UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ/UNICENTRO

IRINEO KELTE FILHO

NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA CONTENDO HESPERIDINA REVESTIDAS COM QUITOSANA

Guarapuava
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ/UNICENTRO

IRINEO KELTE FILHO

NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA CONTENDO HESPERIDINA REVESTIDAS COM QUITOSANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química sob a orientação da **Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia**, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química pelo curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO.

GUARAPUAVA

2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, por ser minha fortaleza em todos os momentos de dificuldades e me abençoar com dádivas que recebi ao longo da minha existência, colocando pessoas extraordinárias em minha caminhada e permitindo que eu estivesse hoje aqui realizando esse sonho.

À Nossa Senhora, por ser minha Mãe no céu e intercessora na minha caminhada de fé, me protegendo e guiando sempre.

Aos meus pais, as pessoas que mais amo nessa terra, por terem cuidado de mim, me criado, me amado, me ensinado valores que carregarei por toda minha vida e me tornaram o homem que sou hoje. Agradeço também por todo o incentivo e apoio que recebi para estar nessa carreira acadêmica. Isto não seria possível sem vocês.

Aos meus irmãos Natali e Ludovico, por cada vez que mostraram o significado da palavra família, vivendo fraternalmente, muito obrigado pelo apoio demonstrado diariamente, me "suportando" inúmeras vezes em momentos difíceis.

À minha esposa Karolaine, pelo grande amor, companheirismo e paciência nos momentos difíceis que enfrentamos juntos, sempre me incentivando a concluir esse sonho do Doutorado, estando certos que nossa caminhada juntos está apenas se iniciando.

Aos meus avós Ludovico (*in memoriam)* e Flora (*in memoriam),* com quem convivi toda minha infância e tive muitas aprendizagens, estarão sempre em minhas lembranças e em meu coração.

Ao meu tio Iranor *(in memoriam)*, por todas as conversas que tivemos, sempre me incentivando a buscar o conhecimento através da ciência e a fazer o bem aos outros, sempre sendo bem humorado, alegrando a todos.

À minha tia Leoni e às minhas primas Liliane e Heloisa, por terem me acolhido nesta cidade durante vários anos de meus estudos, sem o quais meu Doutorado não seria possível, muito obrigado pela acolhida, serei eternamente grato.

À todos os familiares que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, tem minha gratidão.

Aos amigos e colegas do laboratório LabGati e Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, por me ajudarem inúmeras vezes e serem amigos tão leais, estando sempre ao meu lado quando precisei.

Agradeço a todos do Ministério Universidades Renovadas (MUR) e do GOU Seu Amor é Demais (SAD), meus amigos que me ajudaram nessa caminhada, onde através da fé nos tornamos irmãos.

Agradeço também a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Química pelos ensinamentos, orientações e sugestões.

Um agradecimento especial à minha orientadora Dra. Sueli Pércio Quináia, por toda sua paciência, zelo e dedicação durante todos esses anos em que me orientou. Muito obrigado pela oportunidade de realizar esta pesquisa sob sua orientação. Levarei para sempre todos os aprendizados e conselhos que recebi. Terei sempre uma eterna dívida de gratidão para com a senhora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante o doutorado.

À UNICENTRO e ao Programa de Pós-graduação em Química.

Finalmente, a todas as pessoas que de alguma forma me incentivaram e ajudaram para que a realização deste projeto fosse possível.

" Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma."

Antoine Lavoisier

"Na fé ecoa o eterno presente de Deus, que transcende o tempo, mas que só pode ser acolhida no nosso hoje, que não torna a repetir-se".

Bento XVI

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade".

Marie Curie

RESUMO

A Hesperidina é um dos principais flavonoides presentes em frutas cítricas. Esse composto apresenta diversas propriedades benéficas, dentre elas propriedades antitumorais. No entanto, a hesperidina é rapidamente hidrolisada e uma das formas de proteger esse composto é a sua nanoencapsulação. Neste estudo, nanopartículas à base de gliadina contendo hesperidina foram obtidas pela técnica de dessolvatação e um delineamento fatorial 3^2 foi empregado para otimizar a formulação. As variáveis independentes foram definidas como concentração de $CaCl_2$ (0,5; 1 ou 2%) e agente estabilizador (Pluronic F68, Tween 80 ou caseínato de sódio). As variáveis dependentes foram diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Para determinar o teor de hesperidina no meio foi desenvolvido e validado um método para a determinação de Hesperidina empregando espectroscopia de absorção molecular por UV-visível. O método mostrou-se linear na faixa de 0,27 a 100 mg/L com LD = 0,01 mg/L e LQ = 0,01 mg/L, exato com recuperações variando de 98,8 ± 4,8 até 104,2 ± 4,8 e preciso com RSD de 3,4 %. O método se mostrou eficiente para a determinação do composto livre em suspensão de nanopartículas. A formulação otimizada foi revestida com quitosana para aumentar a estabilidade física das nanopartículas. As nanopartículas finais apresentaram diâmetro médio de 321 nm e índice de polidispersão de 0,217 e forma ovalada. Após o revestimento, o potencial Zeta foi de +21 mV e a eficiência de encapsulação foi de 73%. O perfil de liberação *in vitro* mostrou que cerca de 98% do fármaco foi liberado das nanopartículas após 48 h. Além disso, as nanopartículas reduziram a citotoxicidade da hesperidina em células saudáveis (células Vero) e aumentaram a citotoxicidade em células tumorais (células HeLa, PC-3 e Caco-2). Os resultados mostraram que as nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana são potenciais carreadoras para a entrega de hesperidina em possíveis tratamentos.

Palavras-chave: nanopartículas proteicas; hesperidina; citotoxicidade; antitumorais; validação de método.

ABSTRACT

Hesperidin is one of the main flavonoids present in citrus fruits. This compound has several beneficial properties, including antitumor properties. However, hesperidin is rapidly hydrolyzed and one of the ways to protect this compound is its nanoencapsulation. In this study, gliadin-based nanoparticles containing hesperidin were obtained by the desolvation technique and a 3^2 factorial design was used to optimize the formulation. Independent variables were defined as $CaCl_2$ concentration (0.5; 1 or 2%) and stabilizing agent (Pluronic F68, Tween 80 or sodium caseinate). The dependent variables were mean diameter, polydispersion index, zeta potential and encapsulation efficiency. To determine the hesperidin content in the medium, a method for the determination of Hesperidin using UV-visible molecular absorption spectroscopy was developed and validated. The method was linear in the range of 0.27 to 100 mg/L with LD = 0.01 mg/L and LQ = 0.01 mg/L, exact with recoveries ranging from 98.8 ± 4.8 to 104 .2 ± 4.8 and accurate with 3.4% RSD. The method proved to be efficient for the determination of the free compound in suspension of nanoparticles. The optimized formulation was coated with chitosan to increase the physical stability of the nanoparticles. The final nanoparticles had a mean diameter of 321 nm and a polydispersion index of 0.217 and an oval shape. After coating, the Zeta potential was +21 mV and the encapsulation efficiency was 73%. The in vitro release profile showed that about 98% of the drug was released from the nanoparticles after 48 h. Furthermore, the nanoparticles reduced the cytotoxicity of hesperidin in healthy cells (Vero cells) and increased the cytotoxicity in tumor cells (HeLa, PC-3 and Caco-2 cells). The results showed that chitosan-coated gliadin nanoparticles are potential carriers for the delivery of hesperidin in possible treatments.

Keywords: protein nanoparticles; hesperidin; cytotoxicity; antitumors; method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Representação esquemática de A) nanocápsula e B) nanoesfera 16
Figura 2 – Representação da estrutura química da Gliadina 18
Figura 3 – Estrutura molecular da hesperidina.....19
Figura 4 – Representação da estrutura química da Quitosana 21
Figura 5 – Fluxograma do procedimento de obtenção de nanopartículas de gliadina contendo hesperidina.....29
Figura 6 – Microscopias das NPS-Gqs e NPS-Gqs/HES. (A) NPS-Gqs, (B) NPS-Gqs/HES e (C) NPS-Gqs/HES ampliada 50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de Interação para Diâmetro Médio 41
Gráfico 2 – Gráfico de Interação para Índice de Polidispersão 42
Gráfico 3 – Gráfico de Interação para Eficiência de Encapsulação.....43
Gráfico 4 – Gráfico de Interação para Potencial Zeta 44
Gráfico 5 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Diâmetro Médio.....51
Gráfico 6 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Índice de Polidispersão 52
Gráfico 7 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Potencial Zeta 53
Gráfico 8 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Teor de Hesperidina Encapsulada. 54
Gráfico 9 – Perfil de liberação da Hesperidina NPS-Gqs/HES em tampão PBS pH=7,4.....55
Gráfico 10 – Viabilidade Celular de células Vero tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações. 57
Gráfico 11 – Viabilidade celular de células Hela tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações 58
Gráfico 12 – Viabilidade Celular de células PC3 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações. 59
Gráfico 13 – Viabilidade Celular de células Caco-2 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações. 60
Gráfico 14 – Viabilidade Celular de células HT-29 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação de Delineamento Fatorial 3^2 utilizando as variáveis Concentração de $CaCl_2$ (C) e Estabilizador (E).....31
Tabela 2 – Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação de nanopartículas obtidas segundo o delineamento fatorial 3^2.....39
Tabela 3 – Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança 47
Tabela 4 – Resultados dos valores de LD e LQ para as determinações de Hesperidina por espectroscopia UV-VIS 48
Tabela 5 – Valores de média e RSD para o estudo de repetitividade e precisão intermediária na determinação de Hesperidina (50 mg/L).....48
Tabela 6 – Resultados da porcentagem recuperada de hesperidina em amostra de nanopartículas vazias nos níveis de 1,0 e 10,0 mg/L.....49
Tabela 7 – Valores de CC_{50} de Hesperidina livre e Hesperidina carregadas em nanopartículas em células Vero após 72 h. Valores de IC_{50} de Hesperidina livre e Hesperidina carregada em nanopartículas nas células HeLa, PC3, Caco-2 e HT-29 após 72 h.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

ACP - Análise de Componentes Principais

HPLC - High Performance Liquid Cromatography

ICH - International Conference on Harmonisation

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

NATA - National Association of Testing Authorities

NPS-Gqs – Nanopartículas de Gliadina revestidas com Quitosana

NPS-Gqs/HES - Nanopartículas de Gliadina contendo Hesperidina revestidas com Quitosana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 Nanopartículas 16
2.2 Gliadina 17
2.3 Hesperidina 19
2.4 Quitosana 21
2.5 Métodos de preparação de nanopartículas proteicas 22
2.5.1 Dessolvatação 22
2.5.2 Emulsão 22
2.5.3 Electrospray 23
2.6 Validação de método Analítico 23
2.6.1 Linearidade 24
2.6.2 Limite de Detecção (LD) 24
2.6.3 Limite de Quantificação (LQ) 25
2.6.4 Precisão 26
2.6.5 Exatidão 26
3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS 28
3.1 Objetivo Geral 28
3.2 Objetivos Específicos 28
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 Protocolo de obtenção de nanopartículas de gliadina contendo hesperidina 29
4.2 Delineamento Fatorial 30
4.3 Protocolo para revestimento com Quitosana 31
4.4 Validação de método espectrofotométrico para determinação de Hesperidina livre em dispersão coloidal de nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana 32
4.4.1 Curvas de Calibração 32
4.4.2 Linearidade 32
4.4.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) 33
4.4.4 Precisão 33

4.4.5 Exatidão 34
4.5 Caracterização físico-química das nanopartículas 34
4.5.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas. 34
4.5.2 Determinação do Potencial Zeta 34
4.5.3 Eficiência de encapsulação (EE%).....35
4.5.4 Morfologia.....35
4.5.5 Estabilidade das nanopartículas de gliadina carreadoras de hesperidina.....35
4.5.6 Determinação do perfil de liberação in vitro da hesperidina a partir das nanopartículas de gliadina 36
4.5.7 Protocolo de estabilidade em fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS).....36
4.5.8 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo hesperidina sobre linhagens tumorais e células vero 37
4.5.8.1 Cultura Celular 37
4.5.8.2 Ensaio de citotoxicidade.....37
4.6 Análise dos dados e estatística 38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
5.1 Obtenção das nanopartículas de gliadina contendo hesperidina 39
5.2 Revestimento das nanopartículas com quitosana.....44
5.3 Validação de metodologia analítica por espectroscopia por UV-visível para quantificação de hesperidina nas nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana 46
5.3.1 Linearidade.....47
5.3.2 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ) 47
5.3.3 Precisão e Repetitividade.....48
5.3.4 Exatidão 49
5.4 Caracterização físico-química das nanopartículas 49
5.4.1 Morfologia.....49
5.4.2 Estabilidade das nanopartículas de gliadina carreadoras de hesperidina.....50
5.5 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da hesperidina a partir das nanopartículas de gliadina 55

5.6 Estabilidade em fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS) 56
5.7 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo hesperidina sobre linhagens tumorais e células vero 56
5.7.1 Células Vero 56
5.7.2 Células Hela 57
5.7.3 Células PC-3 58
5.7.4 Células Caco-2 59
5.7.5 Células HT-29 60
5.8 Análise da citotoxicidade a partir dos valores de CC_{50} 61
5.8.1 Células Vero 63
5.8.2 Células Hela 63
5.8.3 Células PC-3 64
5.8.4 Células Caco-2 64
5.8.5 Células HT-29 64
5.9 Conclusões da análise da citotoxicidade 65
6 CONCLUSÕES 66
REFERÊNCIAS 67
ANEXOS 76

1 INTRODUÇÃO

A hesperidina é um composto subproduto do cultivo de plantas cítricas, sendo um flavonoide encontrado principalmente na laranja e também no limão em menores quantidades. Além disso, a hesperidina é um composto abundante e barato, sendo um glicosídeo da sua forma aglicona hesperitina (GARG et al., 2001).

O composto hesperidina, assim como outros flavonoides, apresenta um potencial anti-infeccioso e anti-replicativo *in vitro* contra alguns microorganismos. Além disso, a atividade anti-fúngica da hesperidina já foi reportada em alguns estudos (BAE; HAN; KIM, 1999; ROOHBAKHSH et al., 2014; VINUEZA et al., 2008).

Geralmente, os flavonoides são encontrados em sua forma livre (aglicona) ou conjugada a açúcares (glicosídeos). Quando presente nos alimentos, os flavonoides estão na forma glicosídica e após serem ingeridos e ao chegarem ao intestino grosso passam para a forma aglicona. Os flavonoides das frutas cítricas, como a hesperidina e a naringinina, são absorvidos no trato gastrointestinal, após deglicosilação por bactérias intestinais. Após a degradação da hesperidina pelas enterobactérias, pesquisas apontam pequenas concentrações dos metabólicos da hesperidina no sangue, o que indica uma biodisponibilidade limitada deste composto. Dessa forma, a hesperidina, assim como outros flavonoides, é degradada no organismo, sendo encontrada em pequenas concentrações no sangue mesmo após uma grande ingestão. Devido a isso, apesar das diversas atividades farmacológicas *in vitro* descritas na literatura, a hesperidina possui eficácia terapêutica limitada quando administrada via oral (MANACH et al., 2003).

Uma alternativa para a melhorar a eficácia terapêutica da hesperidina, a partir do aumento do tempo de retenção no organismo e redução de efeitos adversos, é a utilização de sistemas nanocarreadores de fármacos, como as nanopartículas (DING et al., 2015; MA et al., 2001; ZHANG et al., 2012).

Desta forma, devido às diversas atividades farmacológicas descritas e aos poucos trabalhos na literatura que a apresentam sendo utilizada em formulações nanoencapsuladas, a hesperidina se mostrou mais promissora quando comparada com outros flavonoides.

Uma ampla variedade de materiais poliméricos pode ser utilizada nas formulações de nanopartículas. Dentre estes, os polímeros biodegradáveis são os preferíveis, devido ao seu baixo custo, biocompatibilidade, degradação espontânea no organismo e atoxicidade (RIBEIRO et al., 2013; WU, C. et al., 2000). Nanopartículas biodegradáveis, como as produzidas com proteínas, são muito estudadas como sistemas de liberação de fármacos, onde os sistemas preparados com proteínas podem ser promissores.

Neste trabalho, a proteína utilizada para a produção de nanopartículas foi a gliadina. A gliadina é uma proteína monomérica, solúvel em solução aquosa alcoólica. As características de hidrofobicidade e solubilidade da gliadina permitem o desenvolvimento de nanopartículas que possam proteger o encapsulamento e controlar a liberação de fármacos (JAHANSHAHI, 2008). Com relação às suas propriedades, essa proteína monomérica apresenta uma baixa solubilidade em água ou em soluções salinas neutras, e essa característica se deve ao seu elevado teor de aminoácidos apolares ácidos, tais como a glicina e prolina e baixa quantidade de aminoácidos de cadeias laterais ionizáveis, por outro lado, apresenta solubilidade em soluções hidroalcoólicas (70% v/v) e tem como aspectos principais a viscoelasticidade, espumabilidade e mucoadesão (BELITZ, GROSCH E SCHIEBERLE, 2009).

Nesse contexto, BANC et al. (2007) relataram que a gliadina possui alguns pontos positivos que favorecem sua utilização na indústria alimentícia e farmacológica como possível forma alternativa para substituição das proteínas de fonte animal que por sua vez possuem em sua composição príons, ou seja, moléculas com propriedades infectantes que podem provocar doenças. Entre essas vantagens destacam-se o baixo custo, oferta abundante por ser de origem vegetal e ainda possuir regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Em função desse caráter anfipático sua superfície pode ser muito ativa. Dessa forma, acredita-se que o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados possa melhorar a solubilidade da gliadina, permitindo dessa forma que a mesma seja uma alternativa viável para a encapsulação e entrega controlada de fármacos ou produtos naturais hidrofóbicos e anfifílicos via administração oral (ARANGOA et al., 2001).

Neste trabalho, nanopartículas de gliadina contendo hesperidina revestidas com quitosana foram produzidas pelo método de dessolvatação com posterior evaporação de solvente. As nanopartículas produzidas foram caracterizadas físico-quimicamente e biologicamente a partir da avaliação de suas propriedades antitumorais.

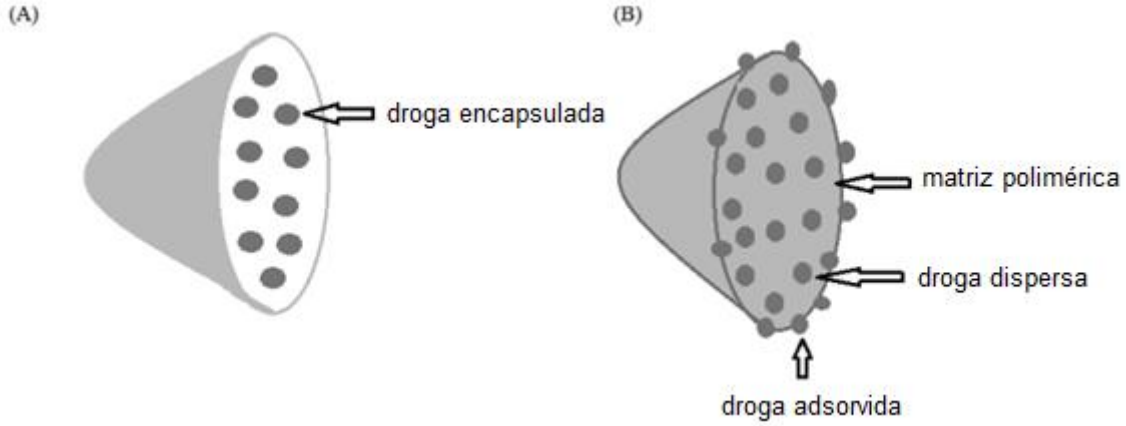
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanopartículas

Nanopartículas é o nome dado a estruturas compostas por nanoesferas e nanocápsulas, as quais possuem tamanho que varia entre 10 e 1000 nm. As nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica na qual o fármaco pode ser retido ou dissolvido, ou ainda adsorvido em sua superfície; já as nanocápsulas possuem uma camada externa polimérica e um núcleo interno no qual o fármaco também pode ser dissolvido ou adsorvido (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura dos dois tipos de nanopartículas encontrados.

Figura 1– Representação esquemática de A) nanocápsula e B) nanoesfera



Fonte: adaptado de Khalil et al. (2013)

As nanopartículas apresentam como características alta seletividade, o aumento na eficiência terapêutica, menor interação com outras drogas associadas, além de possuir baixa toxicidade. Como as nanopartículas são muito seletivas devido às células ou órgãos sítios específicos e a incorporação do fármaco nestas, ocorre uma redução nos efeitos adversos quando comparado ao fármaco livre (CHENG et al., 2012; YASSIN et al., 2010).

Polímeros biodegradáveis são utilizados normalmente em aplicações biomédicas, devido a sua biocompatibilidade e atoxicidade ao organismo (WU, C. et al., 2000). Além disso, a utilização destes polímeros permite uma alta estabilidade em fluídos biológicos e durante seu tempo de armazenamento (NIANPING et al., 2008).

Um biomaterial considerado biodegradável não deve ocasionar inflamação sustentada ou toxicidade de nenhum tipo, além de possuir um tempo de vida útil aceitável, ser degradado naturalmente e o tempo de degradação deve coincidir com o tempo de tratamento para o qual está sendo utilizado e possuir propriedades mecânicas e de permeabilidade adequadas ao seu propósito (NAIR; LAURENCIN, 2007).

2.2 Gliadina

A gliadina (Figura 2) é uma sub-unidade do glúten, que é uma proteína. O glúten é encontrado geralmente no trigo, cevada, centeio, entre outros. A característica da elasticidade do glúten é advinda da gliadina, presente no meio orgânico e aquo-orgânicos, sendo também responsável pela extensibilidade (MONTEIRO, 2004). As proteínas adicionadas aos solventes resultam que os grupos apolares se movam, pois a gliadina tem capacidade de se desenrolar (SCHEIBEL, 2012).

De modo geral, a gliadina apresenta massa molecular de 30.000 $g.mol^{-1}$ a 78.000 $g.mol^{-1}$, e em termos bioquímicos e genéticos, técnicas de mobilidade eletroforética demonstraram que essa proteína apresenta subfrações: α, β, γ e ω e estas podem sofrer deterioração em baixas temperaturas e, portanto são sensíveis a armazenagem por congelamento. A falta de resíduos de cisteína distingue os polipeptídios ω-gliadina. As outras frações incluem 6 (α e β) e 8 (γ) resíduos de cisteína, todos envolvidos em ligações dissulfetos intramoleculares (ANG et al., 2009, WANG et al., 2014).

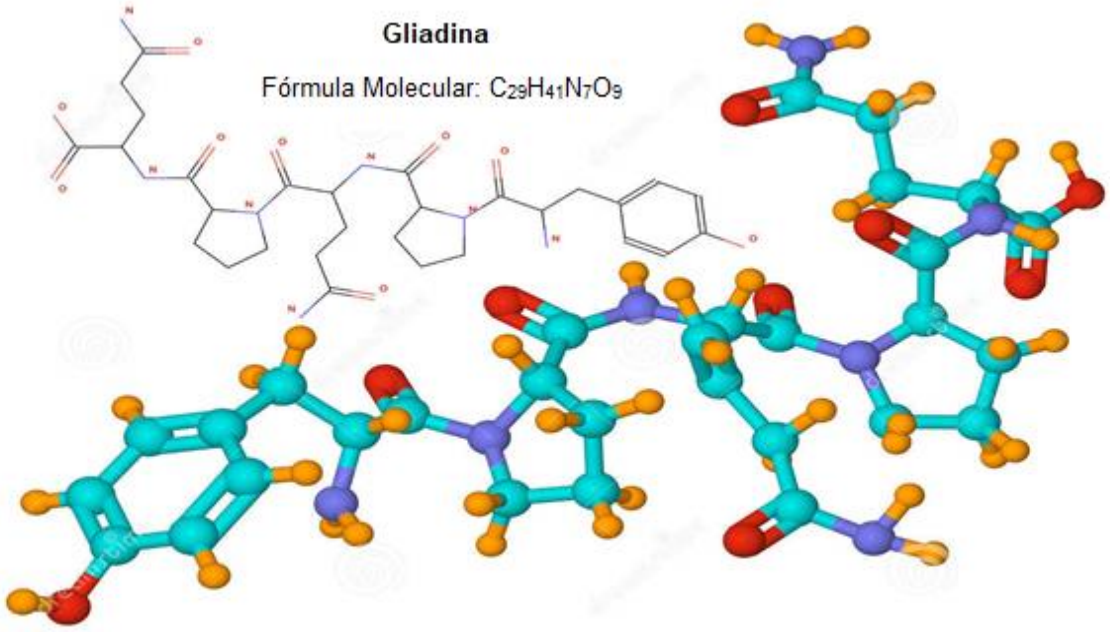
A forte capacidade adesiva da gliadina com a mucosa gastrointestinal pode ser explicada pela sua composição, uma vez que a gliadina é rica em resíduos neutros e lipofílicos e dessa forma os aminoácidos neutros promovem várias ligações de hidrogênio com a mucosa e os componentes lipofílicos interagem com o epitélio por meio de interações hidrofóbicas permitindo maior retenção e biodistribuição da

molécula nesse local (ARANGOA et al., 2001; UMAMAHESHWARI; RAMTEKE; JAIN, 2004).

Alguns pesquisadores relatam que após reação de desaminação ácida há aumento da solubilidade da gliadina em água e essa modificação aumenta a atividade superficial e exposição dos seus grupos hidrofóbicos e, portanto, esse tipo de estrutura flexível permite a essa proteína ligar-se fortemente com polifenóis e o que favorece seu uso como aditivo alimentar (BOURVELLEC; RENARD, 2012; QIU et al., 2013).

Cabe ressaltar que seu baixo conteúdo de aminoácidos carregados positivo e negativamente, faz da gliadina fracamente ionizada por toda faixa de pH e ainda favorece a agregação desordenada em soluções aquosas, assim sendo, o desenvolvimento de técnicas que empregam a interação de polissacarídeos e proteínas vegetais têm sido utilizadas para diminuir a aglutinação proteica e garantir tamanho reduzido das partículas (HU; MCCLEMENTS, 2015; LIANG et al., 2015; WU et al., 2018).

Figura 2 – Representação da estrutura química da Gliadina



Fonte: Site Dreamstime Free use

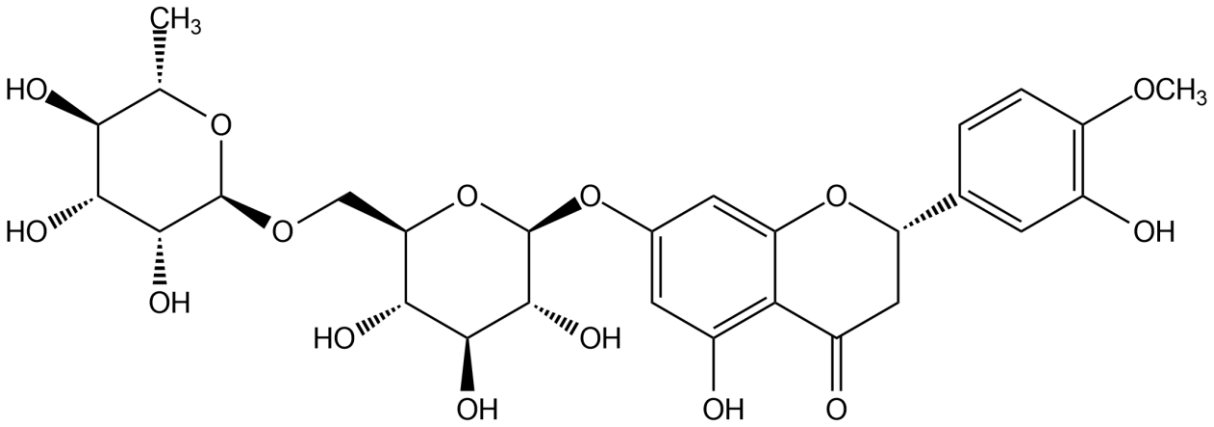
2.3 Hesperidina

A hesperidina é um flavonoide cítrico, classificado como uma flavanona glicosídica, com estrutura química constituída pela hesperitina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e a ramnose na posição 7 (YAMADA, et al., 2006). A hesperidina é encontrada naturalmente em frutas cítricas, principalmente no suco de laranja (MANTHEY et al., 2001). Apesar de ser reconhecida a importância biológica dos flavonoides cítricos, ainda não há recomendações para a ingestão (KNEKT et al., 2002).

A hesperidina está relacionada com múltiplas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral, hipolipidêmica, antitumoral, entre outras (GARG et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2004, BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Entretanto, apesar de apresentar muitos efeitos benéficos, a hesperidina é pouco solúvel em água, o que a torna pouco biodisponível para o organismo (YAMADA et al., 2006).

A Figura 3 apresenta estrutura molecular da hesperidina.

Figura 3 – Estrutura molecular da hesperidina



Fonte: Do autor (Adaptado de DrugBank)

Para tentar descrever a absorção da hesperidina, Booth (1958) citado por Garg, et. al (2001), fez um estudo em que homens brancos e saudáveis de 25 anos foram voluntários a tomar 500 mg da droga e a mesma quantidade de suco de laranja e uva. Após administração oral de ambas as formas, a quantidade detectada na urina dos

mesmos foi de menos de 25%, o que indicou a baixa biodisponibilidade da mesma. A hesperitina (aglicona) foi detectada tanto no plasma quanto na urina. Diante disso percebeu-se que flavononas cítricas passam por um processo de glucorinização antes de serem excretadas através da urina. A suplementação dietética com hesperidina tem sido realizada em pacientes que sofrem de desordens do sistema cardiovascular, como hematomas e varizes (GARG, et al., 2001).

A hesperidina é utilizada na medicina tradicional como um produto combinado com outro composto. A associação mais conhecida de hesperidina é o Daflon – 500 mg ®, que contém 50 mg de hesperidina e 450 mg de diosmina, que é outro flavonoide, diferenciando-se da hesperidina somente pela insaturação entre o C-2 e C-3 (GUILLOT et al., 1989).

A determinação de hesperidina em diferentes matrizes ocorre por técnicas utilizando HPLC, como demonstrado por Cheng et al. (2012) que determinou a concentração de hesperidina em plasma de ratos. Cheng et al. (2012) utilizou uma faixa de concentração de 0,1 a 25 $\mu g.mL^{-1}$ e apresentou LQ e LD nos valores de 0,11 e 0,035 $\mu g.mL^{-1}$ respectivamente. Também Saeidi et al. (2012) determinou a concentração de hesperidina e outros flavonoides utilizando técnica por HPLC em diversos sucos.

Também existem estudos demonstrando a determinação de hesperidina utilizando espectrofotometria de absorção molecular de UV-Vis, como demonstrado por Alegre (2014) que determinou hesperidina e outros compostos em sucos de laranja utilizando uma curva com faixa de concentração de 100 a 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Já Costa (2018), em seu estudo, determinou a concentração do composto hesperidina em diversas nanopartículas lipídicas utilizando técnicas de espectrofotometria molecular por UV-Vis.

Neste trabalho a determinação do composto hesperidina foi realizada utilizando espectrofotometria de absorção molecular de UV-Vis, devido ao seu baixo custo e menor tempo de análise quando comparado a técnicas utilizando HPLC, que são geralmente mais dispendiosas e de maior custo.

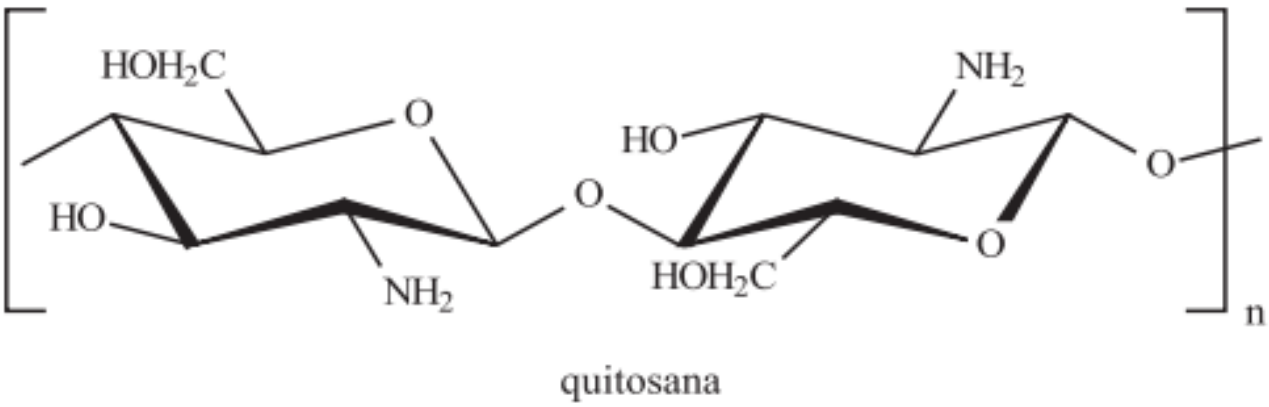
2.4 Quitosana

A quitosana (Figura 4) é um polissacarídeo amino, obtido através do processo de desacetilação da quitina, sendo encontrada na natureza principalmente em exoesqueletos de insetos e crustáceos. É um composto de custo acessível, atóxico, renovável e biodegradável, o que a torna um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente nas áreas médica e farmacêutica, sendo amplamente estudado para tais aplicações (AZEVEDO et al., 2007).

Devido à sua natureza policatiônica, a quitosana apresenta moldabilidade quando em contato com soluções ácidas, sendo amplamente demonstrada na literatura sua solubilidade em ácido acético em 1% (v/v). Outra característica química da quitosana consiste na possibilidade de modificações das estruturas a fim de obter diversas formas de interação química e resistência mecânica (MONTEIRO et al., 1999; TORRES et al., 2005).

A quitosana é utilizada para revestimento em sistemas nanocarreadores de diversos fármacos, melhorando a estabilidades dos sistemas e alterando positivamente o valor do potencial zeta, como relatado em seu trabalho por Pauluk et al. (2019).

Figura 4 – Representação da estrutura química da Quitosana



Fonte: adaptado de Assis e Silva (2003)

2.5 Métodos de preparação de nanopartículas proteicas

2.5.1 Dessolvatação

Esse método, também chamado de coacervação é o método mais usado na preparação de nanopartículas de proteínas, inclusive gliadina. Os efeitos da variação de vários fatores na formação de nanopartículas têm sido estudados, especialmente em nanopartículas de albumina, zeína e gliadina (LOHCHAROENKAL et al., 2014; WANG et al., 2008).

A dessolvatação é baseada na diferença da solubilidade de proteínas em solventes. O processo de dessolvatação reduz a solubilidade da proteína em um meio aquoso, o que leva à separação de fases, sendo importante a adição de um agente dessolvatante para a coacervação da proteína. Solventes orgânicos como acetona e etanol são utilizados como anti-solventes para a preparação de nanopartículas de proteínas (LANGER et al., 2003).

O método de dessolvatação foi utilizado neste trabalho devido as características dos componentes utilizados na produção das nanopartículas. Além disso, alguns outros trabalhos que utilizaram gliadina já reportaram a utilização do método de dessolvatação com posterior evaporação de solvente, como descrito por Arangoa et al. (2001) e Joye et al. (2015).

2.5.2 Emulsão

Neste método de preparação de nanopartículas por emulsão ou nanoemulsão, uma solução aquosa contendo a proteína é emulsionada em óleo utilizando um homogeneizador de alta velocidade ou emulsificador ultrassônico. As nanopartículas obtidas são formadas na interface água/óleo (YANG et al.,2007).

Apesar de ser um método bastante utilizado, geralmente o tamanho médio das nanopartículas preparadas por este método é maior do que o obtido pelo método de dessolvatação o que pode ser uma desvantagem para aplicações farmacêuticas (LOHCHAROENKAL et al., 2014; MULLER et al., 1996).

2.5.3 Electrospray

A produção de nanopartículas proteicas utilizando Electrospray é uma técnica relativamente recente quando comparada às outras técnicas existentes para preparação de nanopartículas proteicas.

Neste método de produção, uma alta voltagem é aplicada à uma solução contendo a proteína desejada. Essa solução é liberada através de um emissor que emite uma corrente de jato que forma gotículas de líquido aerossolizado. As gotículas aerossolizadas produzem nanopartículas de tamanho coloidal que são então coletadas e armazenadas de forma adequada para análises posteriores (GULFAM et al., 2012; WU et al., 2009).

2.6 Validação de método Analítico

Existem várias definições para validação de método analítico, dependendo da instituição que a define bem como dos parâmetros avaliados e as amostras analisadas. Essas diversas definições demonstram a amplitude da importância da validação do método em procedimentos analíticos.

De acordo com Valentini et al. (2007), a validação de procedimentos: " é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento novo e, inclusive, da metodologia analítica."

A validação de um método analítico incorpora o desenvolvimento, adaptação ou utilização de metodologia conhecida e a realização de um processo que avalie sua eficiência através de alguns parâmetros, entre eles: linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). Além disso, o objetivo da validação de determinado método analítico é demonstrar que ele é exato para a utilização a qual é destinado (ICH, 1996).

De acordo com a ANVISA (2003), a validação tem a função de garantir que determinado método esteja de acordo com as exigências das aplicações analíticas através de resultados experimentais, para que dessa forma a validação possa assegurar que os dados obtidos em uma análise com método validado sejam

confiáveis. Além disso, a validação garante que determinado método analítico apresente resultados reprodutíveis e confiáveis (MATIOLI et al., 2004).

Segundo a United States Pharmacopeia XXIV (2000), a validação de métodos analíticos é um processo realizado no laboratório que define quais parâmetros do método cumprem os requisitos necessários para as aplicações de análise confiáveis.

Os parâmetros de validação geralmente mais utilizados em uma otimização analítica e que foram analisados neste trabalho, especificadamente são: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

2.6.1 Linearidade

A linearidade está diretamente relacionada com a capacidade que um método analítico tem de obter resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito em determinada faixa de análise (BRITO et al., 2003). Geralmente, para o estudo da linearidade é recomendada a utilização de, pelo menos, de 5 concentrações diferentes do analito de interesse (ICH, 1996).

Após analisar visualmente os gráficos entre a concentração do analito e o parâmetro de medida do equipamento, deve-se observar a existência da relação linear entre os mesmos. Os resultados devem ser tratados por métodos estatísticos específicos que possam determinar alguns fatores, tais como os coeficientes de correlação linear e angular, a intersecção com o eixo Y, além da soma residual da regressão linear e o desvio padrão relativo (RSD%) da análise realizada (ANVISA, 2003). Para que um método apresente linearidade adequada, o coeficiente de correlação linear deve ser igual a um e o coeficiente angular deve ser diferente de zero (BRITO et al., 2003).

2.6.2 Limite de Detecção (LD)

De acordo com o ICH (1996): " O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser detectado de forma confiável." Desta forma, pode-se dizer que o limite de detecção é o menor valor de concentração do analito

encontrado em uma amostra que pode ser detectado, mas não automaticamente quantificado, nas condições experimentais realizadas (ANVISA, 2003).

Utilizando os valores de desvio padrão e da inclinação da curva analítica o valor de limite de detecção pode ser calculado através da Equação 1:

$$\mathrm{LD} = \frac{3\mathrm{SD}}{\mathrm{m}} \qquad (1)$$

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco
m: inclinação da curva de calibração

2.6.3 Limite de Quantificação (LQ)

De acordo com a ANVISA (2003), o limite de quantificação: "é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas". O limite de quantificação é um parâmetro de validação utilizado tanto para ensaios quantitativos de impurezas como para produtos de degradação em fármacos, sendo geralmente expresso em unidades de concentração do analito na amostra analisada (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (Equação 2) é determinado através da análise de amostras com diferentes concentrações de analito, no qual é determinado o menor valor em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis (ICH, 1996).

$$\mathrm{LQ} = \frac{10\ \mathrm{SD}}{\mathrm{m}} \qquad (2)$$

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco
m: inclinação da curva de calibração

2.6.4 Precisão

A precisão é a análise da proximidade dos valores obtidos em uma média de várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser avaliada através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A repetibilidade, também conhecida como precisão intra-corridas é a semelhança entre os resultados obtidos em um período curto de tempo em análises realizadas com o mesmo analista e mesma instrumentação, sendo que a repetibilidade do método deve ser verificada por, pelo menos, nove determinações (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária (dita como precisão inter-corridas) é expressa pela concordância entre os resultados obtidos em um mesmo laboratório, mas realizados em diferentes dias, com analistas e equipamentos diferentes, no qual o tempo mínimo indicado entre as análises é dois dias de diferença. Já a reprodutibilidade é expressa através da concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (ANVISA, 2003).

Os valores de repetitividade e precisão intermediária podem ser calculados pelos desvios padrão relativos (RSD%) utilizando a Equação 3 (AOAC, 2012):

$$\mathrm{RSDR} = \left(\frac{s}{x}\right) \times 100 \qquad (3)$$

Onde:

s é o desvio padrão da média das amostras;
x é a média das amostras.

2.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico apresenta a proximidade de concordância entre um valor teórico ou de referência aceito e o valor encontrado experimentalmente durante a análise. A exatidão pode ser calculada através da adição de padrão com valores de concentração conhecidos e determinados pelo analista. Para se encontrar a exatidão, é calculada a porcentagem que é recuperada da quantidade conhecida do

analito que foi adicionado à amostra. Também pode ser encontrada através da diferença porcentual entre as médias e o valor de que foi adicionado, sendo acrescido os intervalos de confiança (ANVISA, 2003; NATA, 2012). A Equação 4 apresenta a fórmula de como expressar a exatidão.

$$\text{Rec}\ (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100\% \qquad (4)$$

Onde:

$C1$: concentração do analito obtido após a fortificação;
$C2$: concentração do analito na amostra;
$C3$: concentração do analito adicionado à amostra.

3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar a atividade terapêutica de nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana carreadoras de hesperidina.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana contendo hesperidina pelo método de dessolvatação com posterior evaporação de solvente.
- Desenvolver e validar metodologia analítica por espectroscopia de absorção molecular de UV-Visível para quantificação de hesperidina em meio de liberação *in vitro.*
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas produzidas quanto ao seu diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, morfologia e estabilidade.
- Avaliar a liberação *in vitro* da hesperidina a partir das nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana carreadoras de hesperidina por espectroscopia de UV-visível.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas através de células vero.
- Avaliar a atividade antitumoral das nanopartículas produzidas.

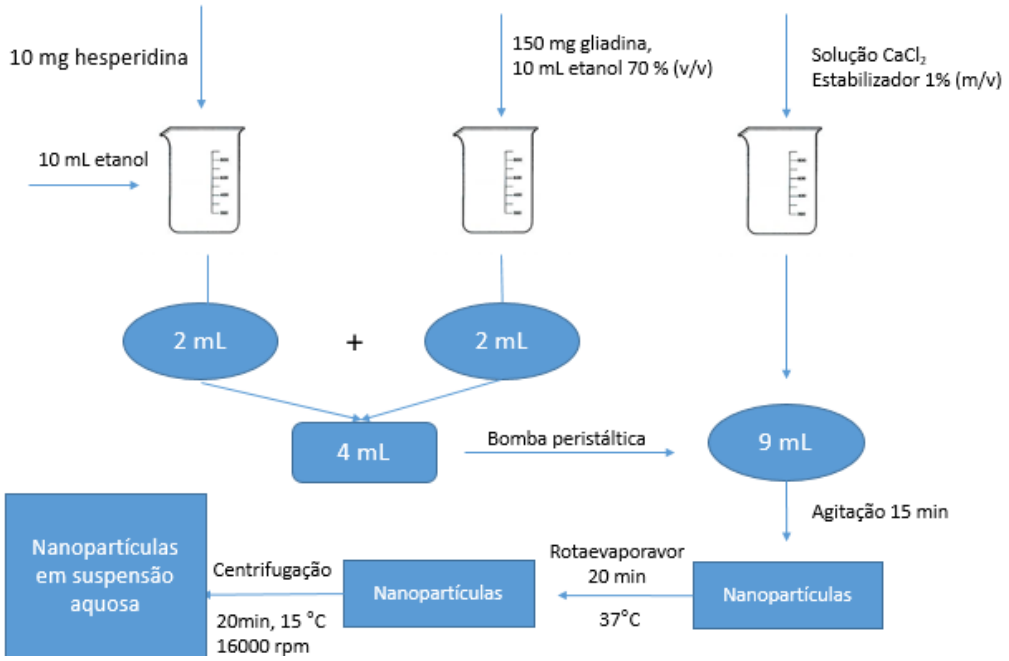
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados caseínato de sódio, gliadina, hesperidina e quitosana de baixo peso molecular (50.000–190.000 Da) (75–85% desacetilado) adquiridas da Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA). Também foram utilizados Pluronic F68, Tween 80 e $CaCl_2$ adquiridos da Biotec® (Brasil). O etanol foi adquirido da FMaia (Brasil) e ácido acético da marca Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA). A água foi purificada usando um sistema Milli-Q Plus (Millipore) com uma condutividade de 18 MΩ. Também foi utilizado Espectrofotômetro UV (UV-1800, Shimadzu Corporation., Ltd., Japan), uma bomba peristáltica (Ismatec), uma centrífuga refrigerada (Hermle).

4.1 Procedimento de obtenção de nanopartículas de gliadina contendo hesperidina

Primeiramente foram solubilizados 10 mg de hesperidina em 10 mL de etanol absoluto. Em seguida, foi solubilizado 150 mg de gliadina em 10 mL de etanol 70% (v/v). Também foi preparada uma solução aquosa contendo $CaCl_2$ e um estabilizador 1% (m/v). Na sequência foi adicionado 2 mL da solução com hesperidina em 2 mL da solução com gliadina. Então, foi vertida a solução resultante em 9 mL da solução aquosa com $CaCl_2$ e estabilizador com gotejamento utilizando uma bomba peristáltica. Em seguida, o sistema ficou 15 min sob agitação, sendo então levado ao rota-evaporador por 20 min a 37 °C, sendo finalmente centrifugado por 20 min a 16.000 rpm a 15 °C. O procedimento descrito foi adaptado e modificado a partir do trabalho publicado por Arangoa et al., (2001) e está representado em forma de fluxograma na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma do procedimento de obtenção de nanopartículas de gliadina contendo hesperidina



4.2 Delineamento Fatorial

Após constante pesquisa bibliográfica sobre o tema, buscou-se desenvolver um método de produção de nanopartículas de gliadina que apresentasse resultados satisfatórios quanto ao Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e Eficiência de Encapsulação da hesperidina das nanopartículas produzidas. Foi realizado um delineamento fatorial 3^2 utilizando o protocolo do item 4.1 para encontrar a melhor condição de produção das nanopartículas de gliadina, com o objetivo de verificar as influências das variáveis independentes na produção das nanopartículas de gliadina. As variáveis independentes avaliadas foram:

- Concentração de $CaCl_2$ (0,5 (C1); 1 (C2); 2 (C3)%(m/v));
- Estabilizadores: PLURONIC F68 (E1), TWEEN 80 (E2), CASEÍNATO DE SÓDIO (E3).

Quanto as variáveis dependentes, ou seja, aquelas as quais foram avaliados os resultados obtidos, foram:

- Diâmetro médio das partículas;
- Índice de polidispersão;
- Potencial zeta das partículas;
- Eficiência de encapsulação.

Dessa forma, o delineamento fatorial inicialmente proposto é apresentado na Tabela 1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e tiveram seus desvios padrão apresentados. Foram realizados 9 experimentos em triplicata, totalizando 27 experimentos.

Tabela 1 – Representação de Delineamento Fatorial 3^2 utilizando as variáveis Concentração de $CaCl_2$ (C) e Estabilizador (E)

Experimento	C1	C2	C3	E1	E2	E3
1	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+
4	-	+	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-	+
7	-	-	+	+	-	-
8	-	-	+	-	+	-
9	-	-	+	-	-	+

Fonte: Do autor

4.3 Procedimento para revestimento com Quitosana

Após a obtenção das nanopartículas, estas foram ressuspensas em 1 mL de solução de Quitosana 0,05% (m/v) e levadas para uma incubadora shaker por 1 h a 150 rpm e temperatura ambiente (37 °C). Previamente, a Quitosana foi solubilizada em ácido acético 1% (v/v), sendo filtrada e armazenada em geladeira. Após o período na incubadora, as nanopartículas foram centrifugadas por 20 min a 16000 rpm e 15 °C, sendo então ressuspensas em água e armazenadas na geladeira (Pauluk et al., 2019).

4.4 Validação de método espectrofotométrico para determinação de Hesperidina livre em dispersão coloidal de nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana

A espectroscopia de absorção molecular por UV-visível apresenta-se como uma alternativa interessante para a determinação do composto hesperidina. Essa técnica é relativamente rápida e de baixo custo comparada as cromatográficas. Com isso, foi realizada a validação de uma metodologia utilizando espectrofotômetro molecular de UV-Vis para a quantificação de hesperidina em meio de liberação *in vitro* utilizando os parâmetros analíticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Foi realizada uma varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, sendo que o comprimento de onda utilizado para validação foi 283 nm, no qual ocorreu a máxima absorção do composto hesperidina (GARG et al., 2001). Foi utilizada uma cubeta de quartzo com volume de 1 mL, ideal para a amostra, que se apresentou límpida. Com o método validado foi possível monitorar a quantidade da substância ativa na formulação farmacêutica.

4.4.1 Curvas de Calibração

Foram utilizadas curvas de calibração externa, em triplicata, para a determinação da hesperidina livre nas amostras. A curva analítica para quantificação da hesperidina foi realizada utilizando a faixa de concentração de 10 a 100 mg/L em solução etanólica 70% (v/v) devido a solubilidade da amostra em meio etanólico. Brancos analíticos foram preparados usando as nanopartículas vazias para mimetizar a matriz contendo a hesperidina, reproduzindo o processo de produção das nanopartículas e solubilizando em água ultrapura.

4.4.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas, a partir dos dados de calibração, realizou-se a análise de regressão linear e o teste de falta de ajuste, com um nível de confiança de 95%. O tratamento estatístico foi realizado utilizando o software Minitab (16.2.2). A linearidade foi calculada a partir de medidas em triplicata da curva analítica.

4.4.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Para calcular os limites de detecção e quantificação dos métodos foram realizadas 10 medidas do branco. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados pelo método da Curva Analítica, de acordo com o ICH (1996) utilizando as seguintes Equações 1 e 2:

$$\mathrm{LD} = \frac{3\mathrm{SD}}{\mathrm{m}} \quad (1)$$

$$\mathrm{LQ} = \frac{10\mathrm{SD}}{\mathrm{m}} \quad (2)$$

Onde:

SD: desvio padrão do sinal analítico de 10 medidas do branco
m: inclinação da curva de calibração

4.4.4 Precisão

A precisão do método foi analisada a partir do estudo da repetitividade e da precisão intermediária para o composto hesperidina. Para o teste de repetitividade, foram preparadas e realizadas três medidas das amostras durante o mesmo dia. Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram preparadas e medidas em triplicata, durante 3 dias consecutivos. Em amostras de nanopartículas vazias (sem hesperidina) foram adicionadas concentrações de 50 mg/L de hesperidina. Os valores de repetitividade e precisão intermediária foram calculados pelos desvios padrão relativos (RSD%) utilizando a Equação 3 (AOAC, 2012).

$$\mathrm{RSDR} = \left(\frac{\mathrm{s}}{\mathrm{x}}\right) \times 100 \quad (3)$$

Onde S: desvio padrão da média das amostras e x: média das amostras.

4.4.5 Exatidão

O parâmetro exatidão foi avaliado através de estudos de recuperação por adição do composto hesperidina em amostras contendo nanopartículas vazias. O composto hesperidina foi adicionado em dois níveis de concentrações conhecidos (1,0 e 10 $mg.L^{-1}$), sendo que as análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A exatidão foi avaliada a partir da taxa de recuperação (%), de acordo com a Equação 4 (NATA, 2011).

$$\text{Rec}\ (\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100\% \qquad (4)$$

Onde:

$C1$: concentração do analito obtido após a adição,
$C2$: concentração do analito na amostra e
$C3$: concentração do analito adicionado à amostra.

4.5 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.5.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas

Os parâmetros diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas foram avaliados por equipamento de espalhamento dinâmico de luz (BIC 90 Plus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY). Todas as medições foram realizadas em triplicata com um ângulo de espalhamento de 90 ° a 25 ° C e um comprimento de onda do laser fixado em 659 nm.

4.5.2 Determinação do Potencial Zeta

Para a análise do potencial Zeta (PZ) das dispersões de nanopartículas foi utilizado o método de anemometria de laser Doppler baseado na mobilidade eletroforética destas. As amostras foram diluídas em solução aquosa de KCl 1mM, para manutenção da constante iônica durante a medição, e acondicionadas em célula eletroforética a 25 ºC e com aplicação de ± 150 mV. Para cada amostra foram estabelecidas 3 determinações do potencial de superfície, seguido do cálculo da

média e desvio padrão. O potencial zeta foi avaliado através de um aparelho ZetaSizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), utilizado no Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia (CCMN) da UNICENTRO.

4.5.3 Eficiência de encapsulação (EE%)

A Eficiência de Encapsulação da hesperidina foi determinada indiretamente por espectrofotômetro de UV (UV-1800, Shimadzu Corporation., Ltd., Japão) a 283 nm. As amostras analisadas foram os sobrenadantes contendo a hesperidina não encapsulada resultante da ultracentrifugação das nanopartículas. A Eficiência de Encapsulação foi calculado de acordo com a Equação 5:

$$\mathrm{EE}(\%) = \frac{(\text{Total da hesperidina} - \text{Hesperidina presente no sobrenadante})}{\text{Total da hesperidina}} \times 100 \qquad (5)$$

4.5.4 Morfologia

A morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM - Hitachi, TM3000 XSTREAM2.). Uma gota de dispersão das nanopartículas, após secagem, foi recoberta com ouro coloidal sob vácuo e analisada a uma tensão de 10,0 kV para a obtenção das micrografias da amostra. O equipamento foi utilizado no laboratório do Centro de Pesquisas Avançadas Ambientais, Bioenergéticas e Biotecnológicas (Ambiotec) da UNICENTRO.

4.5.5 Estabilidade das nanopartículas de gliadina carreadoras de hesperidina

As nanopartículas produzidas foram avaliadas perante sua estabilidade em solução aquosa. O ensaio teve duração de 4 meses, nos quais foram avaliados parâmetros como diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial Zeta, em amostras acondicionadas em temperatura ambiente (25 °C) e refrigerado. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5.6 Determinação do perfil de liberação in vitro da hesperidina a partir das nanopartículas de gliadina

O perfil de liberação das nanopartículas foi obtido a partir da dissolução destas em um meio receptor em condições sink. Foi realizado pelo método de agitação em shaker, com subsequente ultracentrifugação (CASA et al., 2014). As nanopartículas de gliadina contendo 0,3 mg de hesperidina encapsulada foram dispersas em 1 mL da solução tampão PBS 50 mM, pH 7,4. As amostras foram então incubadas em shaker com agitação orbital a 37,5 ºC e 150 rpm. Em tempos de 1, 2, 4, 8, 24 e 48 horas as amostras foram centrifugadas por 20 min a 16000 rpm e 15 ºC, tendo o sobrenadante retirado e analisado por espectroscopia. O precipitado resultante de cada etapa foi ressuspenso e retornou à incubação. A quantidade cumulativa de hesperidina liberada das nanopartículas foi calculada pela Equação 6 (ITALIA et al., 2009). As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%\ \text{cumulativo} = \frac{Q1}{Q2} \times 100 \qquad (6)$$

Onde:

$Q1$: quantidade de hesperidina liberada no tempo (t)
$Q2$: quantidade inicial de hesperidina presente nas nanopartículas de gliadina

Para a determinação das concentrações de hesperidina foi utilizada a equação da reta da curva analítica obtida por espectroscopia UV-VIS em metodologia anteriormente validada e curvas do percentual cumulativo da hesperidina liberada *versus* tempo foram plotadas.

4.5.7 Protocolo de estabilidade em fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS)

Foi realizado pelo método de agitação em shaker, com subsequente ultracentrifugação (CASA et al., 2014) para avaliar a resistência das nanopartículas à liberação da hesperidina. Os fluidos gastrointestinais foram preparados de acordo com a metodologia proposta na Resolução 37 (Anvisa, 2003) com adição de enzimas. As

nanopartículas contendo 0,7 mg de hesperidina foram dispersas em 1 mL de fluído gástrico simulado com pH 1,2, sendo então incubadas em shaker a 37,5 ºC, 150 rpm, por 2h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 16000 rpm e 15 ºC, e então ressuspensas em 1 mL de fluído intestinal simulado com pH 6,8 sendo novamente incubadas por 4h e ultracentrifugadas nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6h. As amostras foram ultracentrifugadas e ressuspensas novamente nos meios a fim de manter o volume constante. O sobrenadante das ultracentrifugações foi analisado por espectroscopia utilizando o método descrito no item 4.4. a fim de quantificar a hesperidina liberada das nanopartículas.

4.5.8 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo hesperidina sobre linhagens tumorais e células vero

4.5.8.1 Cultura Celular

Células Vero; HeLa (adenocarcinoma do colo do útero humano); Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano) e o HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano) foram mantidos em DMEM suplementado com 10% de FBS a 37 ºC sob atmosfera de 5% de CO_2. As células PC-3 (adenocarcinoma da próstata humana) foram mantidas em meio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado com 10% de FBS a 37 sob atmosfera de CO_2 a 5%.

4.5.8.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade da hesperidina livre e encapsulada foi avaliada contra as seguintes linhas celulares: células Vero, HeLa, PC-3, Caco-2 e HT-29 utilizando o ensaio de viabilidade celular de redução de MTT. Este método baseia-se na capacidade das células de converter o sal de tetrazólio (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) de cor amarela num composto púrpura insolúvel, denominado formazan, que ocorre quando há capacidade mitocondrial integrada. A quantidade de formazan é determinada espectroscopicamente após a solubilização em DMSO (GRELA et al., 2018). As linhas celulares foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^5 células / mL numa placa de cultura de células de 96 poços

durante 24h a 37 °C, sob uma atmosfera com 5% de CO_2. Em seguida, a Hesperidina livre ou encapsulada foi adicionada em concentrações crescentes (0,1 - 500 µg / mL) por 72h. Após o tratamento, as células foram incubadas na presença de MTT (2 mg / mL) durante 4h a 37 °C. O sobrenadante foi removido e foi adicionado DMSO, e com a completa solubilização dos cristais de formazan a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em um espectrofotômetro de microplacas (Power Wave XS - Bio-Tek). A porcentagem que inibiu a absorbância de 50% em relação ao controle (CC_{50} ou IC_{50}) foi determinada. Também foi construído um gráfico da viabilidade celular versus concentração, para cada tipo de célula.

4.6 Análise dos dados e estatística

Os dados obtidos foram analisados através de testes utilizando os softwares estatístico Minitab 16.0, GraphPad Prism 8 e Scientist 3.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das nanopartículas de gliadina contendo hesperidina

Após a realização dos experimentos, de acordo com o protocolo apresentado no item 4.1. foram obtidos e analisados os seguintes dados referentes às nanopartículas produzidas em cada experimento do delineamento fatorial: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Dessa forma, os resultados obtidos no delineamento fatorial são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação de nanopartículas obtidas segundo o delineamento fatorial 3^2

Experimento	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
1	179,6 ± 23,32	0,255 ± 0,116	-7,43± 0,552	50,84 ± 5,06
2	177,9 ± 22,55	0,284 ± 0,126	-8,07± 0,529	58,02 ± 5,07
3	1857,5 ± 337,7	0,529 ± 0,041	-13,1± 2,21	87,21 ± 4,71
4	226,5 ± 30,97	0,098 ± 0,021	-2,91± 0,68	80,11 ± 1,15
5	2253,0 ± 262,7	0,692 ± 0,202	-14,9± 1,41	49,74 ± 0,83
6	1659,5 ± 481,0	0,641 ± 0,098	-11,2± 3,11	83,21 ± 0,79
7	257,4 ± 25,72	0,164 ± 0,55	-0,21± 0,013	55,26 ± 3,01
8	1415,6 ± 143,21	0,752 ± 0,188	-14,7± 3,23	58,25 ± 8,50
9	2591,2 ± 355,8	0,779 ± 0,028	-12,3± 2,61	80,04 ± 2,04

Fonte: Do autor

A partir dos dados obtidos, pode-se verificar que algumas variáveis independentes interferiram nos resultados, principalmente na variável dependente Diâmetro Médio, ou seja, a média do tamanho das nanopartículas de gliadina produzidas.

Observou-se que ao utilizar o caseínato de sódio, o tamanho das nanopartículas aumentou consideravelmente, estando na escala de micrômetro, o que não é desejável. Assim, pode-se considerar que os experimentos 3, 6 e 9, que continham caseínato de sódio, mostraram-se inadequados para esta pesquisa.

Já a utilização do estabilizador Tween 80® também proporcionou um aumento do tamanho das nanopartículas, exceto no experimento 2, onde o Diâmetro Médio foi de 177,9 nm, que apesar de adequado, apresentou um Índice de Polidispersão maior que 0,250, o que não o torna um experimento adequado. Dessa forma, os experimentos, 2, 5 e 8 também se mostraram inadequados para esta pesquisa.

Os melhores resultados foram encontrados quando se utilizou o Pluronic F68® como estabilizador, como pode-se observar nos experimentos 1, 4 e 7. Em um trabalho, Joye et al., (2015) utilizaram Pluronic F68® como estabilizador e obtiveram nanopartículas com tamanho médio de 187 ± 20 nm. Em outro trabalho presente na literatura, a utilização do Pluronic F68® forneceu nanopartículas com tamanhos 460 ± 19 nm, como demonstrado por Arangoa et al., (2001). Dessa forma, o Diâmetro Médio obtido neste trabalho no experimento 4 foi ainda menor, mostrando-se adequado.

Nesses experimentos, os tamanhos médios obtidos, foram de respectivamente 179,6; 226,5 e 257,4 nm. Esses experimentos produziram nanopartículas com tamanhos satisfatórios e apresentaram baixo desvio padrão, o que indica que são experimentos com alta reprodutibilidade. Dessa forma, com relação ao tamanho, esses experimentos se mostraram adequados. Dentre os experimentos 1, 4 e 7, somente o experimento 1 apresentou Índice de polidispersão maior que 0,250, ou seja, possui valor acima do desejável. Como relatado por Joye et al., (2015) que obtiveram 0,087 de Índice de polidispersão, valor baixos dessa variável apresentam nanopartículas com tamanhos mais similares, o que é desejável em estudos para utilização dessas nanopartículas.

Dentre os experimentos 4 e 7, que apresentam índices de polidispersão satisfatórios, o experimento 4 apresentou um potencial zeta de -2,91 mV, enquanto o experimento 7 apresentou um potencial zeta de -0,215 mV, ou seja, um valor muito perto da neutralidade, o que não é desejável. Arangoa et al., (2001) produziu nanopartículas de gliadina para carrear drogas lipofílicas, obtendo potencial zeta de 27,5 ± 0,8. Isso demonstra a importância de se obter potencial zeta com valores distantes da neutralidade.

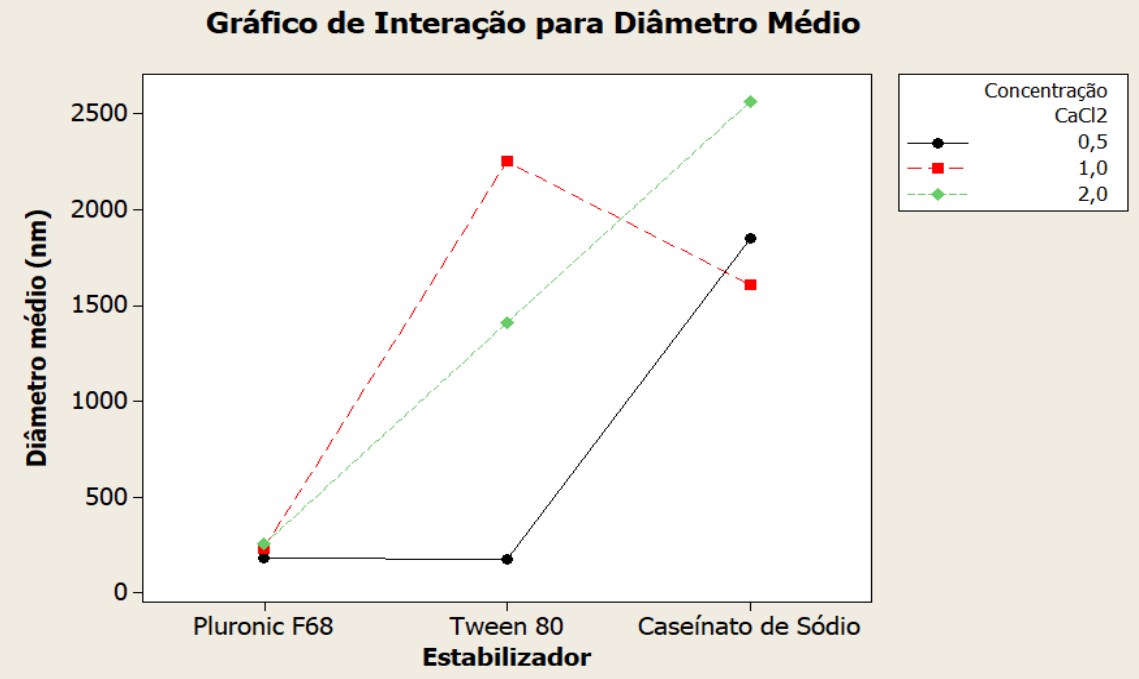
Com relação a eficiência de encapsulação, observou-se que os melhores resultados foram apresentados pelos Experimentos 3, 4 e 6, com eficiência de 87,21;

80,11 e 83,21% respectivamente. O Experimento 4 apresentou uma eficiência de encapsulação alta (80,11%).

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 3, observou-se que o melhor método foi o Experimento 4, pois apresentou um valor de Diâmetro Médio pequeno, bem como um baixo Índice de Polidispersão e valores de Potencial Zeta mais adequados quando comparado ao experimento 7. Além disso, o Experimento 4 apresentou uma Eficiência de Encapsulação elevada.

Para comprovar estatisticamente que o experimento mais adequado foi o 4, foram construídos gráficos utilizando o software Minitab a partir do delineamento fatorial. Os resultados estão apresentados na forma de gráficos de interação para Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão, Potencial Zeta e Eficiência de Encapsulação (Gráficos 1 a 4).

Gráfico 1 – Gráfico de Interação para Diâmetro Médio

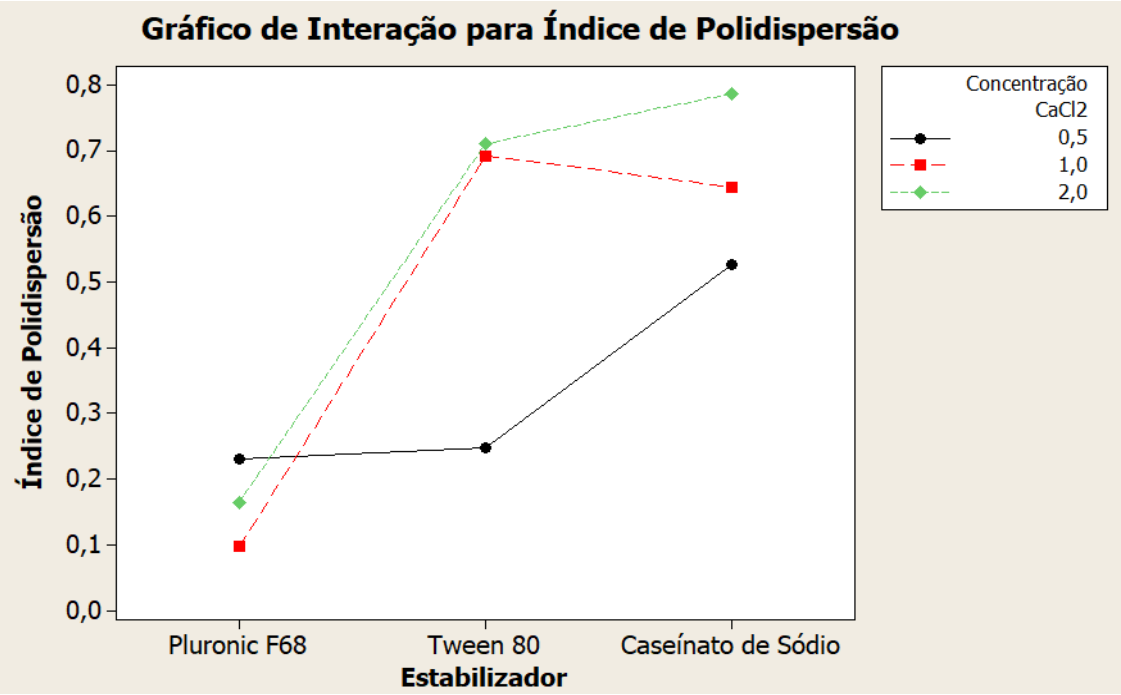


Fonte: Do autor

Como pode-se observar no Gráfico 1, os valores desejáveis para Diâmetro Médio (< 500 nm) foram encontrados utilizando o Pluronic F68 como estabilizador e em qualquer concentração de $CaCl_2$. Isto reforça a escolha do Experimento 4, que

utiliza o Pluronic F68 como estabilizador e o $CaCl_2$ na concentração de 1% (m/v). Arangoa et al., (2001) haviam utilizado Pluronic F68 como estabilizador e obtiveram valores de Diâmetro Médio abaixo de 500 nm, o que reforça essa escolha.

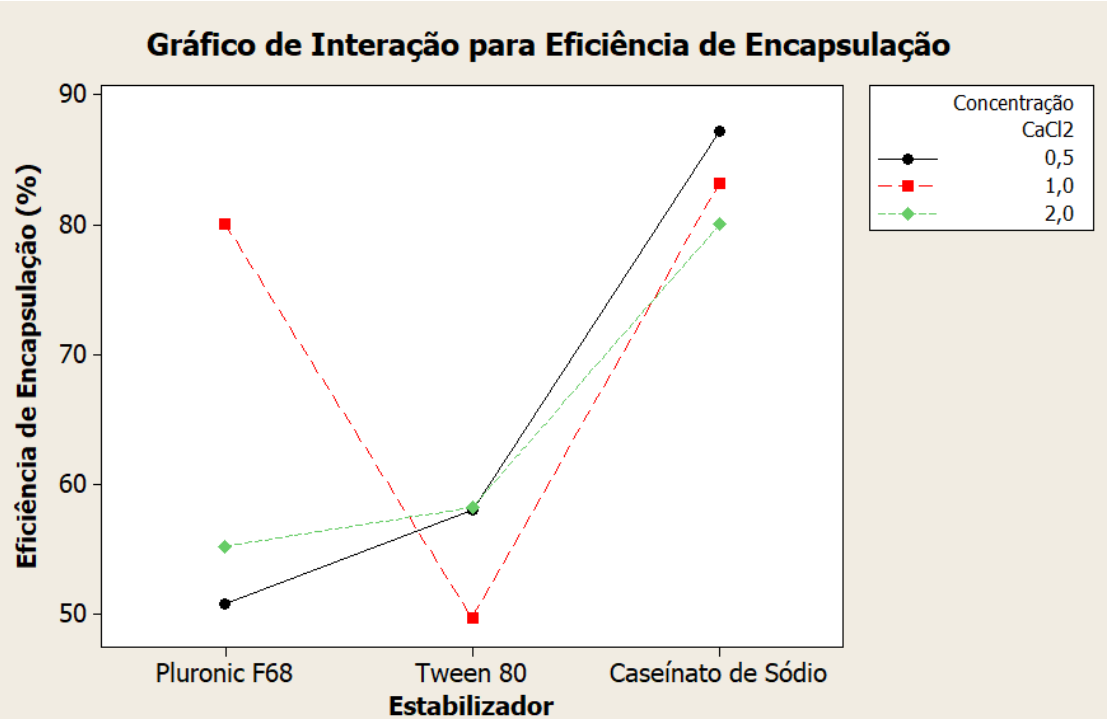
Gráfico 2 – Gráfico de Interação para Índice de Polidispersão



Fonte: Do autor

Ao observar o Gráfico 2, notou-se que os valores satisfatórios para Índice de Polidispersão (< 0,250) são encontrados quando utiliza-se o Pluronic F68 como estabilizador. A concentração de $CaCl_2$ que apresentou o menor Índice de Polisdispersão foi a de 1% (m/v). Ambos são as condições utilizadas no Experimento 4, o que confirma que o mesmo contém a condição ótima. Valores de Índice de Polidispersão baixos também foram descritos no trabalho de Joye et al., (2015) utilizando o Pluronic F68 como estabilizador.

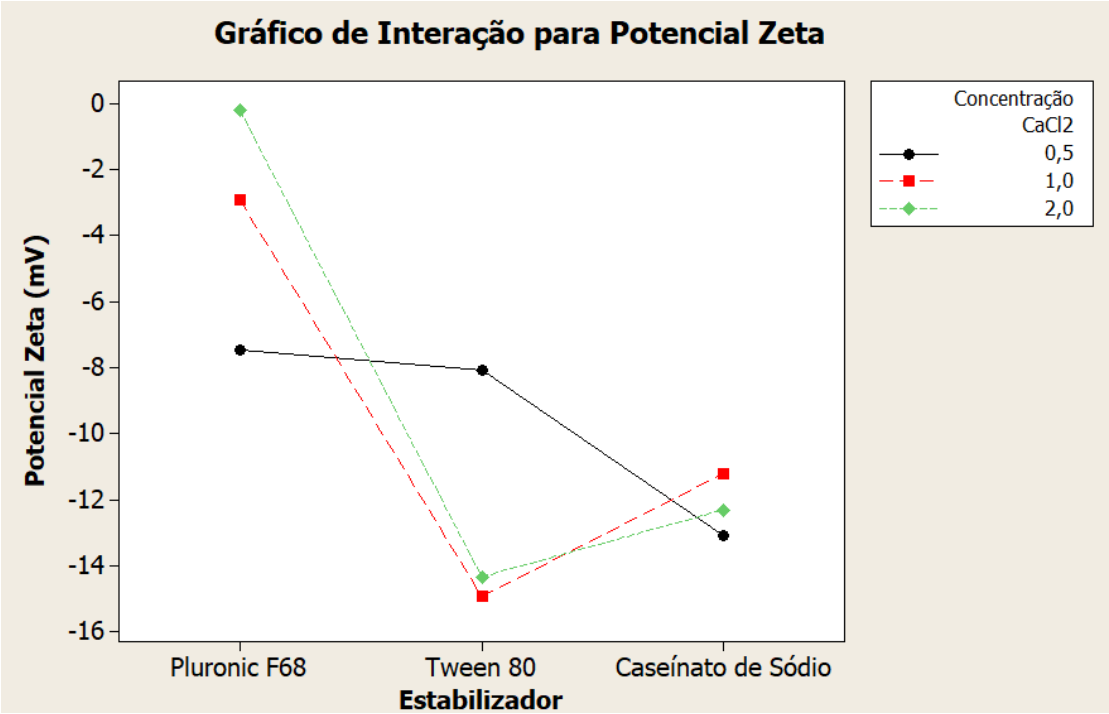
Gráfico 3 – Gráfico de Interação para Eficiência de Encapsulação



Fonte: Do autor

Com relação ao Gráfico 3, pode-se observar que a utilização do Pluronic F68 como estabilizador e o $CaCl_2$ na concentração de 1% (m/v) apresentaram Eficiência de Encapsulação em torno de 80%, sendo este valor satisfatório, indicando que uma porcentagem alta do composto hesperidina foi encapsulado pelas nanopartículas produzidas. Estes resultados corroboram que o Experimento 4 é o mais adequado. Lima et al., (2018) obtiveram eficiência de encapsulação de 60 % de ácido ferrúlico em nanopartículas de PLGA, sendo considerada uma eficiência adequada.

Gráfico 4 – Gráfico de Interação para Potencial Zeta



Fonte: Do autor

Com relação ao potencial zeta, como observado no Gráfico 4, pode-se concluir que as condições do Experimento 4 não foram as que apresentam maiores valores negativos de potencial. Entretanto, quando comparado ao Experimento 7 (-0,21 mV), o valor do potencial zeta obtido no Experimento 4 foi melhor (-2,91 mV). Potenciais zeta baixo tendem a favorecer a aglomeração das nanopartículas devido à baixa repulsão existente entre elas. O valor de potencial zeta pode explicar porque as nanopartículas podem ter afinidade com determinadas células que possuem potencial zeta que seja atraído pelo potencial zeta das nanopartículas (UMA MAHESWARI et al., 2001).

5.2 Revestimento das nanopartículas com quitosana

Como apresentado no item anterior, o Experimento 4 mostrou-se o mais adequado método para a preparação de nanopartículas de gliadina contendo hesperidina. As nanopartículas produzidas apresentaram Diâmetro Médio de 226,5 ±

30,97 nm, Índice de Polidispersão de 0,098 ± 0,021 e Eficiência de Encapsulação de 80,11 ± 1,15%, sendo esses valores adequados para os parâmetros analisados.

Entretanto, as nanopartículas produzidas utilizando o Experimento 4 apresentaram potencial zeta de -2,91± 0,68 mV, sendo esse um valor muito baixo, perto da neutralidade, o que não é desejável, pois devido a isso pode ocorrer aglomerações em função da fraca repulsão entre as nanopartículas. Esse fato pode comprometer a estabilidade das nanopartículas em solução. Dessa forma, buscou-se uma alternativa para elevar o potencial zeta das nanopartículas. A possibilidade escolhida foi o revestimento das nanopartículas utilizando quitosana, uma vez que essa metodología já foi descrita em trabalhos de Pauluk et al., (2019), aumentando o valor de potencial zeta das nanopartículas produzidas e melhorando sua estabilidade.

Utilizando o protocolo apresentado no item 4.3., as nanopartículas de gliadina contendo hesperidina foram revestidas com quitosana (0,05% m/v). Após o procedimento de revestimento as nanopartículas apresentaram Diâmetro Médio de 321,4 ± 39,6 nm, Índice de Polisdispersão de 0,217 ± 0,061, Potencial Zeta de + 21,4 ± 2,07 mV e Eficiência de Encapsulação de 73,1 ± 2,42%. Com relação a esses valores, pode-se observar que o Diâmetro Médio aumentou quando comparado com o valor obtido no Experimento 4, isto se deve pelo fato de o revestimento com quitosana ter sido realizado e uma camada de quitosana permaneceu ao redor das nanopartículas, aumentando assim o tamanho das mesmas. Com relação ao Índice de Polidispersão, observou-se um pequeno aumento quando comparado com o valor obtido sem o revestimento, isso se deve ao fato que o processo de revestimento é uma etapa a mais no processo, o que faz com que a dispersão do tamanho das nanopartículas aumente. O valor de Eficiência de Encapsulação diminuiu, mas ainda se mantém alto, o que não compromete a capacidade das nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana de encapsular o composto hesperidina. Com relação ao valor do Potencial Zeta obteve-se um valor adequado, o que demonstra que a estratégia de revestir as nanopartículas de gliadina com quitosana 0,05% (m/v) funcionou adequadamente, alterando o valor positivo do Potencial Zeta, o que aumenta a estabilidade das mesmas em solução, evitando assim agregação. O valor de potencial zeta obtido (+ 21,4 ± 2,07 mV) está próximo de outros valores

apresentados pela literatura, como relatado por Arangoa et al., (2001) que foi +27,5 ± 2,07 mV.

Dessa forma, as nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana contendo hesperidina serão doravante apresentadas como NPS-GQs/HES, sendo realizadas todas as outras caracterizações e ensaios utilizando essa nova formulação obtida. As NPS-GQs/HES produzidas foram armazenadas em triplicata para análises posteriores em temperatura ambiente e sob refrigeração (3-8 °C).

5.3 Validação de metodologia analítica por espectroscopia por UV-visível para quantificação de hesperidina nas nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana

Alguns estudos demonstram a validação de metodologias e a determinação de hesperidina em diversos meios utilizando técnicas cromatográficas. Entretanto, essas técnicas são de elevado custo e nem sempre acessíveis. Com a nova formulação obtida nesta pesquisa, isto é, a hesperidina ocluída em nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana, necessitou-se de um método analítico para avaliar a eficiência de sua encapsulação e quantificação. Vale ressaltar que não há na literatura nenhum estudo de validação de método analítico para determinar hesperidina em dispersão coloidal contendo nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana.

Nesse sentido, a espectroscopia de absorção molecular por UV-visível apresenta-se como uma alternativa interessante para a determinação do composto hesperidina. Essa técnica é relativamente rápida e de baixo custo quando comparada as cromatográficas. Foi realizada a validação de uma metodologia utilizando um espectrofotômetro UV-VIS com cubeta de quartzo para a quantificação de hesperidina em meio de liberação in vitro utilizando os parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. O comprimento de onda utilizado no equipamento foi 283 nm, no qual ocorre a máxima absorção do composto hesperidina (GARG et al., 2001).

5.3.1 Linearidade

A análise da linearidade em uma determinada faixa de trabalho corresponde à capacidade do método que está sendo validado em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse (RIBANI et al., 2004).

A fim de avaliar a linearidade da faixa de concentração estudada, foram construídas curvas de padrão externo para hesperidina utilizando a faixa de concentração entre 10 a 100 mg/L. Para esta curva analítica foram utilizados 5 pontos de concentrações diferentes de hesperidina.

Aplicou-se aos resultados obtidos a técnica de regressão linear no nível de 95% de confiança. Os resultados encontram-se na Tabela 3. Verificou-se que o modelo linear foi significativo para as faixas de concentração estudadas, pois os valores de $F_{regressão}$ foram maiores do que os valores de $F_{crítico\ (0,05;\ 1,\ 13)}$ = 4,67 e os valores de *p* foram menores do que 0,05 em um nível de confiança de 95%. Portanto, o modelo linear para a faixa de concentração analisada não apresentou falta de ajuste, pois o valor observado de $F_{falta\ de\ ajuste}$ foi menor que o valor de $F_{crítico\ (0,05;\ 3,\ 10)}$ = 3,71 e o valor de *p* foi maior do que 0,05.

Tabela 3 – Resultados da análise de regressão linear no nível de 95% de confiança

	Parâmetros da Regressão Linear			
Composto	$F_{regressão}$	*valor de p*	$F_{falta\ de\ ajuste}$	*valor de p*
Hesperidina	2256,50	0,000	0,62	0,299

Fonte: Do autor

5.3.2 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima do analito que pode ser detectado em um determinado nível de confiança, já o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (SKOOG, 2006; ANVISA, 2003).

Os limites de detecção e de quantificação obtidos estão representados na Tabela 4. Os limites de quantificação e de detecção ficaram abaixo dos valores do

primeiro ponto da curva analítica para hesperidina (10,0 mg/L), mostrando que o método utilizado apresenta boa sensibilidade para hesperidina, podendo dessa forma ser utilizado para análise das amostras de interesse.

Tabela 4 – Resultados dos valores de LD e LQ para as determinações de Hesperidina por espectroscopia UV-VIS

	Hesperidina
LQ (mg/L)	0,27
LD (mg/L)	0,01

Fonte: Do autor

5.3.3 Precisão e Repetitividade

Para analisar a confiabilidade do método desenvolvido e utilizado no trabalho, foi realizado o estudo de precisão através do cálculo das estimativas de repetitividade (realizada no mesmo dia) e de precisão intermediária, realizada em 3 dias consecutivos (ANVISA, 2003). Os valores de RSD (%) encontram-se na Tabela 5.

Observou-se que os valores do RSD calculados para a repetitividade e precisão intermediária estão abaixo do limite proposto pela AOAC (2012) que é de 15,00%, portanto, indicando repetitividade e precisão intermediária adequadas para o método proposto.

Tabela 5 – Valores de média e RSD para o estudo de repetitividade e precisão intermediária na determinação de Hesperidina (50 mg/L)

	Repetitividade		Precisão intermediária	
Composto	Média (mg/L)	RSD**%**	Média (mg/L)	RSD**%**
Hesperidina	50,67 ± 1,72	3,40	53,13 ± 4,46	8,51

Fonte: Do autor

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação por adição de padrão em dois níveis de concentração para a hesperidina. Os valores das recuperações estão apresentados na Tabela 6 e estão adequados com os valores determinados pela ANVISA (2003) para formas farmacêuticas que são de 80 a 120%.

Tabela 6 – Resultados da porcentagem recuperada de hesperidina em amostra de nanopartículas vazias nos níveis de 1,0 e 10,0 mg/L

Composto	Concentração adicionada (mg/L)	Recuperação (%)
Hesperidina	1,0	98,3 ± 4,8
	10,0	98,3 ± 4,1

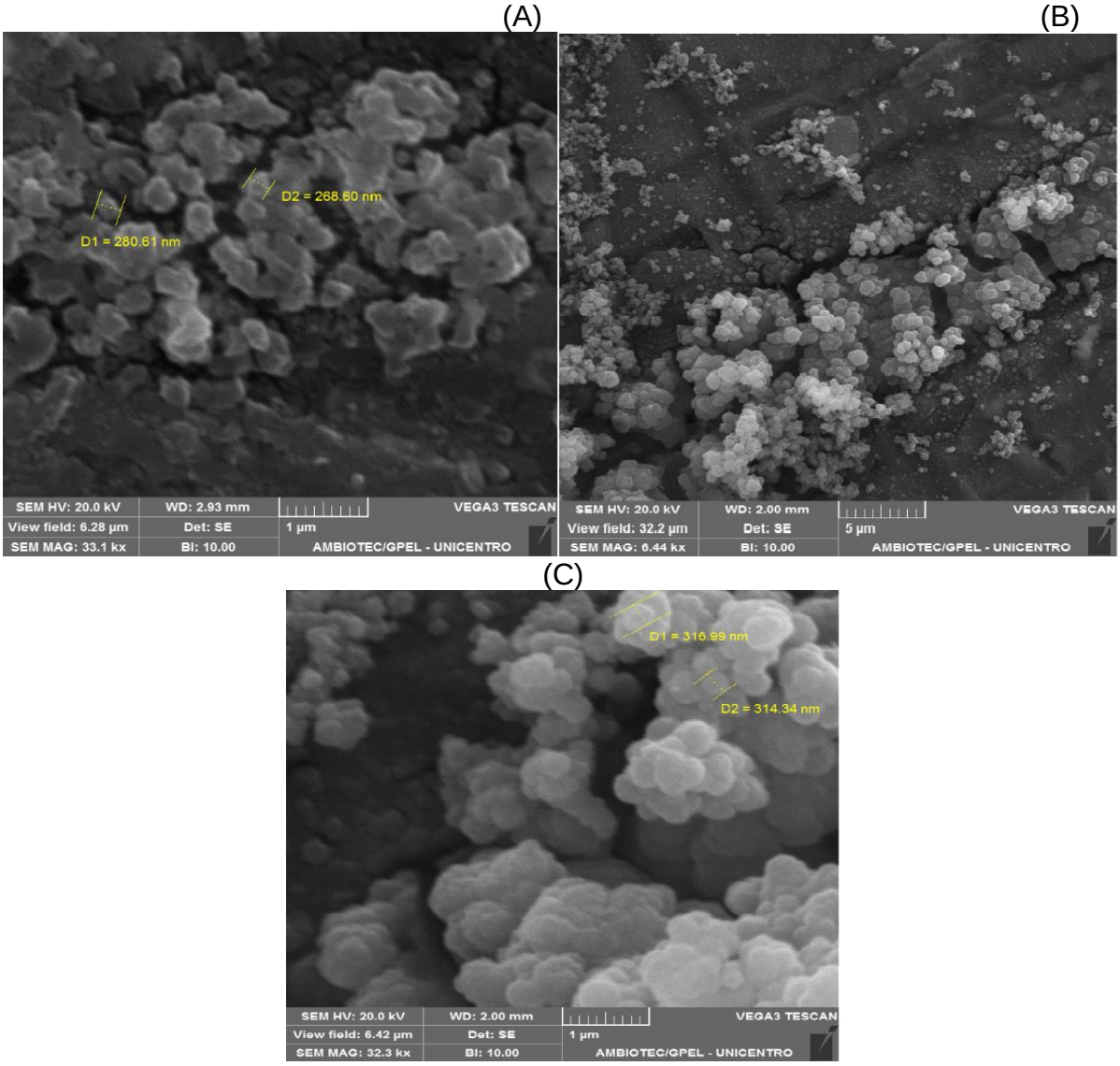
Fonte: Do autor

5.4 Caracterização físico-química das nanopartículas

5.4.1 Morfologia

Foram obtidas micrografias das nanopartículas vazias (NPS-Gqs) e carregadas com hesperidina (NPS-Gqs/HES), ambas apresentadas na Figura 6 (A e B). Observou-se em geral que as nanopartículas apresentaram forma ovalada. Observa-se que o tamanho das nanopartículas vazias eram em torno de 270 nm (A) e das carregadas com hesperidina em torno de 315 nm (C). Esses diâmetros observados confirmam os valores obtidos pelas técnicas anteriores. O aumento de tamanho se dá pela encapsulação da hesperidina, o que faz com que as nanopartículas aumentem de tamanho. Foram observadas também aglomerações, entretanto o tamanho médio das partículas se manteve.

Figura 6 – Microscopias das NPS-Gqs e NPS-Gqs/HES. (A) NPS-Gqs, (B) NPS-Gqs/HES e (C) NPS-Gqs/HES ampliada

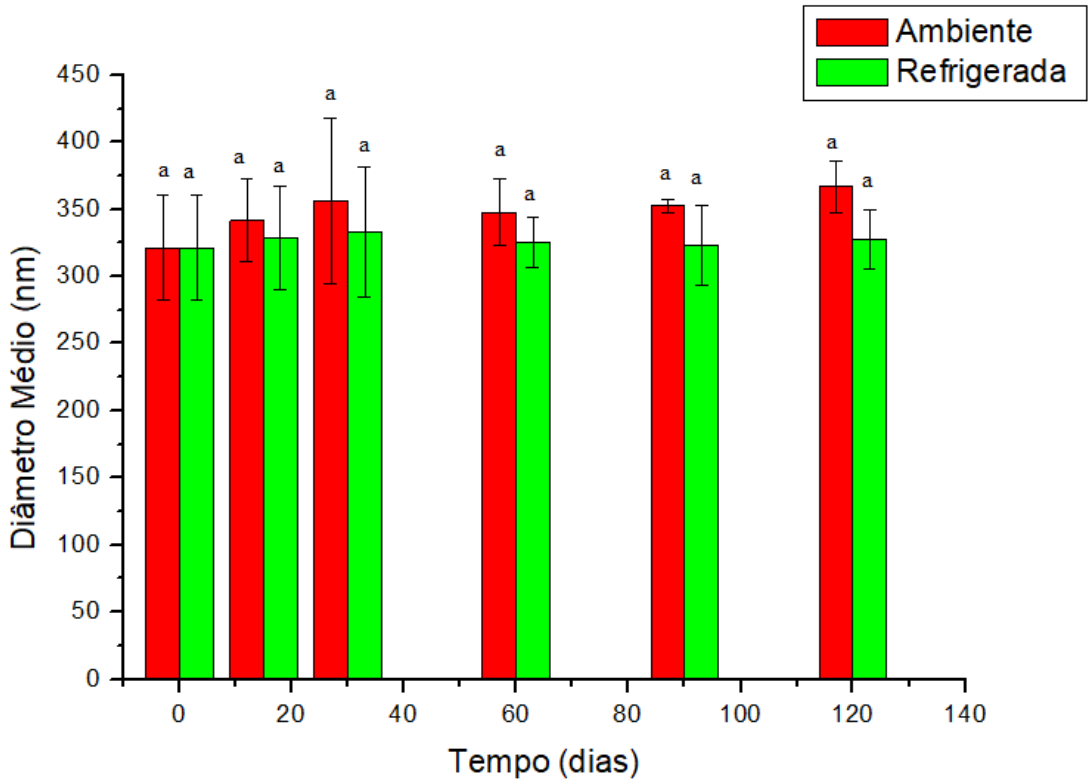


Fonte: Do autor

5.4.2 Estabilidade das nanopartículas de gliadina carreadoras de hesperidina

A estabilidade das NPS-Gqs/HES foi avaliada durante 4 meses em suspensão aquosa através dos fatores diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor da hesperidina. No Gráfico 5 estão apresentados os resultados do ensaio de estabilidade quanto ao diâmetro médio.

Gráfico 5. Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Diâmetro Médio

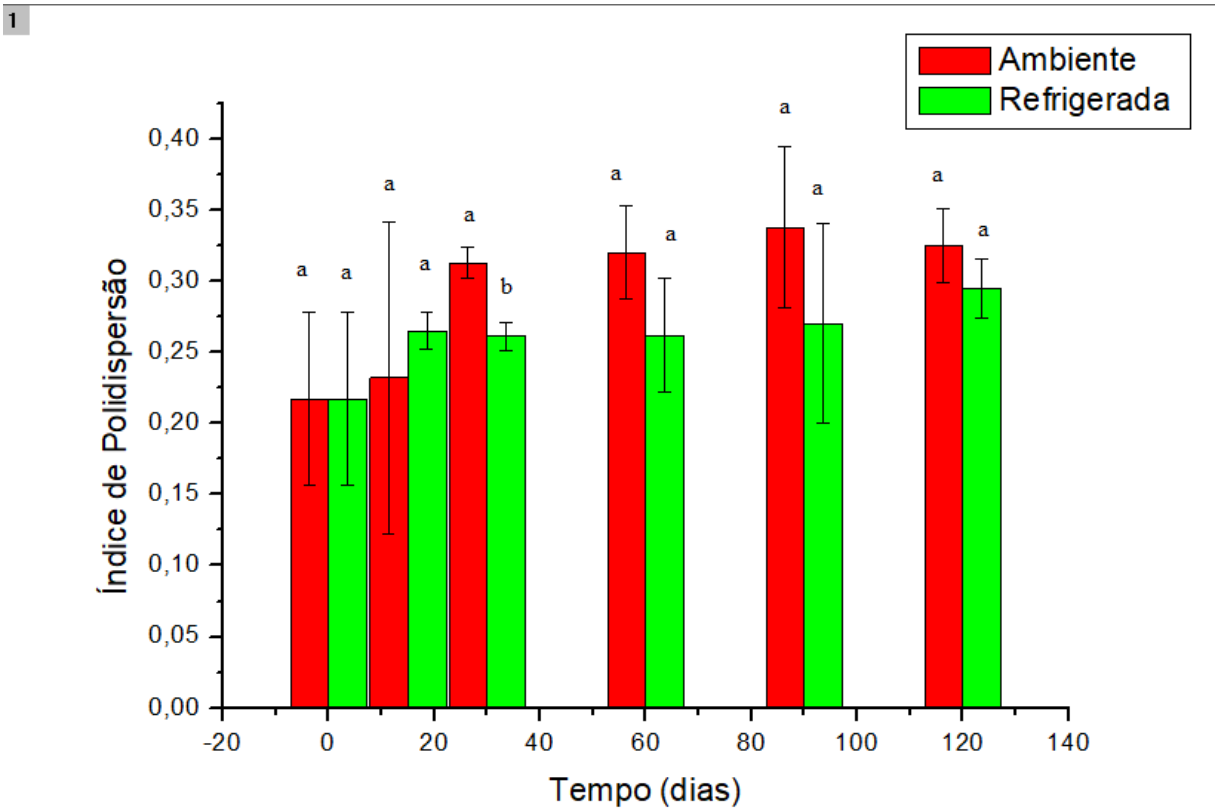


[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

A partir do Gráfico 5, pode-se observar que no período de 4 meses, as nanopartículas tiveram um pequeno aumento nos valores de Diâmetro Médio, com os tamanhos das nanopartículas suspensas em temperatura ambiente numericamente maiores que as armazenadas sob refrigeração. Entretanto, não observaram-se diferenças significativas entre os valores de diâmetro médio armazenadas em temperatura ambiente e refrigerada. Também não foram observadas diferenças significativas no Diâmetro médio no período de 120 dias, o que demonstra a estabilidade das nanopartículas.

Essa estabilidade com relação ao Diâmetro Médio pode ser explicada pelo valor de potencial zeta que as nanopartículas obtiveram após o revestimento com quitosana, o valor de + 21,4 mV causa repulsão entre as nanopartículas aumentando a estabilidade e diminuindo a agregação, assim como demostrado por Pauluk et al., (2019).

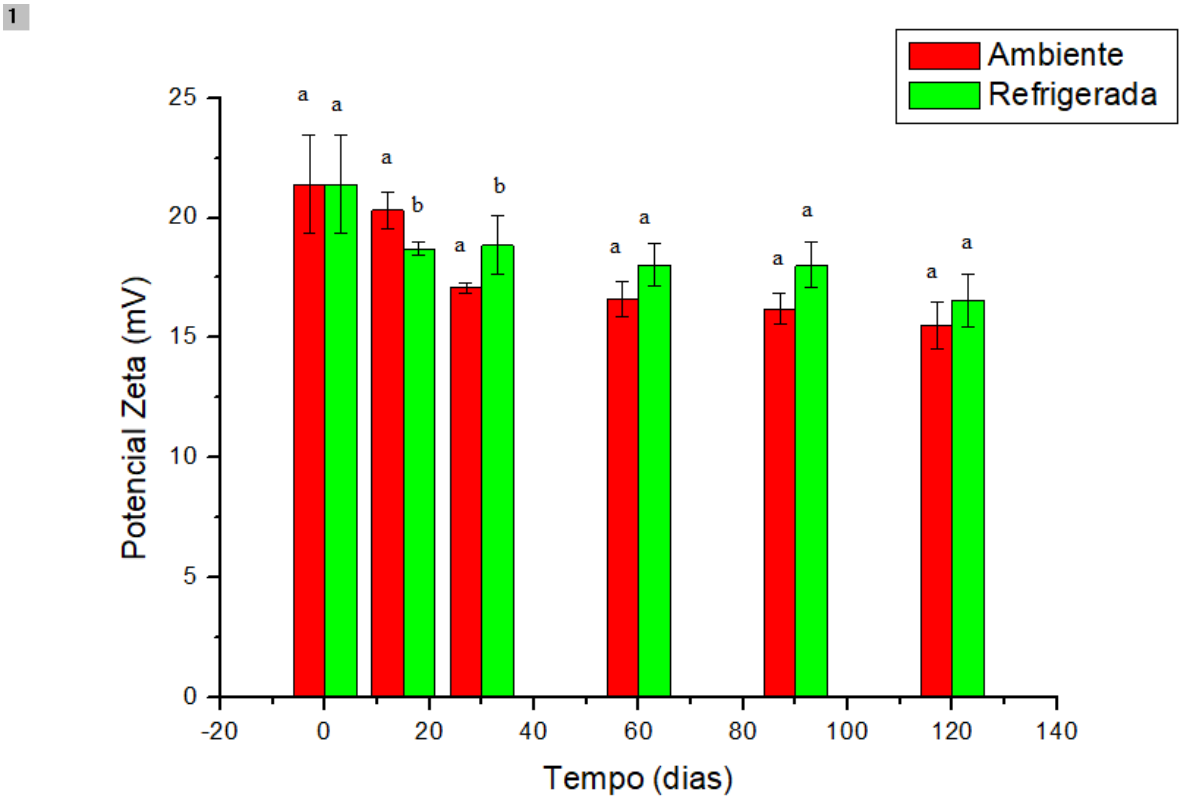
Gráfico 6 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Índice de Polidispersão



[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

A partir do Gráfico 6, observa-se que ao longo do tempo, ocorreu um pequeno aumento nos valores de índice de polidispersão, sendo que esse aumento é mais evidenciado nas amostras armazenadas em temperatura ambiente. Somente no período de 30 dias, os valores apresentaram diferenças significativas no intervalo de confiança de 95 %. Com relação às amostras armazenadas em temperatura de refrigeração, não há diferenças significativas no período de tempo de 4 meses, o que demonstra a estabilidade das nanopartículas produzidas, sendo explicada pelo valor de potencial zeta que as nanopartículas obtiveram após o revestimento com quitosana, o valor de + 21,4 mV causa repulsão entre as nanopartículas, dificulta a agregação e aumenta a estabilidade, assim como demostrado por Pauluk et al., (2019).

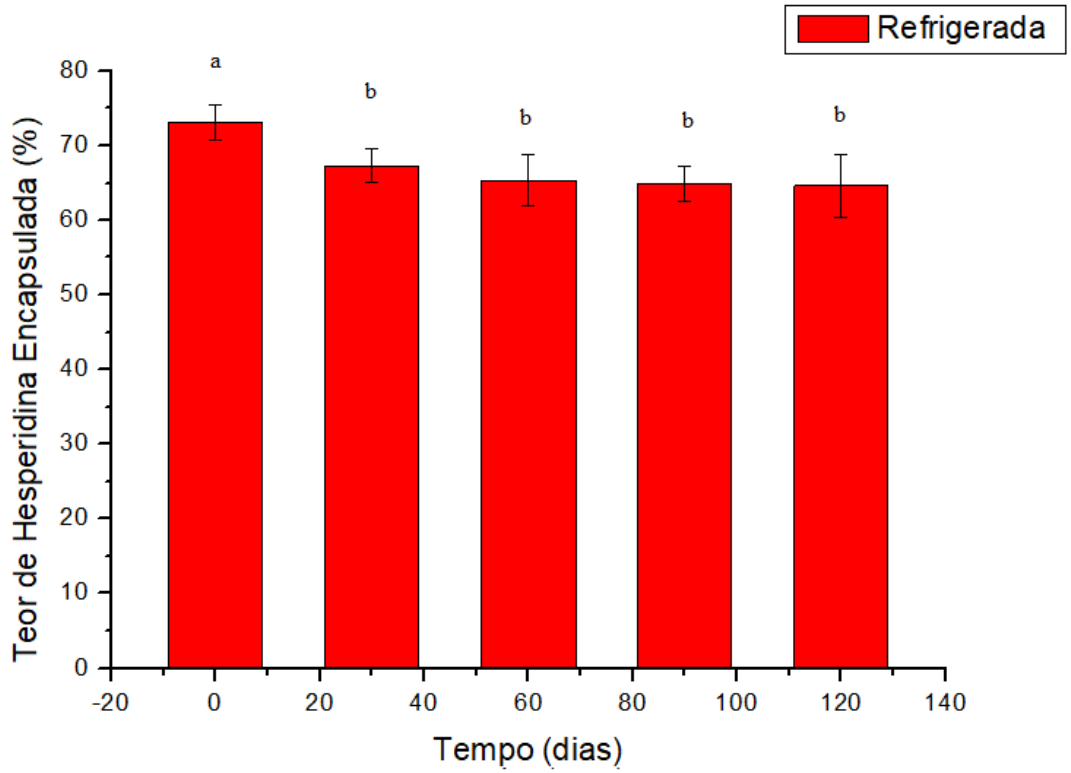
Gráfico 7 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Potencial Zeta



[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

A partir do Gráfico 7, observa-se que ao longo do tempo, ocorreu uma pequena diminuição nos valores de potencial zeta, sendo que esse aumento é mais evidenciado nas amostras armazenadas em temperatura ambiente, exceto no período de 15 dias. Nos períodos de 15 e 30 dias foram observadas diferenças significativas nas amostras armazenadas em temperatura ambiente e sob refrigeração. No período de 120 dias, observou-se que há diferenças significativas, entretanto os valores de potencial zeta ainda se mantêm adequados nesse período, o que demonstra a estabilidade das nanopartículas produzidas. Isso pode ser explicado pelo valor de potencial zeta que as nanopartículas obtiveram após o revestimento com quitosana, o valor de + 21,4 mV causa repulsão entre as nanopartículas aumentando a estabilidade, assim como demostrado por Pauluk et al., (2019).

Gráfico 8 – Estabilidade das NPS-Gqs/HES: Teor de Hesperidina Encapsulada.



[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8)

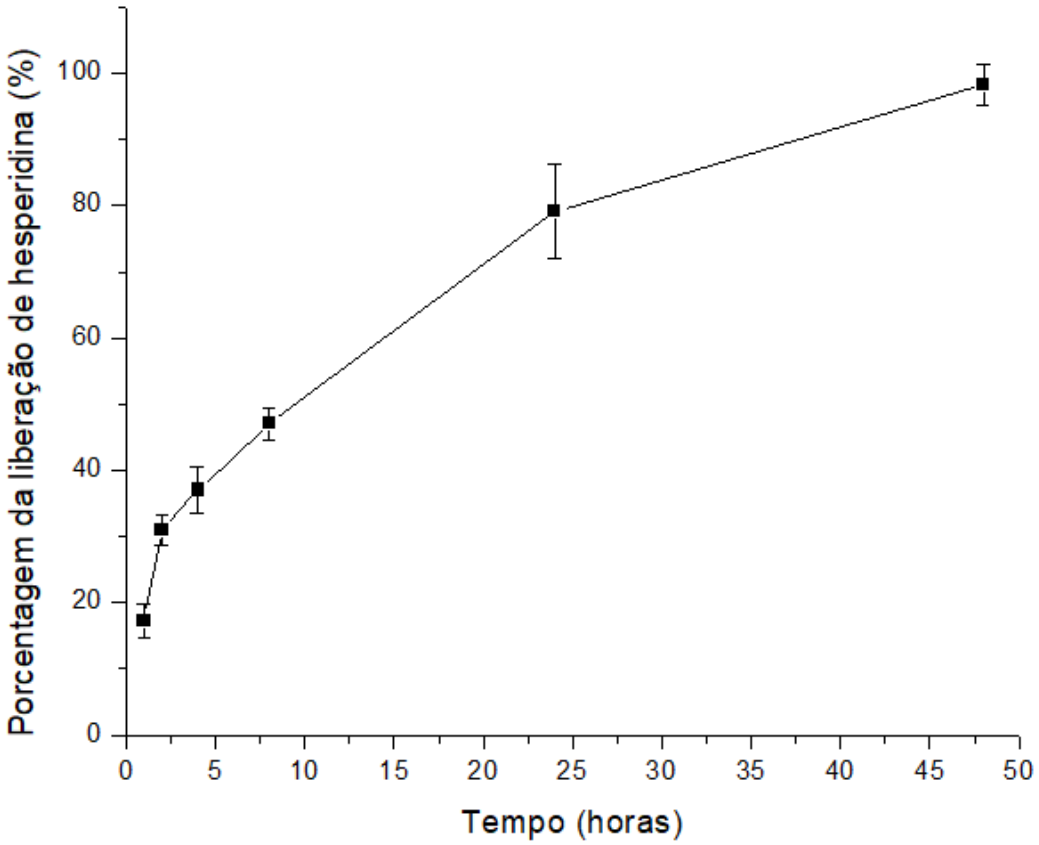
A partir do Gráfico 8, observa-se que ao longo do tempo houve uma pequena diminuição do teor de hesperidina encapsulada, entretanto, o teor encapsulado manteve-se acima de 60%. Somente houve diferença significativa no segundo mês em relação ao primeiro, desde então no período de 120 dias não há diferença significativa no intervalo de confiança de 95 %, o que indica uma boa estabilidade das nanopartículas produzidas. Com relação aos ensaios do teor de hesperidina, foram realizados somente com as NPS-Gqs/HES refrigeradas. Essa estabilidade pode ser explicada pelo valor de potencial zeta que as nanopartículas obtiveram após o revestimento com quitosana, o valor de + 21,4 mV causa repulsão entre as nanopartículas aumentando a estabilidade, o que assim como demostrado por Pauluk et al., (2019).

5.5 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da hesperidina a partir das nanopartículas de gliadina

O estudo do perfil da liberação in vitro foi realizado utilizando NPS-Gqs/HES para analisar o percentual de hesperidina liberada pelas nanopartículas em tampão PBS com pH=7,4, que simula o pH do sangue. O Gráfico 9 ilustra o perfil de liberação in vitro da hesperidina a partir das nanopartículas.

Gráfico 9 – Perfil de liberação da Hesperidina NPS-Gqs/HES em tampão PBS pH=7,4.

1



Fonte: Do autor

A partir do Gráfico 9, foi observado que nas primeiras 4 h foram liberados 37,0 ± 3,5% da Hesperidina a partir das NPS-Gqs/HES, sendo essa rápida liberação associada ao efeito "*burst*", efeito este que se refere a liberação do composto adsorvido na superfície das nanopartículas. Após esse período a liberação foi mais

lenta, pois a hesperidina liberada foi a que estava presente no interior das nanopartículas. Neste ensaio, após 48 horas, 98,0 ± 3,2% da hesperidina encapsulada foi liberada, sendo observada que essa liberação é considerada razoavelmente rápida. Cada formulação tem um perfil de liberação único, o que impossibilita a comparação com outros trabalhos da literatura.

5.6 Estabilidade em fluido gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS)

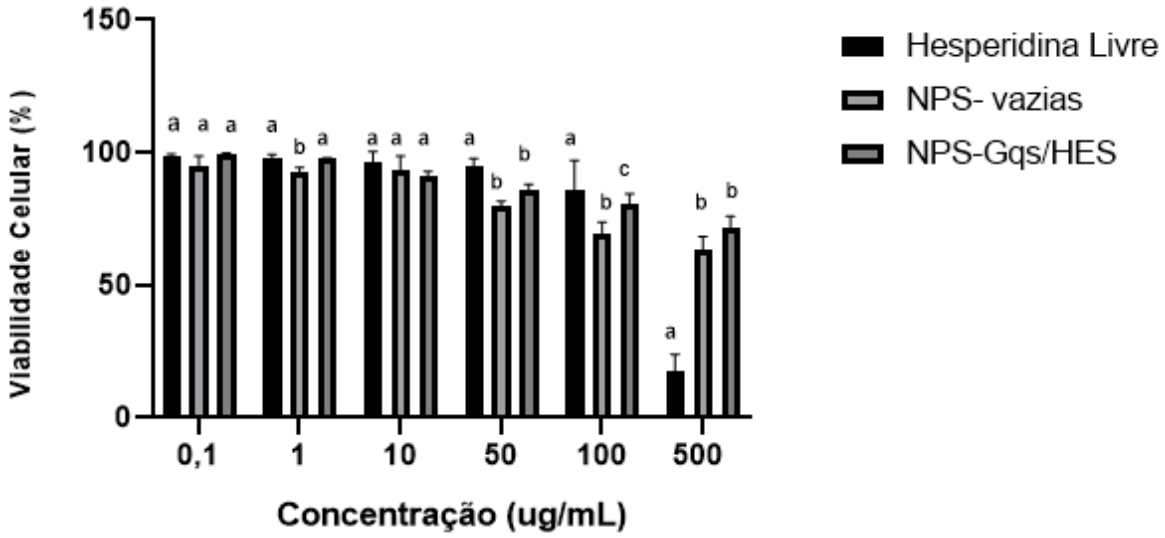
Este ensaio foi realizado para verificar a estabilidade da nova formulação no sistema digestivo**.** Após a realização dos ensaios com fluído gástrico simulado (FGS) e intestinal simulado (FIS), não foram detectadas concentrações da hesperidina no meio através do método espectrofotométrico validado, sugerindo que não há liberação da hesperidina nos meios gástricos e intestinal simulado, ou que a liberação é muito pequena, abaixo dos valores de detecção do equipamento utilizado.

5.7 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas contendo hesperidina sobre linhagens tumorais e células vero

5.7.1 Células Vero

Como observado no Gráfico 10, após 24 horas, somente na concentração de 500 µg/mL observa-se alguma atividade citotóxica relevante contra as células saudáveis, ou células Vero. Entretanto, mesmo na concentração de 500 ug/mL, observa-se que a atividade citotóxica das NPS-Gqs/HES é muito menor quando comparada à Hesperidina livre, ou seja, o composto natural. Isso demonstra que o encapsulamento da hesperidina reduziu drasticamente a citotoxicidade contra células saudáveis, o que é desejável na utilização de sistemas nanocarreadores de fármacos (Pauluk et al., 2019).

Gráfico 10- Viabilidade Celular de células Vero tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações.

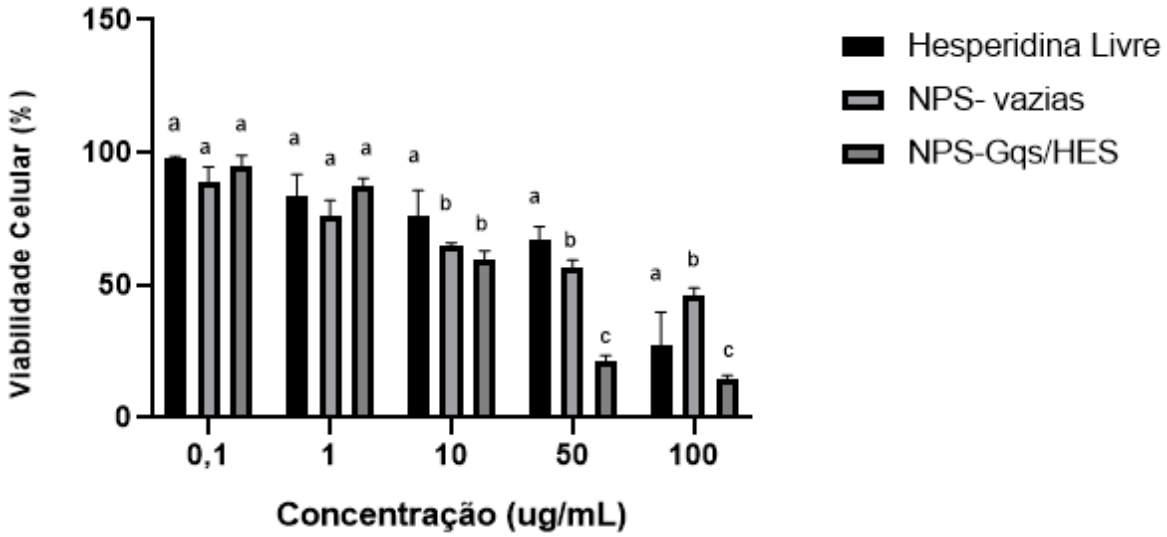


[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

5.7.2 Células Hela

De acordo com o Gráfico 11, pode-se observar que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL as NPS-Gqs/HES apresentam uma atividade citotóxica significativamente maior que as NPS-vazias e a hesperidina livre. Na concentração de 100 ug/mL, a atividade antitumoral contra as células Hela (adenocarcinoma de colo de útero) foi de cerca de 85 %, muito acima da atividade demonstrada pelas NPS-vazias e pela Hesperidina livre.

Gráfico 11 – Viabilidade celular de células Hela tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações

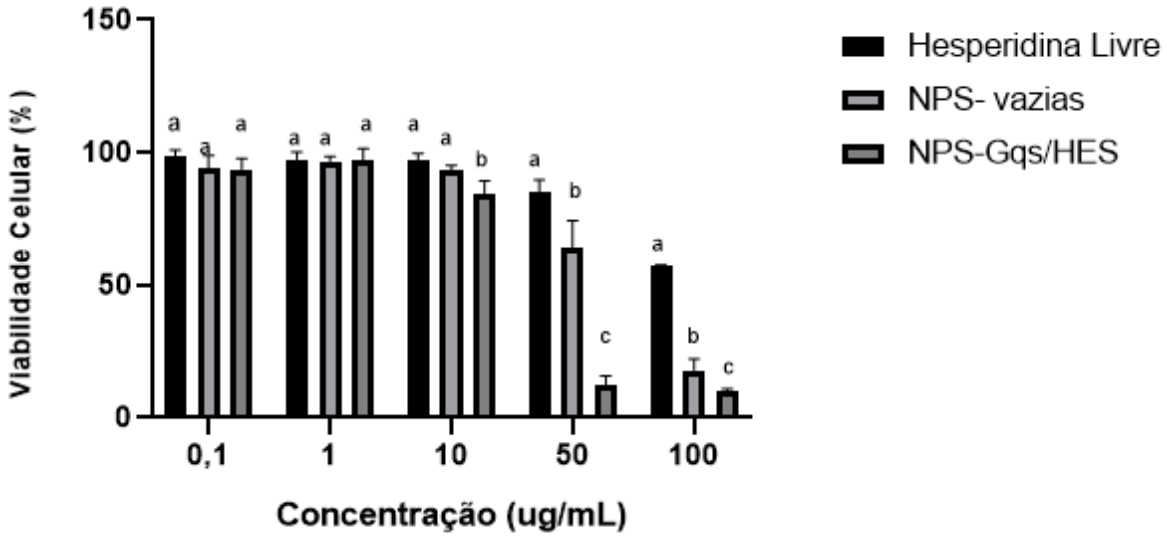


[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

5.7.3 Células PC-3

De acordo com o observado no Gráfico 12, observa-se que as NPS-Gqs/HES apresentam uma atividade citotóxica alta contra as células de adenocarninoma de próstata nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Na concentração de 100 µg/mL, a atividade antitumoral foi de 92%, significativamente maior que as atividades apresentadas pelas NPS-vazias e pela hesperidina livre.

Gráfico 12 - Viabilidade Celular de células PC-3 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações.

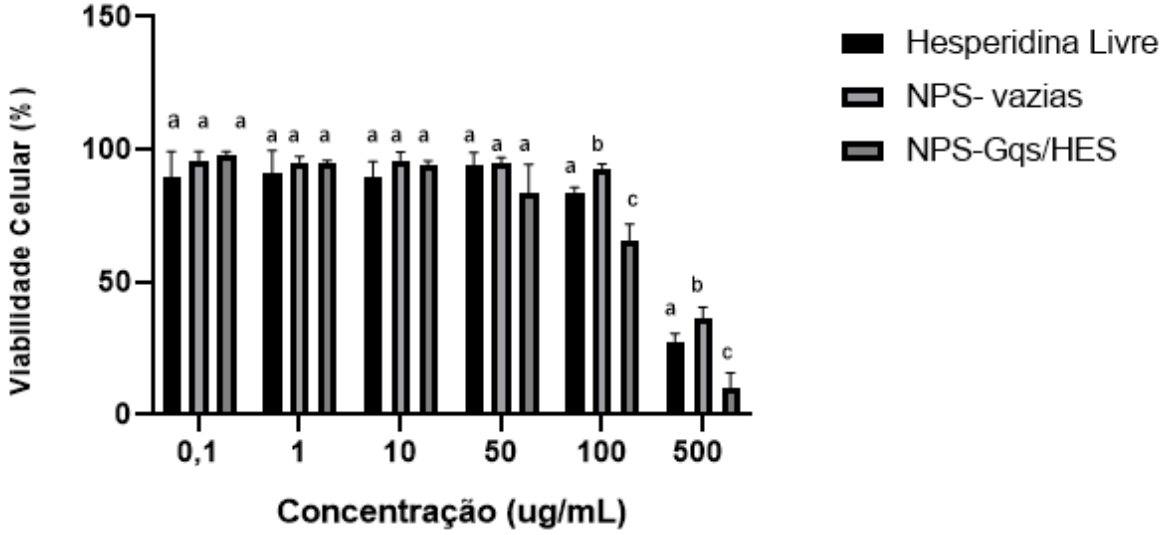


[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

5.7.4 Células Caco-2

Pode-se observar no Gráfico 13, que na concentração de 500 ug/mL, as NPS-Gqs/HES apresentaram atividade antitumoral contra as células Caco-2 (adenocarninoma de cólon) significativamente maior que as NPS-vazias e a hesperidina livre, o que demonstra que a utilização de nanopartículas como carreadores de hesperidina aumenta a atividade antitumoral do fármaco.

Gráfico 13 – Viabilidade Celular de células Caco-2 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações.



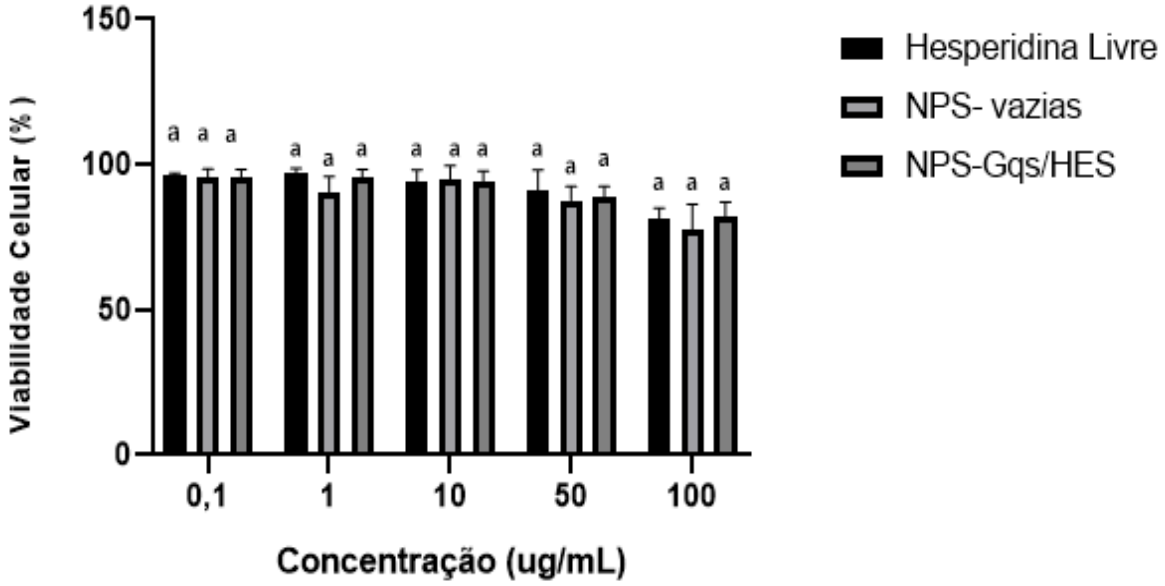
[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; Two Away ANOVA; Pós Tukey).

5.7.5 Células HT-29

A partir do Gráfico 14, nota-se que mesmo na concentração de 100 ug/mL, as NPS-Gqs/HES não apresentaram atividade citotóxica significativamente diferente das atividades apresentadas pelas NPS-vazias e Hesperidina livre. Além disso, a citotoxicidade apresentada contra as células HT-29 (adenocarcinoma colorretal) foi pequena, o que não é desejável.

Gráfico 14 – Viabilidade Celular de células HT-29 tratadas com NPS-Gqs/HES, NPS-vazias e Hesperidina Livre em diferentes concentrações

.



[a,b] Letras diferentes apresentam diferença estatística (p<0,05). (GraphPad Prism 8; TwoN Away ANOVA; Pós Tukey).

5.8 Análise da citotoxicidade a partir dos valores de CC_{50}

Na Tabela 7 são apresentados os valores de CC_{50} e ICC_{50} (concentração necessária para reduzir à metade o número de células) as linhagens celulares Vero, Hela, Caco-2 PC-3 e HT-29.

Tabela 7 – Valores de CC50 de Hesperidina livre e Hesperidina carregadas em nanopartículas em células Vero após 72 h. Valores de IC50 de Hesperidina livre e Hesperidina carregada em nanopartículas nas células HeLa, PC3, Caco-2 e HT-29 após 72 h.

Linhagem Celular	Hesperidina Livre CC_{50} (µg/mL)	NPS-Gqs/HES CC_{50} (µg/mL)	NPS-vazias CC_{50} (µg/mL)
Vero	230.83 ± 20.05	> 1000	> 1000
	Hesperidina Livre IC_{50} (µg/mL)	NPS-Gqs/HES IC_{50} (µg/mL)	NPS-vazias IC_{50} (µg/mL)
HeLa	70.44 ± 7.72	16 ± 1.61	159.33 ± 12.10
PC-3	179.05 ± 3.68	21.62 ± 1.84	126.67 ± 14.05
Caco-2	265.53 ± 17.56	164.87 ± 14.72	674.45 ± 62.03
HT-29	189.45 ± 7.12	392.97 ± 14.22	> 1000

Fonte: Do autor.

A partir da Tabela 7, pode-se analisar que os valores de IC_{50} das NPS-Gqs/HES diminuíram consideravelmente quando comparadas aos valores de IC_{50} da hesperidina livre e das NPS-vazias. Isso ocorre com todas as linhagens celulares, exceto com a HT-29, onde o valor do IC_{50} da hesperidina livre foi menor, ou seja, melhor quando comparado a NPS-Gqs/HES. Quanto às outras linhagens celulares, o que foi observado foi uma drástica redução do IC_{50} quando utilizadas as nanopartículas carregadas em comparação à Hesperidina livre. Os valores de IC_{50} das nanopartículas carregadas também são menores quando comparadas às nanopartículas vazias. Isso demonstra que ocorre um sinergismo na atividade citotóxica das NPS-Gqs/HES, ou seja o resultado total é uma soma das atividades citotóxicas das nanopartículas vazias e da hesperidina livre. Isso demonstra que a utilização das nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana melhorou muito as atividades citotóxicas contra linhagens celulares tumorais e diminuiu a citotoxicidade contra as células normais do organismo humano.

5.8.1 Células Vero

A maioria dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente para o tratamento de câncer afetam tanto as células tumorais como as saudáveis, o que aumenta as chances da existência de efeitos colaterais. Por outro lado, os compostos bioativos de ocorrência natural provaram ser mais seletivo para locais de câncer (UMA MAHESWAR et al., 2021). Neste estudo, o efeito citotóxico de NPS-Gqs/HES em células Vero foi avaliado como um modelo para células saudáveis. Uma redução da viabilidade celular foi observada com NPS-vazias e NPS-Gqs/HES em 50 e 100 µg / mL ($p < 0,05$), conforme mostrado na Figura 11. No entanto, em concentrações mais altas da droga, a hesperidina foi significativamente mais citotóxica do que as NPS-vazias e NPS-Gqs/HES ($p < 0,05$). O IC_{50} da hesperidina livre foi pelo menos 5 vezes menor do que das nanopartículas vazias e das nanopartículas carregadas com hesperidina. Os resultados mostram que a nanoencapsulação reduz a citotoxicidade da hesperidina neste modelo de células saudáveis.

5.8.2 Células Hela

Com comportamento diferente do apresentado em células Vero, em células HeLa as NPS-Gqs/HES foram significativamente mais citotóxicas do que a hesperidina livre em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$) (Figura 12). O IC_{50} de NPS-Gqs/HES foi 4,5 vezes menor do que da hesperidina livre, indicando sua maior eficácia, e o IC_{50} das nanopartículas vazias foram 2,2 vezes maiores do que da hesperidina livre. Bartoszewski et al. (2014) estudaram o efeito da hesperidina contra as células HeLa e afirmaram que o fármaco levou à apoptose (morte celular) por via extrínseca, uma vez que foi observado aumento dos níveis de mRNA em receptores de morte por apoptose (BARTOSZEWSKI et al., 2014). Da mesma forma, Ferreira de Oliveira e co-autores (2020) descobriram que a hesperidina foi capaz de inibir a transição do ciclo celular em células HeLa e também induzir a oxidação intracelular (FERREIRA DE OLIVEIRA et al., 2020). No mesmo sentido, Stanisic e co-autores (2018) observaram que a capacidade da hesperidina aumenta três vezes a concentração de cálcio no citoplasma das células HeLa, promovendo disfunção mitocondrial que leva a apoptose.

5.8.3 Células PC-3

As NPS-Gqs/HES também foram avaliadas contra células de câncer de próstata PC-3. Conforme a Figura 13 apresenta, 10µg/mL de NPS-Gqs/HES foi mais eficiente do que a hesperidina livre para reduzir a viabilidade celular ($p < 0,05$). Notavelmente, as nanopartículas vazias também se mostraram mais citotóxicas do que o fármaco livre ($p < 0,05$), em 50 e 100 µg / mL. O IC_{50} de nanopartículas de hesperidina foi 8,3 vezes menor do que hesperidina livre e 1,5 vezes menor do que de nanopartículas vazias, indicando sua maior eficácia citotóxica. Lewinska et al., (2014) explicaram que os flavonoides glicosídeos, como a hesperidina, são agentes hipometilantes de DNA capazes de induzir alterações na expressão gênica e aumentar a produção de superóxido in vitro, levando à morte celular. Além disso, os resultados de Lau (2010) mostraram que a hesperidina foi eficiente em inibir a viabilidade das células PC-3 sem efeito significativo nas células saudáveis.

5.8.4 Células Caco-2

As células Caco-2 são consideradas um “padrão ouro” para modelos *in vitro* de cânceres intestinais (SHEN et al., 2015). Neste estudo, as NPS-Gqs/HES em uma concentração a partir de 100 µg / mL mostraram-se mais citotóxicas do que a hesperidina livre ($p < 0,05$). O IC_{50} foi 1,6 vezes menor do que a hesperidina livre, e as nanopartículas vazias apresentaram IC_{50} 2,6 vezes maior do que a hesperidina livre, conforme apresentado na Figura 14. De acordo com Kobayashi & Konishi (2008), a hesperidina é absorvida no intestino por transporte ativo e difusão passiva transcelular. Andrade et al. (2017) observaram que a hesperidina inibe a absorção de frutose por células Caco-2. Em relação a nanotecnologia aplicada ao tratamento do câncer, alguns estudos têm demonstrado a maior permeabilidade do nanopartículas de hesperidina para células Caco-2 (UCHIYAMA et al., 2011; TOZUKA et al., 2011).

5.8.5 Células HT-29

Observou-se que a citotoxicidade das NPS-Gqs/HES contra as células tumorais HT-29 foi aproximadamente a metade apresentada pela hesperidina livre como demostrado na Tabela 5, ou seja, a hesperidina livre causa mais danos às células

tumorais HT-29 que as NPS-Gqs/HES. Da mesma forma, as nanopartículas vazias apresentaram atividade citotóxica ainda menor que a apresentada pelas NPS-Gqs/HES. Dentre as linhagens celulares estudadas, foi a única que apresentou maior apoptose utilizando a hesperidina livre do que comparada com as nanopartículas produzidas.

5.9 Conclusões da análise da citotoxicidade

Neste estudo, de forma geral, as NPS-Gqs/HES foram mais eficazes na redução da viabilidade celular das linhagens celulares tumorais avaliadas em comparação com o composto não encapsulado. Presumivelmente, a carga positiva associada as nanopartículas produzidas aumentaram a interação e sua absorção por células tumorais carregadas negativamente. Também, a maior eficácia das NPS-Gqs/HES pode ser inferida pela eficiência das nanopartículas *per se* em conjunto com a atividade da droga, e sua atividade final pode ser o resultado de um efeito sinérgico. Estudos têm mostrado que as nanopartículas com quitosana apresentam atividade antitumoral devido ao rompimento da membrana e atividades indutoras de apoptose (OBEREMKO et al., 2019).

A razão para a baixa citotoxicidade das NPS-Gqs/HES em células Vero (células saudáveis) pode ser devido ao pH intracelular. Quando comparadas às células saudáveis, as células tumorais apresentam pH intracelular ácido anormal (UMA MAHESWARI et al., 2021). Consequentemente, em pH ácido, quitosana e gliadina tornam-se protonados e a liberação da droga é facilitada, levando a maior seletividade para células tumorais do que células saudáveis, um requisito importante para a terapia do câncer (UMA MAHESWARI et al., 2021). Essas características mostram o potencial das nanopartículas de gliadina revestidas com quitosana a serem investigadas como uma nova abordagem para tratamento do câncer, permitindo a administração oral de compostos quimioterápicos com efeitos colaterais reduzidos.

6 CONCLUSÕES

- O método de formulação realizado permitiu a obtenção de NPS-Gqs/HES com diâmetro médio de cerca 321,4 nm, bons índices de polidispersão, potencial Zeta em torno de +21,4 mV, o que são adequados e aplicáveis por via oral.
- A eficiência de encapsulação da hesperidina foi de aproximadamente 70%.
- O método analítico desenvolvido mostrou-se simples, confiável e seletivo fornecendo exatidão e precisão satisfatórias, limites de detecção e quantificação baixos. Boas recuperações foram obtidas quando a hesperidina foi dopada na matriz farmacológica (nanopartículas). Além disso, o menor tempo de duração da análise de hesperidina em dosagens farmacêuticas foi adequado para análises de rotina em relação a técnicas cromatográficas de maior custo.
- As NPS-Gqs/HES mostraram-se ovaladas nas micrografias obtidas por MEV.
- Em relação à estabilidade, concluiu-se que as NPS-Gqs/HES apresentaram condições estáveis durante o período avaliado.
- O perfil de liberação da Hesperidina a partir das NPS, em tampão PBS pH 7,4, foi caracterizado como de liberação rápida.
- As NPS-Gqs/HES não apresentaram liberação após passagem pelos FGS e FIS.
- As NPS-Gqs/HES apresentaram boa atividade citotóxica contra a maioria das linhagens tumorais analisadas, entretanto apresentaram pouca citoxicidade contra células Vero, o que é importante.
- Portanto, as nanopartículas desenvolvidas apresentaram atividades farmacológicas promissoras para administração de hesperidina via oral.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução – RE n° 889, de 29 de maio de 2003.** Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html Acesso em: 20 set. 2021.

ALEGRE, G. F. S. **Determinação de compostos bioativos e capacidade antioxidante em sucos frescos e pasteurizados de laranja.** 2014. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2014. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/121868/000819846.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 2 set. 2020.

ANDRADE, N.; ARAÚJO, J. R.; CORREIA-BRANCO A.; CARLETTI, J. V.; MARTEL, F. Effect of dietary polyphenols on fructose uptake by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 429–439, 2017. Disponível em: https:// 10.1016/j.jff.2017.07.032. Acesso em: 2 set. 2021.

AOAC. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of AOAC International, 19th Edition. 2012. Apêndice F.

ARANGOA, M. A.; CAMPANERO, M. A.; RENEDO, M. J.; PONCHEL, G.; IRACHE, J. M. Gliadin Nanoparticles as Carriers for the Oral Administration of Lipophilic Drugs. Relationships Between Bioadhesion and Pharmacokinetics. **Pharmaceutical Research**, [S.*l.*], v. 18, n. 11, p.1521-1527, 2001. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013018111829. Acesso em: 1 out. 2021.

ASSIS, O. B. G; SILVA, V. L. da. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v. 13, p. 223-228, 2003. Disponível em: https://www.scielo.br/j/po/a/c7JXG4bXysjrgGBJnqCjSBk/abstract/?lang=pt#. Acesso em: 20 ago. 2021.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos.** v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007. Disponível em: https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/4_diversidade/alimentacao/Textos/Quitina_Quitosana.pdf Acesso em: 2 ago. 2021.

BAE, E. A.; HAN, M. J.; KIM, D. H. In vitro anti-Helicobacter activity of some flavonoids and their metabolities. **Planta Medica**, v. 65, n. 5, p. 442-443, 1999. Disponível em: https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-960805 Acesso em: 2 out. 2021.

BANC, A.; DESBAT, B.; RENARD, D.; POPINEAU, Y.; MANGAVEL, C.; NAVAILLES, L. Structure and Orientation Changes of ω- and γ-Gliadins at the Air−Water Interface: A PM−IRRAS Spectroscopy and Brewster Angle Microscopy Study. **Langmuir**, [S.*l.*], v. 23, n. 26, p.13066-13075, 2007. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la702037k. Acesso em: 20 out. 2021.

BARTOSZEWSKI, R.; HERING, A; MARSZAŁŁ, M.; HAJDUK, J. S.; BARTOSZEWSKA, S.; KAPOOR, N.; KOCHAN, K.; OCHOCKA, R. Mangiferin has an additive effect on the apoptotic properties of hesperidin in Cyclopia sp. tea extracts. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92128, 2014. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092128 Acesso em: 20 out. 2021.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Cereals and Cereal Products. **Food Chemistry**, [S.*l.*], p. 670-745, 2009. Springer, Berlin, Heidelberg. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69934-7_16. Acesso em: 20 out. 2021.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 45, n. 12, p. 4504-4515, 1997. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970373s. Acesso em: 10 out. 2021.

BERKARDA, B.; KOYUNKU, H.; SOYBIR, G.; BAYKUT, F. Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. **Research in Experimental Medicine**, v.198, n. 2, p. 93-99, 1998. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004330050093 Acesso em: 10 out. 2021.

BOOTH, A. N.; JONES, F. T.; DEEDS, F. Metabolic fate of hesperidin, eriodictyol, homoeriodictyol, and diosmin.**Journal of Biological Chemistry**, v. 230, n. 2, p. 661-668, 1958. Disponível em: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)70489-4/pdf Acesso em: 20 set. 2021.

BRITO, N. M; AMARANTE, J. O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas.** v.13, p. 129-46, 2003. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/viewFile/3173/2546 Acesso em: 20 ago. 2021.

CASA, D. M.; MORAES CARRARO, T. C. M.; DE CAMARGO, L. E. A.; DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Poly (L-lactide) Nanoparticles Reduce Amphotericin B Cytotoxicity and Maintain Its In Vitro Antifungal Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 848-854 , 2014. Disponível em: https://www.ingentaconnect.com/contentone/asp/jnn/2015/00000015/00000001/art00150 Acesso em: 20 out. 2021.

CHENG, M.; HE, B.; WAN, T.; ZHU, W.; HAN, J.; ZHA, B.; CHEN, H.; YANG, F.; LI, Q.; WANG, W.; XU, H.; YE, T. 5-Fluorouracil Nanoparticles Inhibit Hepatocellular Carcinoma via Activation of the p53 Pathway in the Orthotopic Transplant Mouse Model. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e47115, 2012. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047115 Acesso em: 20 out. 2020.

COSTA A. F.; STANISIC, D.; FÁVARO, W. J.; TASIC, L.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Anticancer Activities of Hesperidin and Hesperetin In vivo and their Potentiality against Bladder Cancer. **Journal of Nanomedicine Nanotechnology**. 2018. v. 9, n. 5, p. 1–6. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Danijela-Stanisic-2/publication/328416624_Anticancer_Activities_of_Hesperidin_and_Hesperetin_In_vivo_and_their_Potentiality_against_Bladder_Cancer/links/5bd61cfa299bf1124fa896b7/Anticancer-Activities-of-Hesperidin-and-Hesperetin-In-vivo-and-their-Potentiality-against-Bladder-Cancer.pdf Acesso em: 20 ago. 2021.

DING, Y.; SHEN, S. Z.; SUN, H.; SUN, K.; LIU, F.; QI, Y.; YAN, J. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe3O4 magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 487-498, 2015. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493114008340 Acesso em: 10 out. 2021.

FENG, N.; WU, P.; LI, Q..; MEI Y.; SHI, S.; YU, J.; XU, J.; YING, L.; WANG, Y. Oridonin- y(ε-caprolactone)-poly(ethylene oxide)- y(ε-caprolactone) copolymer nanoparticles: Preparation, characterization, and antitumor activity on mice with transplanted hepatoma. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 6, p. 479-485, 2008. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10611860802102282 Acesso em: 20 out. 2020.

FERREIRA DE OLIVEIRA, J. M. P.; SANTOS, C.; FERNANDES, E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. **Phytomedicine**, v. 73, p. 152887, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711319300571. Acesso em: 20 out. 2021.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D.; SINGLA, A. K. Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655-669, 2001. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.1074. Acesso em: 20 out. 2021.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA A. Current methodology of MTT assay in bacteria–A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.03.007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065128118300278 Acesso em: 20 ago. 2021.

GUILLOT, B.; GUILHOU, J. J., DE CHAMPVALLINS, M., MALLET, C., MOCCATTI, D.; POINTEL, J. P. A long term treatment with a venotropic drug. Results on efficacy and safety of Daflon 500 mg in chronic venous insufficiency.**International angiology: a journal of the International Union of Angiology**, v. 8, n. 4 Suppl, p. 67-71, 1989. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/2632651. Acesso em: 7 set. 2020.

GULFAM, M.; KIM, J-E; LEE, J. M.; KU, B.; CHUNG, B. H.; CHUNG, B. G. Anticancer drug-loaded gliadin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. **Langmuir**, v. 28, n. 21, p. 8216-8223, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102105. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la300691n Acesso em: 20 set. 2021.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodolody,** Q2B (CPMP/ICH/281/96), 1996.

ITALIA, J. L.; SINGH, D.; RAVI KUMAR, M. N. V. High-performance liquid chromatographic analysis of amphotericin B in rat plasma using alpha-naphthol as an internal standard. **Analytica chimica acta**, v. 634, n. 1, p. 110–114, 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000326700802045X. Acesso em: 20 out. 2021.

JAHANSHAHI, M. E BABAEI, Z. African Journal of Biotechnology, 2008, 7, 4926.

KHALIL, N. M.; DE MATTOS, A. C.; MORAES MOREIRA CARRARO, T. C.; LUDWIG, D. B.; MAINARDES, R. M. Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 41, p. 7316-7329, 2013. Disponível em: https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2013/00000019/00000041/art00013. Acesso em: 3 set. 2021.

KROLICKI, Z.; LAMER-ZARAWSKA, E. 1984. Investigation of anti-fungal effect of flavonoids. Part 1. **Herba Polonica**, v. 30, p. 53-57, 1984.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R.; RISSANEN, H.; HELIOVAARA, M.; REUNANEN, A.; HAKULINEN, T.; AROMAA, A. Flavonoid intake and risk of chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002. Disponível em: https://academic.oup.com/ajcn/article/76/3/560/4677422?login=true Acesso em: 10 set. 2020.

KOBAYASHI, S.; KONISHI, Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 368, n. 1, p. 23–9. 2008. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X08000090 Acesso em: 20 out. 2021.

LANGER K., BALTHASAR S., VOGEL V., DINAUER N., VON BRIESEN H., SCHUBERT D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 169-180, 2003.DOI: 10.1016/s0378-5173(03)00134-0. PMID: 12711172.

LIMA, I. A.; KHALIL, N. M.; TOMINAGA, T. T.; LECHANTEUR, A.; SARMENTO, B.; MAINARDES, R. M. Mucoadhesive chitosancoated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. DOI: 10.1080/21691401.2018.1477788. (2018):

LOHCHAROENKAL, W.; WANG, L.; CHEN, Y.C.; ROJANASAKUL, Y. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. **Biomed Research International**, v. 2014. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/180549/ Acesso em: 20 ago. 2021.

MA, X. TNF-α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 2, p.121-129, 2001. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457900013599 Acesso em: 20 out. 2021.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics***,* v. 290, n. 1–2, p. 137-144, 2005. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15664139/ Acesso em: 3 out. 2021.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 2, p. 235-242, 2003. Disponível em: https://www.nature.com/articles/1601547 Acesso em: 10 out. 2021.

MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001. Disponível em: https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2001/00000008/00000002/art00005 Acesso em: 10 out. 2021.

MATIOLI, G.; VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril-comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004. Disponível em: https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/1590 Acesso em: 20 ago. 2021.

MONTEIRO, A. M. F.; ARÊAS, E. P. G., SCHOEDER, A.; FA, N. **Colloids Suf.** B, 34, 53, 2004.

MULLER B. G.; LEUENBERGER, H.; KISSEL, T. Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: an optimized manufacturing technique. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 32-37, 1996. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016064930502 Acesso em: 2 set. 2021.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 762-798, 2007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670007000664 Acesso em: 10 set. 2020.

NATA. National Association of Testing Authorities. **Guidelines for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods**. Australia, 2012.

OBEREMKO, A.; SALABERRIA, A. M.; SAULE, R.; SAULIS, G.; KAYA, M. Physicochemical and in vitro cytotoxic properties of chitosan from mushroom species (Boletus bovinus and Laccaria laccata). **Carbohydrate polymers**, v. 221, p. 1-9, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.073. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719305880 Acesso em: 2 ago. 2021.

PAULUK, D.; PADILHA, A.K.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. **Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity**. Food Hydrocolloids. v. 94, p. 411-417, 2019.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5. p. 771–780, 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/j/qn/a/bq5SjVnnKptZkf8NnK6kqRc/abstract/?lang=pt Acesso em: 10 out. 2021.

RIBEIRO, A.; LEITE, D.; SCHEIBEL, J.; SOARES, R.; SILVEIRA, N. Structural Study of Wheat Gliadin in Different Solvents by Spectroscopic Techniques. **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 32, n. 4, p. 395-701, 2021. Disponível em: https://www.scielo.br/j/jbchs/a/TFNG4Cs9T3PQbTLCmrpF78j/?lang=en&stop=previous&format=html Acesso em: 20 out. 2021

RIBEIRO, A. F.; DE OLIVEIRA REZENDE, R. L.; CABRAL, L. M.; DE SOUSA, V. P. Poly ε-caprolactone nanoparticles loaded with Uncaria tomentosa extract: preparation, characterization, and optimization using the Box–Behnken design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, n., p. 431-442, 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559076/ Acesso em: 20 out. 2021.

ROOHBAKHSH, A; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEE, R.; IRANSHAHI, M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus fl avonoids hesperidin and hesperetin — A mini-review. **Life sciences** [Internet]. v. 113, n. 1–2, p.1–6, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002432051400650X Acesso em: 20 out. 2020.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Bookman, Porto Alegre, 2002.

STANISIC, D.; COSTA, A. F.; FÁVARO, W. J.; TASIC, L.; SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Anticancer Activities of Hesperidin and Hesperetin In vivo and their Potentiality against Bladder Cancer. **J Nanomed Nanotechnol**. v. 9, n. 5, p. 1–6, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Danijela-Stanisic-2/publication/328416624_Anticancer_Activities_of_Hesperidin_and_Hesperetin_In_vivo_and_their_Potentiality_against_Bladder_Cancer/links/5bd61cfa299bf1124fa896b7/Anticancer-Activities-of-Hesperidin-and-Hesperetin-In-vivo-and-their-Potentiality-against-Bladder-Cancer.pdf

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros.** 2005, v. 15, n. 4, p. 306-312. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000400016. 2006. Acesso em: 10 set. 2021.

TOZUKA, Y.; IMONO, M.; UCHIYAMA, H.; TAKEUCHI, H. A novel application of α-glucosyl hesperidin for nanoparticle formation of active pharmaceutical ingredients by dry grinding. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 79, n. 3, p. 559-565, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.07.006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641111002128 Acesso em: 10 out. 2021.

UCHIYAMA, H.; TOZUKA, Y.; ASAMOTO, F.; TAKEUCHI, H. α-Glucosyl hesperidin induced an improvement in the bioavailability of pranlukast hemihydrate using high-pressure homogenization. **International journal of pharmaceutics**, v. 410, n. 1-2, p. 114-117, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517311002195. Acesso em: 20 set. 2021.

UMA MAHESWARI, P.; MUTHAPPA, R.; BINDHYA, K. P.; BEGUM, K. M. S. Evaluation of folic acid functionalized BSA-CaFe2O4 nanohybrid carrier for the controlled delivery of natural cytotoxic drugs hesperidin and eugenol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102105, 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224720313940 Acesso em: 20 ago. 2021.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV. 2000. Disponível em: https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/united-states-pharmacopoeia-xxiv-national-for-0001. Acesso em: 10 out. 2021.

VALENTINI S. R, SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007. Disponível em: https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19999 Acesso em: 20 ago. 2021.

VINUEZA GALÁRRAGA, J. C. **Efeito da hesperidina no perfil lipídico de ratos tratados com dieta acrescida de ácidos graxos saturados.** 2008. Dissertação (mestrado) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2008. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95198/vinuezagalarraga_jc_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 10 set. 2020.

WANG, P.; TAO, H.; WU, F.; YANG, N.; CHEN, F.; JIN, Z.; XU, X. Effect of frozen storage on the foaming properties of wheat gliadin. **Food Chemistry**, [S.*l.*], v. 164, p. 44-49, 2014. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614007134 Acesso em: 20 set. 2021.

WU, C.; JIM, T. F.; GAN, Z.; ZHAO, Y.; WANG, S. A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly (ϵ-caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. **Polymer**, v. 41, n. 10, p. 3593-3597, 2000. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032386199005868 Acesso em: 20 ago. 2021.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N. MITSUZUMI, H.; MIWA, Y., KUBOTA, M.;; CHAEN, H.; KIBATA, M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.50657 Acesso em: 20 set. 2021.

YANG, Z.J.; ZHENG, Y.N.; XIANG, L. Study on chemical constituents of Portulaca oleracea. **Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials,** v. 30, n. 10, p.1248-1250, 2007. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/18300494. Disponível em: 2 set. 2021.

YASSIN, A. E. B.; ANWER, M. K.; MOWAFY, H. A.; EL-BAGORY, I. M.; BAYOMI, M. A.; ALSARRA, I. A. Optimization of 5-flurouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. **International Journal of Medical Sciences,** v. 7, n. 6, p. 398-408, 2010. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990076/. Acesso em: 20 out. 2020.

ZHANG, W-Y.; LEE, J-J.; KIM, Y.; KIM, I-S; HAN, J-H.; LEE, S-G; AHN, M-J; JUNG, S-H; MYUNG, C-S. Effect of Eriodictyol on Glucose Uptake and Insulin Resistance in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7652-7658, 2012. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300601z Acesso em: 10 out. 2021.

ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado na Revista Brazilian Archives of Biology and Technology[1]

Vol.64: e21200795, 2021
https://doi.org/10.1590/1678-4324-75years-2021200795
ISSN 1678-4324 Online Edition

Article - 75 years - Special Edition

Optimized Chitosan-Coated Gliadin Nanoparticles Improved the Hesperidin Cytotoxicity over Tumor Cells

Irineo Kelte Filho[1]
https://orcid.org/ 0000-0001-9873-2653

Celso Vataru Nakamura[2]
https://orcid.org/ 0000-0002-9911-7369

Christiane Schineider Machado[1]
https://orcid.org/ 0000-0003-1619-8667

Najeh Maissar Khalil[1]
https://orcid.org/ 0000-0002-5140-9944

Camila Diedrich[1]
https://orcid.org/ 0000-0002-3549-2952

Rubiana Mara Mainardes[1*]
https://orcid.org/ 0000-0002-4442-2075

Thaysa Ksiaskiewcz Karam[2]
https://orcid.org/ 0000-0002-3380-7922

[1]Midwestern Paraná State University, Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory, Guarapuava, Paraná, Brazil. [2]State University of Maringá, Laboratory of Technological Innovation in the Development of Drugs and Cosmetics, Maringá, Paraná, Brazil.

Editor-in-Chief: Alexandre Rasi Aoki
Associate Editor: Daniel Fernandes

Received: 2020.12.18; Accepted: 2021.05.20.

*Correspondence: mainardes@unicentro.br; Tel.: +55-42-36298160 (R.M.M.).

HIGHLIGHTS

- A Taguchi design optimized the development of hesperidin-loaded gliadin nanoparticles.
- A chitosan-coating was added to improve the physical stability of nanoparticles.
- Nanoparticles reduced the hesperidin cytotoxicity over healthy Vero cells.
- Nanoparticles improved the hesperidin cytotoxicity over tumor cells.

Abstract: Hesperidin is a natural compound which is found in citric fruits and presents antitumor and antimicrobial activities. However, the in vivo efficacy of Hesperidin is reduced due to its low oral bioavailability. Protein-based nanoparticles have been applied to improve biological parameters of drugs and natural compounds. Gliadin is a monomeric protein present in wheat. In this study, gliadin-based nanoparticles containing hesperidin were obtained by desolvation technique and a Taguchi orthogonal array design was employed to optimize the formulation. The independent variables were set as concentration of $CaCl_2$ (0.5; 1 or 2%) and stabilizing agent (Pluronic F68, Tween 80 or sodium caseinate). The dependent variables consisted of mean diameter, polydispersity index, zeta potential, and encapsulation efficiency. The results showed significant effects on the dependent variables when 1% $CaCl_2$ and Pluronic F68 were used. The optimized formulation was coated with chitosan to increase the physical stability of the nanoparticles. The final nanoparticles presented a mean diameter of 321 nm and polydispersity index of 0.217, and spherical shape. After coating, the Zeta potential was +21 mV, and the encapsulation efficiency was 73 %. The in vitro release assay showed that about 98% of the drug was released from the nanoparticles after 48 h. Moreover,

[1] KELTE FILHO, Irineo et al. Optimized Chitosan-Coated Gliadin Nanoparticles Improved the Hesperidin Cytotoxicity over Tumor Cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021. Disponível em: https://www.scielo.br/j/babt/a/56XPpNmqQHfWgD6MjBPcRNj/

Anexo B – Artigo aceito para publicação pela Revista Virtual de Química

[RVq]- 4310 - Taxa de Publicação Caixa de entrada ×

RVq SBQ <rvq@sbq.org.br> 25 de out. de 2021 10:30
para mim

Prezados autores,

Temos a satisfação de informá-lo que seu artigo submetido a Revista Virtual de Química foi aceito para publicação.

A Revista Virtual de Química adota o sistema de cobrança (page charge), com o qual os autores cobrem parte dos custos da publicação de seus artigos. A RVq continuará a oferecer acesso gratuito e irrestrito aos seus artigos. As seguintes taxas se aplicam após o aceite dos manuscritos:

O valor da taxa de publicação é calculado conforme o perfil de associado do autor correspondente, que terá direito a descontos se comprovar ser membro ativo da SBQ.

Desta forma, para que possamos proceder com a publicação do artigo, é necessário que nos envie o comprovante de depósito ou transferência e o recibo (em anexo) preenchido, pois devolveremos o mesmo assinado.

Considerando que o autor correspondente não é sócio ativo da SBQ, o valor a ser pago é de R $840,00.

Não recebemos pagamento por Pix (CNPJ da SBQ), uma vez que este não é cadastrado para conta de utilização da Publi SBQ, agradecemos a compreensão.