEN, H. van de et al. PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.795-803, ago. 2012. Elsevier BV.

VENUGOPAL, K et al. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 167, p.282-289, fev. 2017. Elsevier BV.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.44-84, jan. 2007. Elsevier BV.

VURAL, I. et al. Transcription efficiency of tamoxifen citrate-loaded  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.339-342, 2005. Elsevier BV.

WANG, Qin; YIN, Leilei; PADUA, Graciela W.. Effect of Hydrophilic and Lipophilic Compounds on Zein Microstructures. **Food Biophysics**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.174-181, 1 abr. 2008. Springer Nature

WEBER, C et al. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 194, n. 1, p.91-102, jan. 2000.

Elsevier BV.

WU, Hui-chun; CHEN, Hua-ming; SHIAU, Chyuan-yuan. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, [s.l.], v. 36, n. 9-10, p.949-957, jan. 2003. Elsevier BV.

WU, Xuanjun et al. A self-referenced nanodosimeter for reaction based ratiometric imaging of hypochlorous acid in living cells. **Chem. Sci.**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.460-467, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).

WU, Yunpeng; LUO, Yaguang; WANG, Qin. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.283-290, out. 2012. Elsevier BV.

ZHOU, Yi et al. Fluorescence turn-on detection of hypochlorous acid via HOCl-promoted dihydrofluorescein-ether oxidation and its application in vivo. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 48, n. 39, p.4677-4679, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

ZHANG, Shuangling; HAN, Yue. Preparation, characterisation and antioxidant activities of rutin-loaded zein-sodium caseinate nanoparticles. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.1-13, 26 mar. 2018. Public Library of Science (PLoS).

ZHANG, Yaqiong et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 142, p.269-275, jan. 2014. Elsevier BV.

ZHAO, D. et al. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], p.669-667, set. 2010. Dove Medical Press Ltd

ZHOU, Qingyu; BENNETT, Lunawati L; ZHOU, Shufeng. Multifaceted ability of naturally occurring polyphenols against metastatic cancer. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.394-409, 16 mar. 2016. Wiley.

ZOU, Tao et al. Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.293-300, jun. 2012. Elsevier BV.

ZIMET, Patricia; ROSENBERG, Dina; LIVNEY, Yoav D.. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1270-1276, jul. 2011. Elsevier BV.