DYENEFER PEREIRA FONSECA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CONTENDO RESVERATROL

Guarapuava

2016

DYENEFER PEREIRA FONSECA

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CONTENDO RESVERATROL

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de fármacos, medicamentos e biociência aplicadas à farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO.

Orientadora: Profª. Drª. Rubiana Mara Mainardes.

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Guarapuava

2016

Catalogação na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Fonseca, Dyenefer Pereira

F676o Obtenção, caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antitumoral *in vitro* de nanopartículas de albumina contendo resveratrol / Dyenefer Pereira Fonseca. – – Guarapuava, 2016

xiii, 99 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2015

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Coorientador: Najeh Maissar Khalil

Banca examinadora: Tânia Toyomi Tominaga, Jociani Ascari

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Resveratrol. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. Albumina sérica bovina. 5. Antioxidante. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

TERMO DE APROVAÇÃO

Dyenefer Pereira Fonseca

Obtenção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante e antitumoral in vitro de nanopartículas de albumina contendo resveratrol.

Dissertação aprovada em 25/02/2016 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes, UNICENTRO
Presidente

Profa. Dra. Jociani Ascari, UTFPR
Membro

Profa. Dra. Tânia Toyomi Tominaga, UNICENTRO
Membro

Guarapuava- PR
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Clóvis e Dilair, ao meu irmão Diego e a minha sobrinha Lohana, por todo amor e compreensão. Vocês são donos do meu coração, sempre me apoiando e incentivando em todas as minhas decisões. Sem vocês nada faria sentido!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar saúde, sabedoria e força para que tudo fosse possível.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais amados que sempre estiveram lutando e torcendo por mim. A minha mãe Dilair por toda perseverança, amor e dedicação, não permitindo que eu me entristecesse em nenhum momento. Ao meu pai Clóvis por sua força e alegria. Á vocês, minha eterna gratidão, "Amo vocês". Agradeço também ao meu irmão Diego, por todo companheirismo e felicidade, sempre me animando e não permitindo que eu desistisse dos meus sonhos, te amo!

Agradeço profundamente as minhas amigas Isabela, Juliana, Jaqueline, Thaís e Nathália, muitíssimo obrigada por tudo que fizeram por mim. Sempre presentes em todos os momentos e acima de tudo, por todos os sentimentos compartilhados, tanto os tristes como os alegres, tornando os dias mais leves e felizes " *I love you guys*".

"*Abençoados os que possuem amigos, os que tem sem pedir,*
Porque amigos não se pede, não se compra, nem se vende.
Amigo a gente sente"
Machado de Assis

Aos meus orientadores Profª. Drª. Rubiana e Prof. Dr. Najeh. Primeiramente, pelo voto de confiança, que mesmo sem me conhecer muito bem, permitiram que eu fizesse parte de seu laboratório. Também agradeço por toda dedicação e ensinamentos, muito obrigada!!

Aos meus colegas de laboratório de nanotecnologia, por todos os momentos de convivência e os ensinamentos compartilhados. Em especial a Emilli e Daniel por toda a ajuda prestada a mim. Meus agradecimentos mais sinceros.

Á Profª. Drª. Tânia, Profª. Drª. Taiana e a Pós-Drª. Soraia, por toda a ajuda concedida durante a realização do trabalho. Á CAPES pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo. E a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse possível, o meu muito obrigada!

"Rise and Rise again,

Until lambs become lions”

Robin Hood

RESUMO

O Resveratrol (3,5,4´-trihidroxiistilbeno) (RVT) é uma fitoalexina fenólica produzida pelas plantas para protegê-las do ataque exógeno. Demonstra inúmeras propriedades farmacológicas, principalmente como excelente agente antioxidante, além de atuar diretamente no processo carcinogênico em seus três estágios: iniciação, promoção e progressão. Porém suas propriedades ficam comprometidas devido à baixa absorção e elevado metabolismo, resultando em baixa disponibilidade e difícil aplicação biológica. Este trabalho visou o desenvolvimento de nanopartículas de albumina (BSA) contendo resveratrol (NP-RVT), afim de contornar as dificuldades biofarmacêuticas apresentadas pelo RVT livre. As NP-RVT obtidas através da técnica de coacervação e os melhores resultados foram obtidos quando se inseriu um tempo de incubação (1 h) na técnica. As NP-RVT obtidas apresentaram diâmetro médio de 175 ± 6 nm, índice de polidispersão 0,130 ± 0,01, potencial zeta -37,4 ± 1,3 mV e eficiência de encapsulação próximo a 60 %. A análise morfológica revelou que as NP-RVT esféricas e lisas. *In vitro,* ao decorrer de 144 h houve liberação de 26% do RVT em tampão PBS (10 mM, pH:7,4 com Tween 80, 1%) a partir das NP.O modelo cinético correspondente a liberação foi o de segunda ordem, guiado pelo mecanismo Fickiano, gerando uma liberação inicial rápida (*efeito brust)* seguida de uma liberação mais lenta, através da difusão do RVT pela matriz polimérica. As análises físico-químicas (difração de raios x, espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria diferencial exploratória e espectroscopia de fluorescência) demonstraram que o processo de nanoencapsulação resultou em amorfização do RVT, com interações entre o RVT e a BSA. Com o estudo de estabilidade foi possível verificar que nas condições de armazenamento - temperatura ambiente e sob refrigeração (2-8°C) – as NP-RVT foram estáveis pelo período de três meses. A aplicabilidade das NP-RVT foi avaliada pelo estudo do potencial antioxidante do sistema contendo RVT frente à capacidade sequestrante do radical (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico)) ($ABTS^{\bullet+}$) e da inibição do ácido hipocloroso (HOCl), e também, através da avaliação da citotoxicidade em células B16F10. Os resultados demonstram que para ambos os testes as NP-RVT mostraram perfil dose-dependente com inibição de 50 % e 70 %, respectivamente, na concentração de 5,0 µg/mL no tempo de 72 h. Na avaliação da citotoxicidade em células B16F10, após 96 h de incubação as NP-RVT inibiram em 25% a viabilidade celular, possivelmente decido a lenta liberação do RVT. Com esses resultados, foi possível concluir que o sistema nanoestruturado contendo RVT foi obtido com sucesso, o qual apresenta potencial para tratamentos antioxidantes e antitumorais.

Palavras-chave: Resveratrol, Nanopartículas poliméricas, albumina sérica bovina, antioxidante, antitumoral.

ABSTRACT

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiistilbeno) (RVT) is a phenolic phytoalexin produced by plants to protect them from the exogenous attack. Which present numerous pharmacologic properties, mostly as an excellent antioxidant, as well as acting directly in the carcinogenic process in their three stages: initiation, promotion and progression. Although its properties are compromised because of the low absorption and high metabolism, resulting in low availability and difficult biological application. The present study aimed the development of albumin (BSA) nanoparticles containing resveratrol (NP-RVT) in order to overcome the difficulties biopharmaceutical presented by the free RVT. The NP-RVT were obtained through the coacervation and the best results were when there was a insertion of the incubation time (1 h) in the technical. The developed NP-RVT presented average diameter of 175 ± 6 nm, polydispersity 0.130 ± 0.01, zeta potential of -37.4 ± 1.3 mV and encapsulation efficiency approaching 60%. Morphological analysis revealed that NP-RVT feature is spherical and smooth. *In vitro*, during 144 h there was a release of 26% of the RVT in PBS buffer (10 mM, pH: 7.4 with Tween 80, 1%) from the nanoparticles. The kinetic model that corresponds the release which is the second order for Fickian mechanism, with a quick initial release (brust effect) followed by a slower release being regulated by diffusion of RVT by the chain polymer. The physico-chemical analysis (x-ray, infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry and fluorescence spectroscopy) showed that nanoencapsulation process resulted in an amorphous system with interactions between RVT and the BSA. With the stability study it was observed that both storage conditions - room temperature and refrigeration (2-8 ° C) - the RVT-NP were stable the period of three months. The applicabilities of NP-RVT was analyzed by studying the antioxidant potential of the system itself, containing RVT front ability of the radical sequestering (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolinona sulfonic acid-6)) ($ABTS^{\bullet+}$) and inhibition of hypochlorous acid (HOCl) and cytotoxic evaluation in cell B16F10. The results showing that both tests NP-RVT were dose-dependent inhibition with 50% and 70% respectively in concentration of 5.0 mg / mL in time of 72 hours. In the assessment of cytotoxicity in B16F10 cell, after 96 h of the incubation NP-RVT inhibited 25% cell viability, possibly due to slow release RVT. With the test conducted it was concluded that the nanostructured system containing RVT was successfully obtained, which has a potential for application in treatments antioxidant and against tumor.

Keywords: Resveratrol, polymeric nanoparticles, bovine serum albumin, antoxidant activity, antitumoral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16**

2.1 Câncer 16
2.2 Radicais livres 19
2.3 Resveratrol 21
2.4 Nanotecnologia e Nanopartículas Poliméricas 25
2.5 Albumina Sérica Bovina 27
2.6 Obtenção de Nanopartículas Poliméricas pelo Método de Coacervação 28
2.7 Caracterização das Nanopartículas 30

3. **OBJETIVOS 34**
4. MATERIAIS E MÉTODOS 35

4.1 Materiais 35
4.2 Métodos 36

4.2.1 Preparação de Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina contendo Resveratrol 36
4.2.2 Caracterização físico-química das nanopartículas 37

4.2.2.1 Diâmetro Médio da Partícula e Índice de Polidispersão (IP)..... 37
4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) 38
4.2.2.3 Determinação do Potencial Zeta 38
4.2.2.4 Adaptação da Validação do Método Analítica para Quantificação do RVT por CLAE 38
4.2.2.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação 39
4.2.2.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 40
4.2.2.7 Difração de Raio-X (DRX) 40
4.2.2.8 Análise Térmica (Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (DTG)) 40
4.2.2.9 Espectroscopia de Fluorescência 40

4.2.3 Determinação da Liberação *in vitro* 41

4.2.3.1 Ensaio de Solubilidade do RVT 41
4.2.3.2 Determinação do Perfil de Liberação 41
4.2.3.3 Determinação da Cinética e do Mecanismo de Liberação 41

4.2.4 Teste de Estabilidade 43
4.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* 43

4.2.5.1 Captura do Radical $ABTS^{+\bullet}$ 43
4.2.5.2 Inibição do Ácido Hipocloroso 43

4.2.6 Avaliação da Atividade Citotóxica *In Vitro* 44

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 46
5.1 Obtenção de Nanopartículas de Albumina contendo Resveratrol 46
5.2 Caracterização Físico-química 48
5.2.1 Diâmetro Médio da Partícula e Índice de Polidispersão (IP)..... 48
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) 50
5.2.3 Potencial Zeta 51
5.2.4 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do RVT por CLAE 52
5.2.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação 54
5.2.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 55
5.2.7 Difração de Raio-X (DRX) 57
5.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica Derivada (DTG) 58
5.2.9 Espectroscopia de Fluorescência 60
5.3 Liberação *in vitro* 63
5.3.1 Determinação da Solubilidade do RVT 63
5.3.2 Determinação do Perfil de Liberação 65
5.3.3 Determinação da Cinética e do Mecanismo de Liberação 66
5.4 Ensaio de Estabilidade Físico-química..... 68
5.5 Atividade Antioxidante *in vitro*..... 71
5.5.1 Captura do $ABTS^{+\bullet}$ 72
5.5.2 Inibição do Ácido Hipocloroso 74
5.6 Atividade citotóxica *in vitro* 78
6 **CONCLUSÃO** 83
7 7 REFERÊNCIAS 84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estágios da Carcinogênese 17

Quadro 1. Principais radicais livres presentes no meio biológico 19

Figura 2. Estrutura química do RVT nos isômeros *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol .. 22

Quadro 2. Propriedades físico-químicas do resveratrol 22

Figura 3. Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas 27

Figura 4. Representação dos domínios de ligação da albumina sérica bovina 27

Figura 5. Esquema demonstrativo do processo de coacervação 29

Figura 6. Representação ilustrativa da obtenção das NP-RVT pelo método de coacervação 37

Quadro 3. Modelos matemáticos da cinética de liberação 42

Figura 7. Distribuição do diâmetro médio de uma amostra representativa das NP-RVT, média do diâmetro médio de 176,2 nm e índice de polidispersão de 0,108 49

Figura 8. Micrografias das NP-RVT obtidas por MEV-FEG: a) Aumento de 36.000 X e b) 61.000 X 50

Figura 9. Cromatograma do RVT (100 µg/mL) solubilizado em metanol:água (50:50 v/v); fase móvel metanol:água (51:49 v/v), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306nm, volume de injeção 20 µL. Absorbância (AU) em função do tempo (min) 52

Figura 10. (A) cromatograma de uma amostra de sobrenadante de NP-RVT, identificando a presença do RVT através do pico formado; (B) cromatograma de uma amostra de sobrenadante de NP-brancas, mostrando a ausência da formação de picos..... 53

Figura 11. Curva analítica do RVT solubilizado em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol:água (51:49, v/v), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306nm, volume de injeção 20µL. Área X Concentração (µg/mL) 54

Figura 12. Espectros de infravermelho obtido por FTIR para A) RVT, B) mistura física entre RVT e BSA (proporção 1:10), C) NP-RVT e D) NP-Brancas 56

Figura 13. Difratogramas para A) NP-RVT, B) NP-Brancas e C) RVT 58

Figura 14. Curvas de DSC-DTG A) BSA, B) RVT, C) NP-branca, D) NP-RVT. Linhas em verde para derivada da massa, linhas em azul para o DSC 59

Figura 15: A) Espectros de fluorescência do RVT, BSA, mistura física (BSA/RVT 10:1), NP-Brancas e NP-RVT; B) Espectros de fluorescência de NP-Brancas (50µg/mL) e NP-RVT (50, 25 e 12,5 µg/mL). Todas as amostras foram solubilizadas em tampão PBS (10mM, pH: 7,4) λex: 280nm e λem: 290nm 61

Figura 16. Porcentual de liberação *in vitro* acumulada do RVT a partir das NP-RVT em tampão PBS (10 mM, pH=7,4) em função do tempo 65

Figura 17. A) Diâmetro médio das NP-RVT e B) Índice de polidispersão das NP-RVT em função do tempo, conservados em temperatura ambiente e sob refrigeração 69

Figura 18. A) Potencial Zeta das NP-RVT e B) Teor de RVT liberado das NP-RVT em função do tempo, conservados em temperatura ambiental e sob refrigeração 70

Figura 19. A) Estabilização do radical $ABTS^{+\bullet}$ por um antioxidante (sem cor) e formação do radical a partir do perssulfato de potássio (cor esverdeada); B) Representação da oxidação do TMB pelo $HOCl/OCl^{-}$ 72

Figura 20. Esquema da redução do MTT (cor amarelo) pelas redutase intracelulares dando origem à formazana (cor roxa) 78

Figura 21. Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de RVT livre e encapsulado sobre B16F10, em a) 72 h e em b) 96 h..... 79

Figura 22. Fotos do ensaio com as células B16F10, incubadas por 96 horas. a) controle etanol b) controle com NP-Brancas c) RVT livre (62,5 µL/mL) e d) NP-RVT (62,5 µL/mL) 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das NP-RVT obtidas a partir da técnica de coacervação "com" e "sem" tempo de incubação 46

Tabela 2. Diâmetro médio e Índice de polidispersão de NP-brancas e NP-RVT, n = 10, expresso em média ± desvio padrão 48

Tabela 3. Potencial Zeta de NP-Brancas e NP-RVT, n = 10, expresso em média ± desvio padrão 51

Tabela 4. Emissão máxima de fluorescência da BSA, RVT, Mistura Física (BSA:RVT 10:1), NP-Brancas, NP-RVT 61

Tabela 5. Solubilidade do RVT em tampão fosfato-salino (PBS, 10mM, pH:7,4) com os surfactantes Tween 80 (1 e 5%) e PVA (1 e 5%) 64

Tabela 6. Análise cinética da liberação do RVT a partir das NP-RVT em tampão PBS (10 mM, pH=7,4) 66

Tabela 7. Porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ pelo RVT, NP-RVT e NP-branca em concentrações de 0,5 ,1, 2, 3, 4, 5 μg/mL nos tempos 0, 24, 48 e 72 h 73

Tabela 8. Porcentagem de inibição do HOCl pelo RVT, NP-RVT e NP-branca em concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μg/mL nos tempos 0, 24, 48 e 72 h 75

Tabela 9. IC50 do resveratrol (livre e nanoencapsulado), através da inibição do ácido hipocloroso em tampão fosfato salino (50 mM. pH 7.4) nos tempos 0, 24, 48, 72 horas (λ = 734 nm) 76

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta eficiência
DLS	*Dinamic Light Scaterring*
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EE	Eficiência de Encapsulação
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	*Food and Drug Administration*
HOCl	Ácido hipocloroso
HSA	Albumina Sérica Humana
IF	Intensidade de Fluorescência
IP	Índice de Polidispersão
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
mV	Milivolts
NP-Brancas	Nanopartículas de albumina
NP-RVT	Nanopartículas de albumina contendo resveratrol
NPs	Nanopartículas poliméricas
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDA	*Photodiodo Array*
PVA	Álcool polivinílico
r	Coeficiente de correlação
RL	Radicais Livres
RVT	Resveratrol
TMB	3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina
AA	Atividade Antioxidante
TGA	Termgravimetria
DTG	Termogravimetria derivada

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres são átomos ou moléculas necessárias em vários processos bioquímicos do organismo humano e estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de biomoléculas importantes (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Porém, seu excesso pode provocar efeitos deletérios ao organismo, tais como danos ao DNA, proteínas, organelas celulares e também sobre as membranas, refletindo em alterações nas estruturas e no funcionamento celular. O conjunto de danos desencadeados pelos radicais livres chama-se estresse oxidativo e o seu desenvolvimento está envolvido em diversas patologias, incluindo o câncer (ALVES et al., 2010; AMES et al., 1993; WITZUM, 1994; STAHL, SIES, 1997).

Há tempos, têm sido desenvolvidas inúmeras pesquisas envolvendo compostos oriundos de fontes naturais, que apresentam propriedades antioxidantes e que em meio biológico, sejam capazes de evitar as reações oxidativas (HALLIWEL et al., 1995). Os compostos fenólicos são o maior grupo de metabólitos secundários pertencentes as plantas. A atividade antioxidante exercida pelos fenóis é através das suas reações de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na eliminação dos radicais livres (BRENNA & PAGLIARINI, 2001). Da mesma forma, também podem atuar como antineoplásicos, ocasionado a apoptose das células tumorais (SCHNEIDER et al., 2000; GUSMAN et al., 2001).

O resveratrol (3,5,4´-trihidroxiistilbeno) (RVT) substância pertencente aos polifenóis da classe dos estilbenos, é formado para proteger as plantas do estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio e plantas herbívoras. Atualmente, há um crescente interesse sobre este composto, devido aos números efeitos biológicos e farmacológicos exercidos por ele, tais como: cardioprotetor (HUNG et al., 2000; GOLDBERG et al., 1995), neuroprotetor (ANEKONDA, 2006), anti-inflamatório (MARTINEZ, MORENO, 2000) e antitumoral (ANSENSI et al., 2002; COLIN et al., 2008; NAKAGAWA et al., 2001). Grande parte desses efeitos estão associados, principalmente, à sua alta capacidade antioxidante. (HARWOOD et al., 2007).

Porém, suas propriedades ficam comprometidas quando expostas em meio biológico, devido ao elevado metabolismo que a molécula sofre a nível sistêmico (WALLE et al., 2004; WENZEL, SOMOZA, 2005). Dessa forma, para sua aplicação *in*

vivo é necessário o desenvolvimento de um sistema capaz de transportá-lo através das membranas biológicas e, consequentemente, aumentar sua biodisponibilidade. Assim, o resveratrol poderá atuar de forma satisfatória, atingindo concentrações suficientes para exercer seus efeitos biológicos (WILLIAMSON, MANACH, 2005).

Nas últimas décadas, tem ocorrido a elaboração de diversas estratégias de sistemas transportadores de fármacos, tais como: nanopartículas poliméricas, dendrímeros, lipossomas, entre outros (MAINARDES, 2009; KLAYPRADIT, HUANG, 2008). Reflexos do aumento rápido nas pesquisas e no desenvolvimento de novos materiais na escala nanométrica, principalmente na área de tecnologia farmacêutica (KIPP, 2004). Tais estruturas possuem propriedades físico-químicas diferenciadas, quando comparadas aos sistemas convencionais, incluindo: proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; diminuição da instabilidade e da decomposição de fármacos sensíveis (PIMENTEL et al., 2007)

O conjunto dessas propriedades reflete em novas oportunidades terapêuticas para várias drogas, como o RVT, que não poderia ser utilizado eficazmente em formulações convencionais, devido aos problemas relacionados as suas características biofarmacêuticas (MAINARDES et al., 2009; SAHOO, 2007; PARVEEN et al., 2012). Diante as dificuldades encontradas para a administração do RVT, com a necessidade de aumentar sua biodisponibilidade, preservando sua atividade biológica e, consequentemente, otimizando seu potencial terapêutico, esse trabalho propõe desenvolver nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) contendo RVT, como um sistema de liberação modificada para administração parenteral. Nesse contexto, o trabalho também consistiu em caracterizar as nanopartículas e avaliar *in vitro* suas atividades antioxidante e antitumoral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

O câncer é uma doença crônico-degenerativa, definida como um crescimento desordenado de células ditas anormais, que migram para os tecidos e órgãos, com tendência a espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2015). Nos dias atuais, as taxas de morbidade e mortalidade do câncer já atingiram níveis elevados, sendo considerado um importante problema de saúde mundial. O projeto Globocan (2012), desenvolvido pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), relata que cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados em 2012.

Esses números tendem a aumentar, principalmente em países desenvolvidos, devido às condições de transição demográfica. A previsão é que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, estima-se que em 2016/2017 cerca de, aproximadamente, 596 mil novos casos de câncer, dentre eles o câncer de pele (34 mil novos casos), próstata (61 mil), mama (58 mil), colón e reto (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo de útero (16 mil) (INCA, 2015).

A condição necessária para o desenvolvimento do câncer é a proliferação descontrolada de células defeituosas, causadas em grande parte por mutação ou por ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a mitose celular. São muitos os fatores de risco associados, como: tabagismo, uso de álcool, sedentarismo, radiação UV, má alimentação, entre outros. Esses fatores são capazes de desencadear a formação de radicais livres ou atingir diretamente o DNA (GUYTON, HALL, 1997; INCA, 2015; AMES, 1983; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

O estresse oxidativo, ou seja, descontrole na formação/eliminação dos radicais livres (RL), atua de forma expressiva no desenvolvimento do câncer. Pois, essas moléculas são capazes de interagir fortemente com as estruturas que compõe o DNA e, dessa forma, são grandes as chances de ocorrer mutação no material genético (SVILAR et al., 2010; SAEIDNIA, ABDOLLAHI, 2013). Do mesmo modo, podem alterar a expressão de genes que inibem a progressão celular (chamados genes supressores

tumorais) e dessa forma, aumentar a proliferação das células cancerosas (AFANAS'EV, 2013).

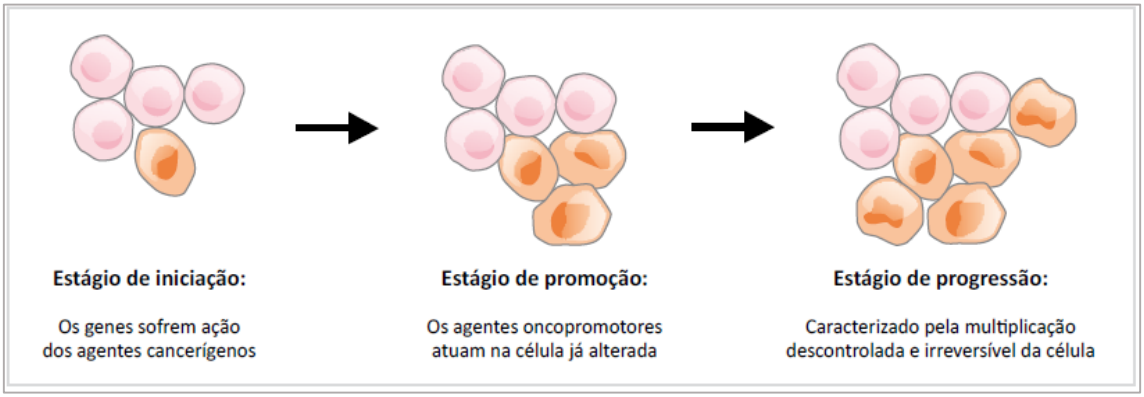
O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e o desenvolvimento ocorre de forma lenta, levando anos para tornar-se um tumor visível. Os principais estágios da formação do tumor são (Figura 1):

- **Estágio de iniciação:** é o primeiro estágio, as células ao serem expostas a um agente carcinogênico, sofrem modificações em alguns genes, desencadeando em mutações, dando origem a células defeituosas.

- **Estágio de promoção:** a célula defeituosa é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Essa transformação necessita um contínuo contato com o agente cancerígeno promotor.

- **Estágio de progressão:** é o último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Figura 1: Estágios da Carcinogênese.



Fonte: ABC do Câncer, 2015.

A partir da formação do tumor, levando-se em consideração o potencial de crescimento das células defeituosas, os tumores podem ser divididos em duas grandes categorias: I) os *tumores malignos*, onde as células dividem-se rapidamente e tendem a ser mais agressivas, manifestando um maior grau de autonomia. Também são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, também são resistentes aos tratamentos e podem evoluir para a morte. II) *tumores benignos*, têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem nítidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes.

Independentes da categoria em que o câncer se enquadra, as condições iniciais de desenvolvimento são mais favoráveis para o tratamento e, consequentemente, para a cura

(BORGES-OSÓRIO, ROBINSON 2001; INCA, 2015). Existem três abordagens principais no tratamento do câncer: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia. O papel desempenhado por cada uma delas irá depender do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento em que se encontram (RANG et al., 2007). As terapias antineoplásicas são, em sua maioria, antiproliferativas e os quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados como:

- Agentes Alquilantes: esses compostos ligam-se ao DNA, através de ligações covalentes e, por conseguinte, impedem o processo de replicação;
- Agentes Antimetabólicos: são capazes de alterar a síntese das bases purinas e pirimidinas e, consequentemente, interferir na síntese do DNA e RNA;
- Inibidores da Topoisomerase: ocasionam indiretamente a quebra do DNA, através da inibição das enzimas topoisomerases, que por sua vez, impede o relaxamento do DNA durante os processos de replicação e transcrição;
- Alcalóides de vinca: impedem a formação dos fusos mitóticos, e consequentemente, interferem no processo de divisão celular (RANG et al., 2007).

Desse modo, os tratamentos antineoplásicos atuam de forma inespecífica, afetando todas as células em rápida divisão, sendo os responsáveis pelos efeitos tóxicos indesejáveis, tais como: depressão da medula óssea, cicatrização deficiente, depressão do crescimento, esterilidade e perda de cabelo, maior susceptibilidade às infecções, além de serem teratogênicas (RANG et al., 2007; SALMONM, SARTORELLI, 1998).

A busca atual por novos tratamentos contra o câncer não consiste somente em eliminar as células tumorais (apoptose celular), mas também visam inibir a angiogênese, modular a resposta imune e/ou os processos inflamatórios crônicos e controlar a taxa de radicais livres nos fluídos biológicos (LASZCZYK, 2009). Com isso, os produtos naturais têm sido exaustivamente estudados como fonte de novos fármacos, principalmente os capazes de atuar em várias vias da formação/instalação do câncer. Tal como, os compostos que atuam como antineoplásicos e antioxidantes, concomitantemente. Esses compostos são capazes de combater o câncer, através da eliminação das células neoplásicas e também na formação de novos processos mutagênicos, por meio do controle dos radicais livres no organismo (NEWMAN, CRAGG, 2007; CRACG, NEWMAN, 2013).

2.2 Radicais Livres

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que em seu orbital mais externo possuem ao menos um elétron desemparelhado, tornando-os altamente reativos com moléculas dispostas ao seu redor. A formação dos RL ocorre quando há a quebra de uma ligação covalente e o compartilhamento de um elétron entre as porções formadas, ou ainda, quando um átomo ou molécula, recebe um só elétron transferido durante uma reação de óxido-redução (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990; GATÉ, et al., 1999). Os RL podem atuar como receptores ou doadores de elétrons, modificando todo o ambiente molecular ao seu redor, os principais RL presentes no meio biológico estão listados no Quadro 1. Os compostos não radicalares são considerados mais estáveis que os RL, porém, com igual reatividade com às moléculas biológicas (CAROCHO, FERREIRA, 2013; MAGDER, 2006).

Quadro 1: Principais radicais livres presentes no meio biológico.

Radicais livres	***Compostos não-radicalares***
$OH^{\bullet}$ - íon hidroxila;	H_2O_2 - peróxido de hidrogênio;
$HOH^{\bullet}$ - íon peroxil;	HOCl - ácido hipocloroso;
$O_2^{\bullet -}$ - ânion superóxido;	
NO - óxido nítrico;	
O_2 - oxigênio molecular;	

Fonte: CAROCHO, FERREIRA, 2013; MAGDER, 2006; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990.

O organismo humano produz naturalmente e de forma contínua essas moléculas, as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, nitrogênio e cloro são as principais fontes de RL, contribuindo positivamente para o funcionamento normal do organismo humano (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; MÉNDEZ FILHO, RODRÍGUEZ, 1997). Em um ambiente celular normal, existe um equilíbrio entre a produção e a neutralização dos RL, porém, quando ocorre um descontrole culminando em um aumento dos RL circulantes, dá-se um processo denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode comprometer inúmeros componentes celulares, devido à alta reatividade com as moléculas que compõe as estruturas biológicas, causando uma série de danos, como: a peroxidação dos lipídeos de membrana; oxidação de receptores hormonais e de enzimas, além de lesões no material genético (HALLIWELL, 2001; SIES, 1993; SVILAR et al., 2010).

Os danos oxidativos sofridos ao longo do tempo, podem resultar em várias doenças crônicas, como aterosclerose (LANKIN et al, 2005), injúria isquêmica (SAITO et al, 2005), doenças inflamatórias como a artrite reumatóide (TAK et al., 2000) e a colite ulcerativa (PRAVDA, 20005), doenças neurológicas incluindo doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Alzheimer (BONDY, 1995), além de propiciar processos mutagênicos e tumorais (HALLIWELL, 2001).

A carcinogênese – processo de formação dos tumores - induzida pelo estresse oxidativo, está diretamente ligada aos danos ocasionados nas fitas de DNA, devido a oxidação das bases pirimidinas, purinas e desoxirriboses, gerando, consequentemente, processos de apoptose e mutagênese (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Paralelamente, o estresse oxidativo também pode alterar a expressão de genes supressores tumorais, que inibem a progressão do ciclo celular, levando a um aumento da proliferação de células cancerosas (AFANAS'EV, 2013). Dessa forma, os RL atuam ativamente nos estágios da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (AMES, 1983).

Entre os principais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, podemos citar os sistemas enzimáticos, incluindo um complexo enzimas celulares, como as enzimas superóxido dismutase, glutationa peroxidase e a catalase; e os sistemas não-enzimáticos, como os compostos exógenos antioxidantes presente em algumas classes de alimentos (vitamina C, vitamina E, vitamina D, compostos fenólicos, entre outros). Esses sistemas atuam como agentes redutores, doando hidrogênio e estabilizando ou desativando os RL formados, contribuindo para uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ALMAJANO et al., 2008; STASZEWSKI et al., 2011).

Os compostos fenólicos são exemplos de substâncias altamente antioxidantes presentes em alguns alimentos e são capazes de promover a remoção ou inativação dos RL. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários derivados dos vegetais e de frutas, sua síntese ocorre para proteção das plantas frente ao estresse fotossintético e também contra agressões externas (ZUANAZZI, MONTANHA, 2004). Eles podem ser divididos em dois grandes grupos:

- Flavonóides: consistem de um esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6), com dois anéis benzênicos ligados por um anel pirano e através das substituições na estrutura básica são subdivididos nas classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides (BRAVO, 1998).

- Não Flavonóides: são subdivididos em 3 principais estruturas químicas: C6-C1, específicas dos ácidos hidroxi benzóico, gálico e elágico; C6-C3 específicas dos ácidos caféico e p-cumárico hidroxi cinamatos e, por fim, os derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do resveratrol (trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídio) (MELO, GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001).

O mecanismo antioxidante das estruturas fenólicas é através da doação de átomos de hidrogênio, que por sua vez são capazes de neutralizar os RL durante a iniciação ou propagação da reação de formação dos mesmos (Equação 1) (SIMIC, JAVANOVIC, 1994):

$$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet}$$
$$R^{\bullet} + AH \rightarrow RH + A^{\bullet} \qquad \text{Equação 1}$$

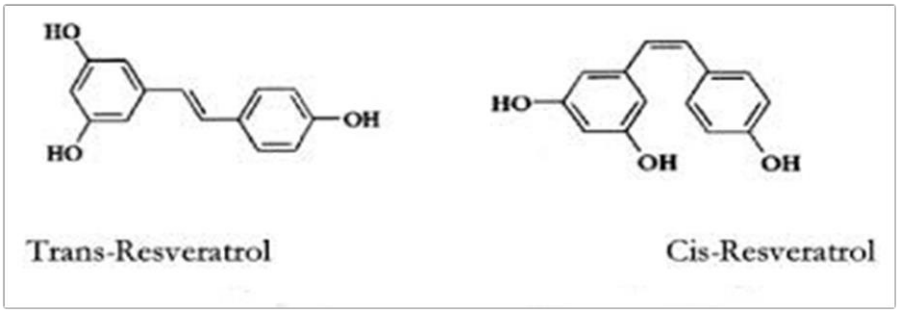
Onde, $ROO^{\bullet}$ e $R^{\bullet}$ são radicais livres, AH, antioxidante com um átomo de hidrogênio (fenóis), e $A^{\bullet}$ radical inerente (com reatividade menor que os radicais livres).

O resveratrol, metabólito secundário pertencente a classe dos não-flavonóides, têm se destacado como um potente agente antioxidante, demonstrando excelentes resultados em estudos *in vitro* e *in vivo*, capaz de neutralizar uma série de RL através da eliminação direta e também pela ativação de vias que regulam as defesas antioxidantes naturais das células (PANDEY, RIZVI, 2010). O seu potencial antitumoral também já foi bem elucidado, com efeitos citotóxicos *in vitro* em uma gama de células neoplásicas (ASENSI et al., 2002; COLIN et al., 2008). Dessa forma, esse composto pode ser um promissor candidato ao tratamento antitumoral, atuando no controle das mutações ocasionadas pelo estresse oxidativo e também na proliferação das células tumorais.

2.3 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4´-trihidroxiistilbeno) (RVT) é constituído de dois anéis fenólicos unidos por uma dupla ligação. Nas plantas, o RVT pode estar na forma dos isômeros *cis* ou *trans* (Figura 2) com comprimentos de onda de 254 nm (BLACHE et al., 1997) e 366 nm (BASLY et al., 2000), respectivamente. A isomerização de *trans* para *cis* ocorre através da radiação ultravioleta artificial ou natural (DORÉ, 2005), sabe-se que a forma *trans* é relativamente mais estável, sendo a forma predominante na natureza e acredita-se que essa seja a conformação associada às ações biológicas exercidas pelo RVT (SOLEAS et al., 1997; DORÉ, 2005; MÉRILLON et al, 1997).

Figura 2: Estrutura química do RVT em seus isômeros *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol



O RVT pode ser encontrado em mais de 70 espécies vegetais, incluindo famílias como as Vitaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Cyperaceae e Leguminosae (ITO et al., 2003; JEANDET et al., 1991; AGGAARWAL et al., 2004). Foi isolado pela primeira vez em 1940 pelo pesquisador TAKAOKA a partir das raízes de um lírio branco, o *Veratrum grandiflorum* O. Loes. Em 1963, foi isolado das raízes do *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa (NONOMURA et al., 1963). E somente em 1976, o RVT foi isolado em uvas, na espécie *Vitis vinífera*, por LANGCAKE e PRYCE (1976) e, a partir daí, vem sendo identificado em outras espécies de uvas e outras classes de alimentos, tais como: amora, cranberries, suco de cranberry, amendoim, nozes, entre outros (CARERI et al, 2003). As principais propriedades físico-químicas do RVT estão expostas no Quadro 2.

Quadro 2: Propriedades físico-químicas do resveratrol.

Fórmula molecular	$C_{14}H_{12}O_3$
Massa Molecular	228g/mol
Ponto de Fusão	253ºC-255ºC
pKa	9,14
Solubilidade	ALTA: etanol, metanol, dimetilsulfoxido, acetona e acetonitrila; BAIXA: água (0,03 mg/mL);
Degradação	UV e em pHs > 8,0.

Fonte: BUDAVARI, 1996; ROBINSON et al., 2014; WANG et al., 2002.

Nas plantas, o RVT comporta-se como uma fitoalexina, ou seja, somente é produzido quando ocorre a necessidade de defesa de alguma influência externa adversa, como o ataque de patógenos ou da radiação ultravioleta (KUC, 1995). Após, a enzima estilbeno sintetase é ativada e inicia-se o processo da síntese do RVT, com a condensação

entre uma molécula de p-cumaril-coenzima A e três moléculas de malonil-coenzima A, ocorrendo o processo de formação da molécula na região onde a planta foi agredida. Uma nova síntese só irá iniciar novamente, quando um novo ataque ocorrer. (SOLEAS et al., 1997; JEANDET, 2002; SIGNORELLI, GHIDONI, 2005).

Nas uvas, por exemplo, a biossíntese do RVT ocorre na epiderme da folha e na casca do fruto, não sendo sintetizado na parte carnosa do fruto (CREASY, COFFEE, 1988). E no decorrer da maturação das uvas, a síntese do RVT decai, devido à diminuição da expressão gênica da enzima estilbeno sintetase, isso explica a maior suscetibilidade de infecção quando o fruto se encontra maduro (JEANDET et al., 2002).

Existem vários estudos que comprovam os benefícios do RVT à saúde, entre suas propriedades farmacológicas destacam-se a atividade antioxidante (ANSENSI et al., 2002; LINDNER et al., 2013), efeitos cardioprotetores (HUNG et al., 2000; GOLDBERG et al., 1995), neuroprotetores (ANEKONDA, 2006), efeitos anti-inflamatórios com a redução das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 (MARTINEZ, MORENO, 2000), antitumoral (ASENSI et al., 2002; COLIN et al., 2008; CLEMENT et al., 1998; NAKAGAWA et al., 2001) e quimiopreventiva (JANG et al., 1997; GUSMAN et al., 2001).

Os mecanismos antioxidantes exercidos pelo RVT foram elucidados por ZINI et al. (1999 e 2002) e citam:

- Concorrência com a coenzima Q: com diminuição do complexo de cadeia oxidativa, local onde ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- Eliminação do $O_2^{\bullet-}$ formados no metabolismo mitocondrial; e,
- Inibição da peroxidação lipídica produzidas pela reação de Fenton, processos que envolvem a reação catalítica entre o peróxido de hidrogênio e iãos metálicos, como o Fe^{2+}.

Em 1998, ROTONDO e colaboradores já haviam relatado o RVT como um potente inibidor dos ROS produzidos pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN), considerados mediadores críticos de lesão celular e, consequentemente, responsáveis pelas alterações na permeabilidade vascular. Posteriormente, LEONARD et al. (2003) demonstraram resultados similares aos de ZINI et al. (1999 e 2002), mostrando o RVT como um eficiente neutralizador de $OH^{\bullet}$ produzidos pela reação de Fenton que, consequentemente, impede a peroxidação lipídica das membranas celulares, assim como os possíveis danos ao DNA; Além disso, o estudo de LEONARD et al. (2003) também demonstrou que o RVT era capaz de inibir a ativação do NF-kB (fator nuclear kappa B), através da capacidade de eliminação de inúmeras espécies de RL responsáveis pela

ativação desse fator. O NF-kB está envolvido nas cascatas de sinalização inflamatórias e carcinogênicas. Os autores propuseram ainda que os ROS derivados da peroxidação lipídica poderiam iniciar a formação de tumores.

Como antitumoral, o RVT é capaz de afetar os três estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), além de suprimir a angiogênese e as metástases, os efeitos parecem estar estritamente associados à sua capacidade antioxidante (ATHAR et al., 2007). No início da formação do tumor, o RVT atua como agente antioxidante inibindo a formação dos RL (JANG et al., 1997). Paralelamente, atua na cascata de ácido araquidônico, inibindo a cicloxigenase-1 (COX-1) e, consequentemente, a conversão do ácido araquidônico em substâncias pró-inflamatórias, necessárias para a gênese dos tumores (SUBBARAMAIAH et al., 1998). O RVT também exerce atividade na inibição da proteína C-quinase, considerado importante mediador na formação dos tumores (STEWART et al., 2000). Como antiproliferativo, o RVT age induzindo a apoptose de alguns tipos de tumores (SCHNEIDER et al., 2000), suprimindo várias linhagens celulares cancerosas, seja em parte pela inibição das DNA polimerase e ribonucleotídeo redutase ou pela indução da suspensão do ciclo celular (GUSMAN et al., 2001).

Apesar das numerosas propriedades farmacológicas apresentadas pelo RVT, a maior parte dos estudos são realizados *in vitro*. Porém, esses efeitos não são frequentemente observados *in vivo*, essa divergência pode ser atribuída à baixa biodisponibilidade e elevado metabolismo sofrido pela molécula em meio biológico (WILLIAMSON, MANACH, 2005). Alguns estudos descrevem que após administração oral, cerca de 70% do RVT é absorvido, mas rapidamente metabolizado, restando somente traços da molécula no plasma (NEMEN, LEMOS-SENNA, 2011).

O metabolismo rápido do RVT dá-se principalmente por 3 vias: (I) conjugação com o ácido glucurônico, (II) hidrogenação da dupla ligação alifática pela microflora intestinal e (III) conjugação com sulfatos pelo intestino/fígado, sendo essa a principal causa para a baixa biodisponibilidade do RVT e a excreção completa ocorre via urina e fezes. Diante ao intenso metabolismo do RVT, sua meia-vida plasmática é baixa, de 8 a 14 minutos, com formação de metabólitos com 9,2 h de meia-vida (WALLE et al.,2004; WENZEL, SOMOZA, 2005).

A baixa biodisponibilidade do RVT impossibilita um maior compreendimento das suas atividades no meio fisiológico, tornando-se um enorme desafio aos pesquisadores. Dessa forma, inúmeros estudos visando a melhoria da farmacocinética do RVT têm surgido nos últimos anos, utilizando diversas estratégias como as formas farmacêuticas com liberação modificada. Os sistemas nanoestruturados por exemplo, pode ser uma

alternativa para melhorar as propriedades físico-químicas do RVT e, consequentemente, numa possível potencialização das suas propriedades farmacológicas.

2.3 Nanotecnologia e Nanopartículas Poliméricas

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que tem como princípio a caracterização, elaboração e aplicação de estruturas na escala nanométrica (SAHOO et al., 2007). O termo "nanopartículas" tem sido aplicado para estruturas com diâmetros ente 1 a 1000 nm. Os sistemas nanoestruturados apresentam características físicas, químicas e biológicas até então não observadas na escala macrométrica, sendo consideradas estruturas de propriedades únicas e de grande interesse em várias áreas de estudo (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA et al., 2009; HOLAND et al., 2009; CHAU et al., 2007).

Historicamente, a nanotecnologia teve seu marco em 1959, quando na conferência da Sociedade Americana de Física, o físico americano Richard Feynman afirmou que o homem um dia conseguiria manipular os átomos de forma a construir estruturas de dimensões nanométricas, com características próprias e individuais (SANTAMARIA, 2012). Já nos anos 80, BINNING e ROHRER criaram os microscópios de tunelamento, o que permitiu a visualização em escala nanométrica e só assim uma possível manipulação de tais estruturas (MINCHIN; MARTIN, 2009). Atualmente é considerado um dos maiores avanços do conhecimento, desde setores de energia, eletrônica até indústrias farmacêuticas e é uma das principais atividades de pesquisa e desenvolvimento em diversos países (ROSSI – BERGMANN, 2008).

No campo farmacêutico a nanotecnologia é aplicada como uma nova estratégia para otimizar problemas relacionados ao desenvolvimento de formulações (KIPP, 2004). Sabe-se que as partículas com tamanhos inferiores a 300 nm, passam a apresentar perfis farmacocinéticos melhores, juntamente com um aumento no tempo de circulação sistêmica e cinética de liberação sustentada, sendo também possível o direcionamento de fármacos em sítios específicos de ação desejada (ZHANG et al., 2008, KONAN et al., 2003).

São diversas as estruturas que compõe os sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos, incluindo as micelas, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, entre outras. Todas objetivam a incorporação, absorção ou dispersão do ativo sólido, líquido ou gasoso em suas estruturas, afim de apresentar propriedades físico-químicas diferenciadas comparadas ao fármaco

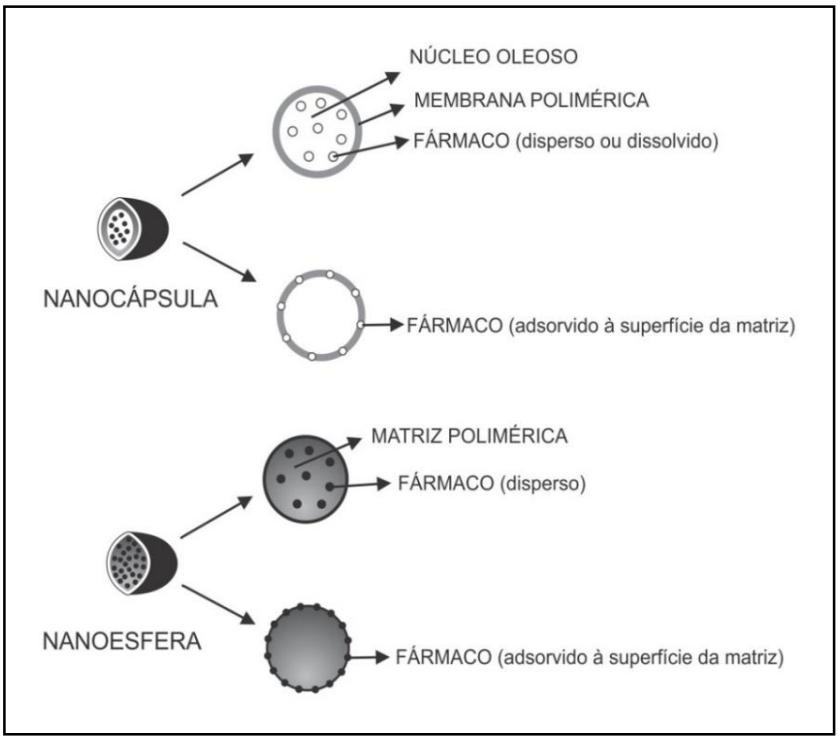
isolado. Além das vantagens atribuídas ao tamanho reduzido das partículas, essas estratégias também podem melhorar as características do próprio fármaco, como a proteção contra degradação, maior estabilidade e melhor solubilidade. Um exemplo é a incorporação de substâncias hidrofóbicas em matrizes hidrofílicas (MAINARDES, 2009; KLAYPRADIT, HUANG, 2008; JAFARI et al., 2008).

As nanopartículas poliméricas (NP), têm sido amplamente exploradas devido ao seu potencial terapêutico, além de apresentarem maior estabilidade nos fluídos biológicos, quando comparadas a outras estruturas nanométricas, como por exemplo as nanopartículas lipídicas sólidas (SCHAFFAZICK et al., 2003). As NP são elaboradas a partir de polímeros que podem ter origem natural ou sintética. Entre os principais polímeros empregados para encapsulamento de fármacos podemos mencionar a PCL (policaprolactona), o PLGA (poli ácido láctico-co-glicólico) e o PLA (poli ácido láctico). Entre os polímeros naturais destacam-se a albumina sérica (humana ou bovina), a quitosana, gelatina, alginato e colágeno. Todos estes polímeros são biocompatíveis e biodegradáveis, desse modo, os riscos para aplicações *in vivo* são reduzidos (KUMARI et al, 2010; PLAPIED et al., 2011).

As NP são consideradas como espécies de gaiolas químicas, capazes de armazenar em seu interior ou adsorver em suas estruturas os fármacos, de modo que podem ser usados como transportadores pelo organismo. Também controlam a taxa de liberação do fármaco ou do direcionamento para a liberação no ambiente fisiológico desejado, dependendo somente da sua forma e composição estrutural (DE MELO, PIMENTA, 2004). O desenvolvimento dessas estruturas visa inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente, para administração parenteral ou oral. A administração parenteral pode ser utilizada na distribuição de fármacos anticancerígenos e de antibióticos. A administração oral, por sua vez, visa principalmente à diminuição de efeitos colaterais, à proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal e no aumento da biodisponibilidade dos fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

São diversas as formas morfológicas que as NP podem apresentar, entre as quais destacam-se dois grandes grupos, como ilustra a Figura 3. A) *Nanocápsulas*, que possuem um núcleo oleoso revestidos por um invólucro polimérico, onde os fármacos estão incorporados na parede polimérica ou dissolvidos no núcleo oleoso; e B) *Nanoesferas*, formadas por uma matriz polimérica em que o fármaco está adsorvido por toda a matriz. (MAINARDES et al., 2006; LUNA e ANDRADE, 2011).

Figura 3: Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas

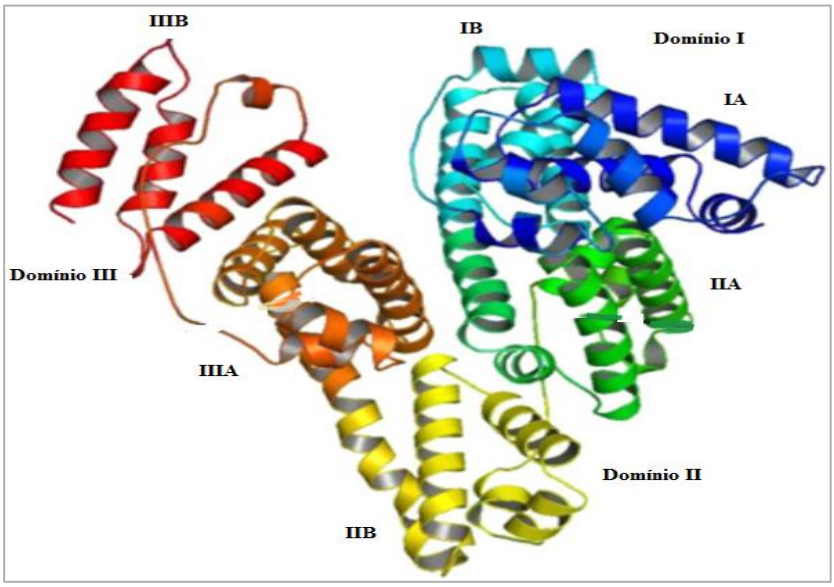


Fonte: KUMARI; YADAV; YADAV, 2010

2.4 Albumina Sérica Bovina (BSA)

A BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino (50mg/mL), tem peso molecular de 66kDA e possui uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos, divididos em três domínios (I, II e III) com grupos funcionais reativos como os tióis, aminas e carboxilas (HIRAYAMA et al., 1990; TAYEH et al., 2009; KRATZ, 2008) (Figura 4).

Figura 4: Representação dos domínios de ligação da albumina sérica bovina.



A solubilidade da BSA é 40% p/v em pH 7,4 e possui ponto isoelétrico (PI) de 4,7 em água (25°C), sendo carregada negativamente em pH 7,0 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH 4-8 (TANTRA et al., 2010). É considerada uma proteína multifuncional, com propriedades importantes para o funcionamento do organismo, como regulação da pressão osmótica, transportadora de substâncias endógenas e exógenas, tais como ácidos graxos, uma variedade de metabólitos, fármacos, nutrientes, entre outros (KRAGH-HANSEN et al., 2002). Sua propriedade mais marcante é a capacidade de ligar-se reversivelmente com vários ligantes, como por exemplo, cisteína, glutationa, bases de Schiff, além de complexos e íons metálicos (SEVILLA et al., 2007).

Possui uma estrutura muito similar à estrutura da albumina sérica humana (HSA), apresentando uma sequência idêntica de 75,6% de aminoácidos (MAJOREK et al., 2012), sendo assim, a BSA pode ser considerada atóxica e não antigênica. Somando-se à capacidade biodegradável, a BSA é facilmente adaptável ao organismo humano sendo o seu uso considerado seguro (MARIMOTO, FUJIMOTO, 1985). Em razão disso, a BSA tem despertado interesses na indústria farmacêutica como um atraente transportador de fármacos e têm sido empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos. Grande parte, por suas características de bioconjugação e biocompatibilidade, fácil purificação e solubilidade em água, permitindo a entrega intravenosa de moléculas (KRATZ et al., 1997; KRAGH-HANSEN et al., 2002).

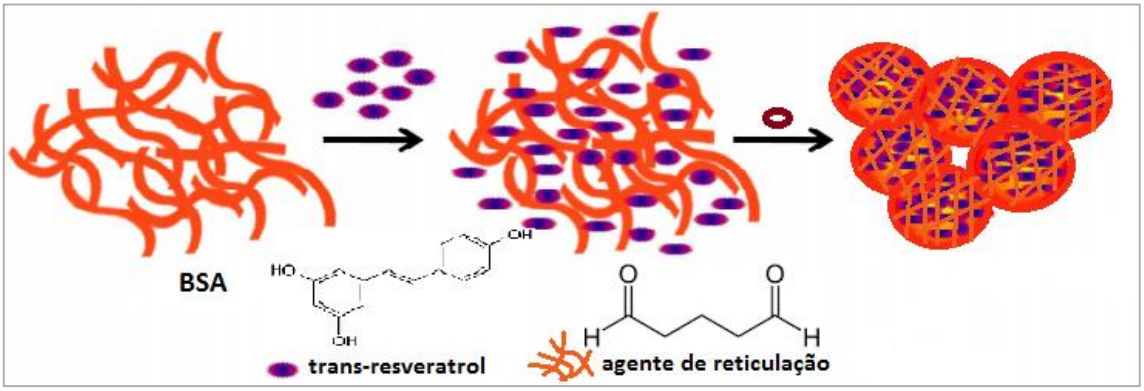
Dessa forma, a BSA é um excelente candidato para a preparação de NP, tendo como modelo outras nanopartículas já existentes no mercado. Tal como, a NP comercial Abraxane®, constituída de nanopartículas de HSA com paclitaxel para tratamento do carcinoma da mama metastático, que teve bom desempenho nos estudos clínicos (DAMASCELLI et al., 2001).

2.5 Obtenção de Nanopartículas Poliméricas pelo Método de Coacervação

O processo de dessolvatação, também conhecido como coacervação, é baseado na solubilidade diferencial do polímero em solução aquosa frente a um agente de dessolvatação (WEBER, 2000). Segundo a IUPAC *(Compendium of Chemical Terminology, eletronic version*) (2006) a coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais, onde a fase mais concentrada no componente coloidal é definida como coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio. A coacervação simples é induzida por modificações nas condições que causam a coacervação da molécula, como

por exemplo a adição de um não-solvente, adição de micro-íons ou até mesmo alterações na temperatura. Essas modificações são capazes de promover uma maior interação molécula-molécula e diminuir as interações molécula-solvente (LUZZI, 1970). O processo de coacervação simples por adição de um não-solvente, está representado esquematicamente na Figura 5:

Figura 5: Esquema ilustrativo do processo de coacervação



Fonte: Adaptado de BHUSHAN et al., 2015

Inicialmente adiciona-se lentamente um não-solvente, geralmente o etanol, em uma solução aquosa do polímero, BSA, para que haja a formação dos coacervados. Assim que o não-solvente é adicionado a solubilização do polímero torna-se dificultada e, por sua vez, precipita (IRACHE e ESPUELA, 2006). Para a encapsulação de outras substâncias, como fármacos, o mesmo deve ser solubilizado no solvente com o qual seja compatível. Durante a precipitação do polímero, as gotículas do polímero depositam-se em torno da substância a ser encapsulada, formando uma rede polimérica. Ao final do processo, para que haja a estabilização da nova estrutura é adicionado um agente de reticulação, o glutaraldeído, onde seus grupos aldeídos reagem com os grupamentos aminas do polímero, formando ligações cruzadas (covalentes), conhecidas como bases de Schiff (MEZIANI & SUN, 2003; MERODIO et al., 2001).

A eficiência de encapsulação de fármacos através do processo de coacervação é dependente de vários fatores associados principalmente as características do polímero, como sua capacidade de adsorção e, também, as características do complexo formado, concentração do agente reticulante, tensão superficial e pH do sistema. Essas propriedades interferem na formação da rede polimérica e consequentemente na retenção do material a ser encapsulado (SCHMITT et al.,1998; KRUIF et al., 2004).

GUO e colaboradores (2009) obtiveram nanopartículas poliméricas de BSA contendo RVT através da técnica de coacervação e observaram *in vitro*, uma alta

atividade antiproliferativa de células SKOV3 de carcinoma de ovário humano. KAMATH e colaboradores (2013) também sintetizaram nanopartículas de BSA contendo RVT e aprisionaram em uma estrutura tridimensional de PCL (PCL-RNP). Após, avaliaram o potencial de formação óssea *in vitro,* utilizando células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea humana. Os resultados demonstraram que PCL-RNP melhorava significativamente a mineralização óssea, devido à liberação controlada e prolongada do RVT, e dessa forma aumentando o potencial terapêutico na engenharia do tecido ósseo.

2.6 Caracterização das Nanopartículas

A caracterização físico-química é uma etapa de grande importância no desenvolvimento das nanopartículas. As características apresentadas pelas nanopartículas são dependentes da composição quali-quantitativa das formulações, sendo pré-requisitos cruciais para desenvolvimento desses sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Entre os ensaios que avaliam as características físico-químicas, destacam-se: a determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), carga superficial (potencial zeta – POTENCIAL ZETA), avalição morfológica, difração de raio-X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica derivada (DTG) e espectroscopia de fluorescência.

- **Diâmetro médio e Índice de Polidispersão:** esses parâmetros são de suma importância, pois avaliam de modo geral, o tamanho e a uniformidade das partículas. A literatura relata que nanopartículas carreadoras de fármacos devem possuir diâmetros médios menores que 300 nm (GUPTA, KOMPELLA, 2006) e o IP entre 0 e 0,2. Sabe-se que quanto menor o IP maior será a homogeneidade entre as nanopartículas em suspensão (AVADI et al, 2010).

Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons (*Dynamic Light Scattering*), que avalia os diâmetros com base na teoria do movimento Browniano das partículas. Em suma, o raio hidrodinâmico médio é calculado a partir da intensidade de luz dispersa (r_h) que varia conforme o tamanho das partículas, bem como a velocidade dos movimentos Brownianos (FINSY, JAEGER, 1991).

A polidispersão é um parâmetro calculado a partir da análise da função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico da luz. Nesta análise, assume-se

que as partículas possuem um único tamanho e um ajuste exponencial simples é aplicado com à função de autocorrelação. A polidispersão foi definida em IP, pois representa a variância relativa (MALVERN, 2004).

- **Determinação do Potencial Zeta:** a maior parte das partículas adquirem cargas em sua superfície quando em contato com um líquido (BEDÊ, 2010). Assim, o POTENCIAL ZETA é à medida que reflete o potencial elétrico da superfície das partículas. A qual é dada pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

A medida do potencial zeta é de forma indireta e a técnica mais utilizada é através da mobilidade eletroforética. A análise consiste em introduzir uma suspensão coloidal diluída numa cuba com dois eletrodos e aplicar um potencial elétrico à suspensão. As partículas carregadas irão se mover na direção do eletrodo de carga contrária e o quociente de velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética. O potencial zeta é calculado através de equações, as mais usadas são as aproximações de Smoluchowski ou a de Debye.

Analisada em módulo, as partículas que apresentam um alto potencial zeta >|30 mV|, irão se repelir em solução, devido a grandes forças repulsivas que tendem a evitar agregação e uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal. Ao contrário, partículas com baixo potencial zeta <|5 mV| resultam em aglomeração e uma baixa estabilidade (MALVERN, 2004; SCHAFFAZICK et al., 2003).

- **Calorimetria Exploratória Diferencial e Análise Termogravimétrica:** Possíveis interações entre os diferentes componentes presentes na formulação podem ser observadas utilizando técnicas termoanalíticas. O DSC é um método que fornece informações a respeito da morfologia do polímero, cristalino ou amorfo e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associados aos sistemas poliméricos (MAGENHEIM, BENITA, 1991). A técnica de DSC fornece a temperatura e a entalpia de fusão das partículas, altos valores de entalpia de fusão sugerem uma alta organização cristalina, pois esse tipo de estrutura necessita de mais energia para superar as forças de coesão da rede cristalina do que um material amorfo (ATTAMA et al., 2006). A TGA consiste em acompanhar a variação de massa de uma amostra ao longo do tempo em altas temperaturas e a DTG (termogravimetria derivada) é um rearranjo matemático, no qual a derivada da variação da massa em relação ao tempo, em outras palavras a DTG é a derivada da TGA (CAVALHEIRO et al., 1995).

- **Difração de Raio X e Espectroscopia do Infravermelho:** A DRX é considerada uma técnica versátil e não-destrutiva que revela informações sobre a estrutura cristalina de materiais naturais e sintéticos. Pode-se também afirmar que é um método poderoso para o estudo de nanomateriais, pois os difratogramas permitem a análise dos compostos cristalinos fornecendo detalhes do tamanho, perfeição e orientação cristalográfica (BEYERLEIN et al., 2010). Substâncias que apresentam forma cristalina, demonstram picos bem definidos nos difratogramas, contrariamente, substâncias amorfas não apresentam os mesmos planos cristalinos característicos dos cristais (CAMPOS, 2005).

A FTIR apresenta-se como uma poderosa ferramenta na identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros. Pois é capaz de identificar diferentes ligações químicas entre átomos pelas deformações rotacionais e vibracionais, as quais absorvem energia em determinada frequência de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos (SKOOG et al., 2010). Estas vibrações são quantizadas dando origem ao espectro vibracional, que costuma aparecer como uma série de bandas características das ligações químicas e grupos funcionais presentes nos compostos (SOLOMONS, FRYHLE, 2001). A região do espectro de infravermelho compreende radiação com número de onda no intervalo de aproximadamente 4000 a 400cm^{-1} (SKOOG et al., 2002).

- **Espectroscopia de Fluorescência:** Espectroscopia de fluorescência também pode ser considerada um método para determinar a interação entre as moléculas. As moléculas em seu estado fundamental, apresentam uma determinada configuração, em que a energia total é a menor possível. Quando a molécula absorve um fóton de luz, por exemplo, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado, assumindo uma nova configuração de maior energia. O retorno ao estado eletrônico fundamental, com o relaxamento vibracional do estado excitado, emite luz. Sendo assim, a fluorescência é denominada como um fenômeno que envolve a perda de energia de uma molécula no estado excitado por emissão de luz (LAKOWICZ, 1999; VALEUR, 2001).

As medidas de fluorescência das moléculas podem nos dar informações sobre: conformação, sítios de ligação, interação com solventes, grau de flexibilidade, entre outros. A técnica apresenta grandes vantagens quando comparada a outros métodos, pois é muito sensível, tem um amplo espectro de análise e o erro inerente é praticamente constante em todo o intervalo de resposta (VALEUR, 2001; SIERRA, et al., 1996).

A análise se baseia em gerar espectros de emissão composta por uma curva de intensidade de fluorescência (IF) em função do comprimento de onda (λ) dados em

nanômetros (nm), fixando o comprimento de onda de luz de excitação. A sensibilidade da técnica está relacionada à estrutura química dos fluoróforos e à polaridade do solvente no qual estão dissolvidos. (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 1999).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolvimento, caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antitumoral *in vitro* de nanopartículas de albumina bovina contendo resveratrol.

Objetivos Específicos

- ✓ Obtenção de nanopartículas de albumina sérica bovina contendo resveratrol (NP-RVT) pelo método de coacervação;
- ✓ Determinação da eficiência de encapsulação do RVT nas nanopartículas;
- ✓ Caracterização físico-química das nanopartículas;
- ✓ Avaliação da estabilidade das NP-RVT frente a diferentes ambientes de armazenamento;
- ✓ Determinação do perfil de liberação do fármaco *in vitro* e a cinética de liberação*;*
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das NP-RVT, pelos métodos de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ e do HOCl.
- ✓ Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* sobre linhagem de células B16F10 (melanoma), pelo método do MTT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Reagentes

- ✓ *Trans*-Resveratrol (Pharmanostra Brasil®) cedido pelo Laboratório Vicofarma;
- ✓ Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Água ultrapurificada (Sistema Milli-Q Gradiente Milipore®);
- ✓ Etanol (Synth®);
- ✓ Glutaraldeído (Vetec®);
- ✓ Metanol (grau HPLC) (J.T. Baker);
- ✓ KBr - Brometo de potássio, grau espectroscópico (Sigma-Aldrich®);
- ✓ ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec®);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico P.A. (Biotec®);
- ✓ $K_2S_2O_8$ - Perssulfato de Potássio (Sigma-Aldrich®);
- ✓ NaOCl - Água Sanitária (Qboa®);
- ✓ TMB – Tetrametilbenzedina (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Dimetilformaldeido (Biotec®);
- ✓ Ácido Acético (Vetec®);
- ✓ KI – Iodeto de Potássio (Biotec®);
- ✓ PVA – Poli(álcool vinílico) (Sigma Chemical Co., USA);
- ✓ Tween 80 - Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich®);
- ✓ MTT - brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Azul de Trypan (Sigma-Aldrich®);
- ✓ Soro fetal bovino (Gibco®);
- ✓ Cultura Iscove´s (Sigma-Aldrich®);

Equipamentos

- ✓ Agitador magnético (Químis®);
- ✓ Shaker – Incubadora com agitação orbital (Químis®);
- ✓ Microcentrífuga refrigerada CT-15000R (Cientec®);

- ✓ Aparelho Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters®);
- ✓ Detector de Fotodiodo (PDA) (Waters®);
- ✓ Coluna de fase reversa C18 (25cm X 4mm) de tamanho de partícula 5 µm (Vertical®);
- ✓ Aparelho de Infravermelho Nicolet IR200 FT-IR (Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Difratômetro de raios X D2 PHASER (Bruker®);
- ✓ NanoBrook 90Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation®);
- ✓ ZetaSizer ZS (Malvern®);
- ✓ Leitor de microplacas (Spectra Max 190 – Molecular Devices®);
- ✓ Membranas filtrantes de acetato de celulose 0,22 µm (Millipore®);
- ✓ Equipamento de análises térmicas Mod. SDT Q600 – simultâneo DSC/TGA (TA Instruments®);
- ✓ Espectrofotômetro FlexStation 3 multi-mode Microplate Reader (Molecular Devices®);
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo - MIRA3 LMU, Tescan Orsay Holding, Czech Republic;
- ✓ Capela de fluxo laminar vertical (Veco®);
- ✓ Estufa de CO_2 (Quimis®);

4.2 Métodos

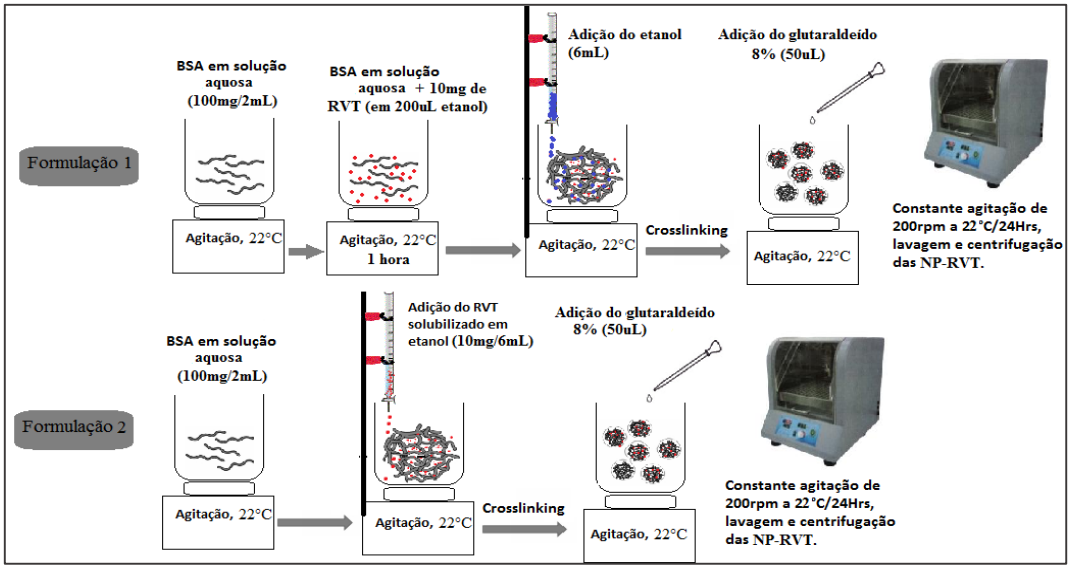
4.2.1 Preparação de Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina contendo Resveratrol (NP-RVT)

As NP-RVT foram obtidas através do método de coacervação descrito por KAMATH e colaboradores (2014), com algumas modificações. O processo iniciou com a solubilização de 100 mg de BSA em 2 mL de água ultrapurificada, sob agitação magnética. A adição do RVT seguiu duas vias (Figura 6):

Formulação 1 – O RVT foi solubilizado em 200 µL de etanol e adicionados gota-a-gota na solução aquosa de BSA. Após, a solução foi incubada por uma hora sob agitação em Shaker (200 rpm) a temperatura ambiente, protegidas da luz. Ao final do tempo de incubação, 6 mL de etanol foram adicionados com o auxílio de uma bureta, mantendo a solução sob constante agitação, para que houvesse a saturação do agente dessolvatador, conferido pela turvação da solução.

Formulação 2 – O RVT foi solubilizado em 6 mL de etanol e adicionado gota-a-gota à solução de BSA, com o auxílio de uma bureta, sem tempo de incubação prévia, seguindo as mesmas condições da formulação 1. Ao final de ambos os processos, foram adicionados 50 µL do agente reticulante, glutaraldeído 8% e, levado novamente para incubação em Shaker à 200 rpm, por 24 h em temperatura ambiente.

Figura 6: Representação ilustrativa da obtenção das NP-RVT pelo método de coacervação.



Fonte: O autor.

Por fim, as NP-RVT passaram por um processo de lavagem seriadas. Onde, as NP-RVT foram recolhidas em tubos de microcentrifugação e ultracentrifugadas à 15500 rpm por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e as NP-RVT foram ressuspensas em água ultrapurificada (500 µL), o processo de lavagem foi repetido.

O sobrenadante foi separado para posterior análise da eficiência de encapsulação e as NP-RVT foram mantidas em solução aquosa, protegidas da luz. O mesmo processo foi realizado para a síntese das NP-brancas, sem a adição do RVT.

4.2.2 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

4.2.2.1 Diâmetro Médio da Partícula e Índice de Polidispersão (IP)

Para a determinação do IP e do diâmetro médio das partículas foi empregada a técnica de espectroscopia de correlação de fótons, conhecida também como "*Dynamic light scattering".* As NP-RVT foram ressuspensas em água ultrapurificada 1:100 (v/v) e analisadas. Os parâmetros estabelecidos na técnica foram: ângulo de espalhamento fixado

em 90º, temperatura de 25 ºC e comprimento de onda do laser igual a 532 nm. Cada amostra foi mensurada 3 vezes, utilizando corridas de 2 min cada, a média e o desvio padrão foram calculados a partir da análise de 10 amostras.

4.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A análise morfológica das NP-RVT foi realizada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), com uma tensão de aceleração de 5.0kV. As NP-RVT foram ressuspensas em água ultrapurificada na proporção de 1:10, alíquotas da suspensão foram depositadas sobre o suporte de amostras e secas em estufa a 45°C. Após completa secagem, os filmes foram recobertos com uma fina camada de ouro por meio de um metalizador. As micrografias foram analisadas com aumento de 36.000 e 61.000 vezes.

4.2.2.3 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado a partir da medida da mobilidade eletroforética das NPs. As NP-RVT foram ressuspensas em água ultrapura (1:100) e inseridas em uma cubeta eletroforética a 25°C e analisadas. O limite do potencial foi definido em ± 150mV, as análises foram de 10 replicatas e os resultados calculados em média e desvio padrão.

4.2.2.4 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do RVT em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação do RVT por CLAE, seguiu conforme a metodologia determinada por LINDNER et al. (2013). A fase móvel consistiu em metanol/água (51:49 v/v), com fluxo isocrático de 0,9 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura da coluna e da amostra de 25°C e o detector PDA definido com comprimento de onda de 306 nm.

Inicialmente foi determinado a linearidade, conforme o preconizado pela Anvisa (2013). A linearidade é obtida através do cálculo de regressão linear curva analítica (área do pico *versus* concentração). Como base, foram analisadas triplicatas de 8 concentrações de RVT (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 µg/mL), preparadas a partir de uma solução mãe, com concentração de 1 mg/mL em metanol/água (50:50, v/v), ao final, foi avaliado o coeficiente de correlação da curva analítica (r), sendo ideal o mais próximo de r = 1.

Os Limites de Detecção e Quantificação foram determinados através de cálculos (Equação 2 e 3) com os dados fornecidos pela curva analítica, construída para a determinação da linearidade:

$$LD = \frac{\sigma}{b}\ x\ 3{,}3 \qquad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{\sigma}{b}\ x\ 10 \qquad \text{Equação 3}$$

Onde: σ é o desvio padrão médio do intercepto y e b é a inclinação da curva analítica ou *slope.*

Também foi realizado o teste de especificidade, a análise foi através da comparação dos cromatogramas do sobrenadante das NP-RVT e do sobrenadante das NP-brancas, recolhidos após a obtenção das NP. A análise buscou avaliar a ocorrência de sobreposição de picos que interferissem na quantificação do RVT.

4.2.2.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação

A quantificação da droga presente nas NP, ou seja, a quantidade de RVT encapsulado nas NP-RVT, foi determinado indiretamente por CLAE, seguindo as condições cromatográficas estabelecidas anteriormente. O sobrenadante separado e conservado na última etapa de preparação das NP-RVT, foi diluído (1:100) em metanol:água (50:50 – v/v), posteriormente, filtrado em membrana 0,22 µm e injetados no sistema cromatográfico, todas as análises foram realizadas em triplicata.

Ao término da análise, a concentração da droga livre foi determinada, ou seja, a quantidade de RVT que não incorporou nas NPs e através da Equação 4, foi possível encontrar a EE%:

$$EE\% = \frac{(RVTinicial - RVT\ livre)}{RVT\ inicial}\ X\ 100 \qquad \text{Equação 4}$$

Onde: RVTinicial corresponde à concentração de RVT adicionado inicialmente e RVTlivre é a concentração do fármaco que não incorporado às nanopartículas durante o processo de formação. A EE% foi expressa em média e desvio padrão (n = 10).

4.2.2.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de RVT e mistura física (RVT e BSA, proporção 1:10) e as amostras liofilizadas de NP-RVT e NP-brancas foram, separadamente, compactadas com o brometo de potássio (KBr) em prensa hidráulica, formando pastilhas. Posteriormente, foram analisadas em espectrofotômetro na região do infravermelho no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}.

4.2.2.7 Difração de Raio X (DRX)

A DRX foi realizada em difratômetro utilizando radiação Kα1 de cobre, com comprimento de onda (λ) igual a 1,5418 Å à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas com corrente de 10mA e tensão de 30 kV. As amostras RVT e as amostras liofilizadas (NP-brancas e NP-RVT), foram dispostas em um suporte de vidro e analisadas na faixa de ângulos de 10 a 70°.

4.2.2.8 Análise Térmica (Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (DTG))

As amostras de RVT, BSA e as amostras liofilizadas NP-RVT e NP-brancas, foram pesadas em cápsulas de alumina e levadas ao analisador de TGA e DSC. As cápsulas foram aquecidas em uma velocidade de 10°C/min, entre 30 e 450°C, sob atmosfera de nitrogênio numa vazão de gás de arraste de 100 mL/min. A célula de DSC foi previamente calibrada utilizando padrões. A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas da derivada do TGA (DTG) e o DSC foi analisado através das temperaturas de fusão.

4.2.2.9 Espectroscopia de Fluorescência

A associação do RVT com a BSA na formação das nanopartículas foi analisada através do sinal de intensidade de fluorescência (IF) da BSA, RVT, NP-branca, NP-RVT e mistura física (BSA e RVT proporção 10:1) diluídas em tampão fosfato (PB pH: 7,4). As amostras foram excitadas em λ = 280 nm e os espectros de emissão correspondentes foram registrados na faixa de 290-510 nm, num intervalo de 10 nm.

4.2.3 Determinação do Perfil de Liberação *In Vitro*

4.2.3.1 Ensaio de Solubilidade do RVT

Para determinar o meio receptor no estudo de liberação, foi realizado o ensaio de solubilidade do RVT em tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) com diferentes tensoativos.

Inicialmente, uma quantidade em excesso do RVT foi adicionada em 10 mL de tampão PBS (50mM, pH 7,4) contendo: PVA (1%), PVA (5%), Tween 80 (1%) ou Tween 80 (5%). As soluções foram mantidas sob agitação (150 rpm), a 37°C, durante 48 h. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtro de 0,22 µm e quantificadas por CLAE. O ensaio foi realizado em triplicata para todas as condições, e o meio receptor que melhor solubilizou a droga foi escolhido para o estudo de liberação *in vitro*.

4.2.3.2 Determinação do Perfil de Liberação

A determinação da liberação *in vitro* do RVT a partir das NP-RVT, utilizou o método de agitação em incubadora orbital do tipo "shaker", seguido de ultracentrifugação (CASA et al., 2014). As NP-RVT foram diluídas no meio dissolutor (Tampão PBS 50 mM pH:7,4), contendo o tensoativo estabelecido previamente no ensaio de solubilidade.

As amostras em triplicatas, foram incubadas a 37°C sob agitação de 150 rpm em Shaker. Em tempos pré-determinados: 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas, as amostras foram ultracentrifugadas e os sobrenadantes recolhidos e filtrados em filtros de 0,22 µm, o RVT liberado foi quantificado por CLAE. O precipitado foi ressuspendido novamente em meio dissolutor e incubados em Shaker até a próxima tempo pré-estabelecido. Os resultados da liberação acumulativa do RVT (%) ao longo das horas, foram plotados em uma curva do percentual acumulativo da droga liberada em função do tempo.

4.2.3.3 Determinação da Cinética e do Mecanismo de Liberação

Para a obtenção do mecanismo de liberação do RVT a partir das NP-RVT, foi realizado um estudo matemático do perfil de liberação de acordo com os modelos de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi e o modelo de Korsmeyer-Peppas, por meio do software *MicroMath Scientist*®, conforme com as equações do Quadro 3 (RITGER, PEPPAS, 1987).

Quadro 3: Modelos matemáticos de cinética de liberação

Modelo	***Equação***
Zero Ordem	$C=kt$
Primeira Ordem	$C= 100\ (1 - e^{-kt})$
Segunda Ordem	$C= 100\ [1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Higuchi	$C= k\sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas	$Ft= at^{n}$

C, percentual do fármaco dissolvido no tempo **t**; **k**, **α** e **β**, constantes cinéticas de dissolução; **A** e **B**, concentrações iniciais do fármaco que contribuem para os dois momentos de dissolução do fármaco. **Ft**, fração do fármaco dissolvido no tempo **t**; **a**, constante que mostra as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; **n**, expoente de liberação que indica o mecanismo que essa ocorre.

4.2.4 Teste de Estabilidade

A estabilidade das NP-RVT foi avaliada frente à diferentes condições de armazenamento, a fim de verificar a permanência das características físico-químicas iniciais no decorrer do tempo. O teste foi realizado num período de 3 meses e as amostras foram analisadas em triplicata, semanalmente.

Após a obtenção das NP-RVT, as mesmas foram ressuspensas em água, protegidas da luz e distribuídas igualmente em 3 lotes. Em seguida, os lotes foram armazenados em temperatura ambiente (25-20°C), sob refrigeração (2-8°C) e congeladas (-20°C). Os lotes congelados foram divididos em dois grupos: no primeiro, as NP-RVT foram ressuspensas em água ultrapurificada e, no segundo, em sacarose 5%. Semanalmente, foram analisados os seguintes parâmetros: diâmetro médio e o índice de polidispersão (conforme o item 4.2.2.1), o potencial zeta (item 5.2.2.3) e o teor de fármaco liberado das NPs (conforme o item 5.2.2.5).

Os resultados semanais de cada ambiente, foram analisados e as comparações estatísticas feitas por ANOVA com intervalo de confiança de 95%, o pós-teste aplicado foi o de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante *In Vitro*

4.2.5.1 Captura do Radical $ABTS^{\bullet+}$

O teste antioxidante *in vitro* que avalia a inibição do $ABTS^{\bullet+}$, seguiu a metodologia descrita por RE et al. (1999), com algumas modificações.

O radical foi formado a partir de uma solução aquosa de ABTS (7 mM) com perssulfato de potássio (2,45 mM), incubados à temperatura ambiente na ausência de luz, por 12 h. A solução de trabalho foi preparada através da diluição do radical em tampão fosfato (PB) (50 mM, pH 7,4) até obter absorbância próxima à 0,70 em 734 nm. Devido à instabilidade do radical, a solução de trabalho foi preparada todos os dias e válida somente para o momento da análise. As amostras de RVT, NP-RVT e NP-brancas em diferentes concentrações (0,5 – 5,0µg/mL) foram incubadas juntamente com a solução do radical a 37°C, por 30 min. A complexação entre o $ABTS^{\bullet+}$ e amostras, foram medidas pelo decréscimo da absorbância após a incubação, em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 734 nm.

A análise da atividade antioxidante foi temporal, analisando as mesmas amostras nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$, de acordo com a equação 5:

$$Inibição = \frac{AC - AA}{AC}\ x\ 100 \qquad \text{Equação 5}$$

Onde, *AC* é a absorbância do controle e *AA* é a absorbância da amostra.

4.2.5.2 Inibição do Ácido Hipocloroso (HOCl)

O teste antioxidante *in vitro* que avalia a inibição do HOCl seguiu a metodologia de PAINO et al. (2005), com algumas modificações. O HOCl foi preparado a partir de uma solução de NaOCl (hipoclorito de sódio) em água basificada (pH:12) e a concentração foi determinada espectrofotometricamente pelo quoeficiente de extinção molar 350 $cm^{-1}M^{-1}$, em 292 nm. O revelador, TMB (3,3',5,5'–tetrametilbenzidina), foi solubilizado em dimetilformamida (0,014 mol/L), seguido da adição de iodeto de potássio (0,01 mol/L) e ácido acético (0,8 mol/L).

As amostras de RVT, NP-RVT e NP-brancas em diferentes concentrações (0,5 – 5,0 µg/mL) foram incubadas por 15 min juntamente com a solução de HOCl e tampão PB (50 mmol/L, pH 7,4). Em seguida, a solução de TMB foi adicionada e incubada por mais 5 min ao abrigo da luz, a 37°C. A leitura do produto de oxidação foi feita em espectrofotômetro a 652 nm, em tempos de 0, 24, 48, 72 h. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O estudo relacionado ao IC_{50} (concentração que apresenta 50% da capacidade sequestrante total do $ABTS^{\bullet+}$) também foi realizado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA 7.0 (Stafsoft, Inc.). A avaliação foi por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, com diferença estatística significativa de $p < 0,05$.

4.2.6 Avaliação da Atividade Citotóxica *In Vitro*

A toxicidade celular foi avaliada pelo método de MTT, descrito por DENIZOT e LANG (1986), com algumas modificações. Para os ensaios foram utilizadas células da linhagem B16F10 ATCC CRL-6475 (melanoma murino), mantidas em garrafas, em meio de cultura Iscove´s, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina. Foram realizados repiques periódicos (2×10^5 células/mL) até atingirem a densidade de confluência. Os repiques eram mantidos em estufa de CO_2 nas seguintes condições: 37 °C em atmosfera úmida, contendo 5 % de CO_2. As culturas eram manipuladas sob fluxo laminar e com material previamente esterilizado. A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão do Azul de Trypan 0,4% e através da Equação 6, obteve-se a viabilidade celular.

$$\%\ \text{Viabilidade} = \frac{\text{n° células não coradas}}{\text{n° total de células}} \times 100 \qquad \text{Equação 6}$$

Para o ensaio foram semeadas 1×10^4 células/mL, em placas de 96 poços e incubadas por 24 h, em estufa de CO_2, para adesão das células. Após esse período, o meio foi removido e adicionado um novo meio contendo RVT livre e RVT nanoencapsulado, separadamente. As concentrações pré-determinadas do RVT foram de 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 e 1,95 µg/mL, os controles utilizados foram: apenas o meio, etanol e NP-brancas. Os tempos de análise foram de 24, 48, 72 e 96 h.

Ao término da incubação, o meio foi retirado e adicionado 50 µL de MTT (1mg/mL) ((brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio) e incubados por mais 3 h. Após a incubação, o MTT foi retirado e adicionado 50 µL de etanol em cada poço, para solubilizar completamente os cristais e, após 5 min adicionou-se 150 µL de tampão PBS (pH = 7,4) e álcool isopropílico, na proporção 1:2. As placas foram agitadas e então as absorbâncias das soluções foram analisadas em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de placas.

A viabilidade celular foi obtida através da Equação 7:

$$\%\ \text{Viabilidade} = \frac{\text{Abs Amostra}}{\text{Abs do controle}} \text{ x } 100 \qquad \text{Equação 7}$$

O ensaio foi realizado em quadruplicata, sendo os resultados expressos em percentual de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Os resultados do ensaio de citotoxicidade para o RVT livre, NP-RVT e NP-brancas, foram analisados e comparados estatisticamente por ANOVA, com pós teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção de Nanopartículas de Albumina contendo Resveratrol

A metodologia de coacervação foi utilizada para a obtenção das NP-RVT, essa técnica foi descrita como uma das primeiras técnicas de encapsulação de substâncias. O processo de coacervação pode ser induzido por várias estratégias capazes de precipitar o polímero em diversas formas, destacando a mudança de temperatura, modificação de pH, adição de um sal ou de um polímero incompatível ou solvente incompatível, também denominado de "não-solvente" (MARTY, 1977; STASSEN et al., 1994).

Na síntese das NP-RVT utilizou-se o etanol como não-solvente para a BSA, com a finalidade de precipitá-la e ao mesmo tempo solubilizar e encapsular o RVT na cadeia polimérica. Dessa forma, o RVT tende a permanecer adsorvido ou disperso entre as estruturas durante a solidificação BSA. A nova conformação estrutural da BSA ligada ao RVT é estabelecida através das interações químicas como forças de Van Der Walls e ligações de hidrogênio, formando então as NP-RVT (MERODIO et al., 2001, ELZOGHBY et al., 2012).

Diante à metodologia proposta, foram realizadas modificações na técnica dando origem à duas formulações. A formulação 1, denominada "*Com incubação*", onde o RVT foi solubilizado em uma quantidade mínima de etanol, em seguida, adicionado à solução de BSA e incubado por uma hora, para então adicionar o etanol total (6 mL) e ocorrer o processo de precipitação da BSA. A formulação 2, denominada de "*Sem incubação*", o RVT foi solubilizado no etanol total que foi adicionado na solução de BSA (6 mL) (MERODIO et al., 2001). A Tabela 1 mostra as principais características das NP-RVT das duas formulações.

Tabela 1: Resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das NP-RVT obtidas a partir da técnica de coacervação "com" e "sem" tempo de incubação.

	NP-RVT com incubação	*NP-RVT sem incubação*
Diâmetro médio (nm)	175 ± 6^{a}	187 ± 11^{a}
Índice de polidispersão	$0{,}13 \pm 0{,}01^{a}$	$0{,}11 \pm 0{,}01^{b}$
Potencial Zeta (mV)	-38 ± 1^{a}	-51 ± 2^{b}
Eficiência de encapsulação (%)	60 ± 5^{a}	27 ± 7^{b}

médias ± desvio padrão, letras iguais significam igualdade estatística e letras diferenças desigualdade estatísticas (Teste t Student, $P \leq 0{,}05$), n = 10

Nota-se que a houve uma diferença estatística significativa entre as formulações, para os seguintes parâmetros: o IP, potencial zeta e EE% e somente o diâmetro médio apresentou valores equivalentes. O IP fornece informações sobre a homogeneidade entre os diâmetros das partículas (AVADI et al., 2010). Ambas as formulações apresentaram IP abaixo de 0,2, indicando uma estreita distribuição de tamanho entre as nanopartículas. O mesmo ocorreu para o potencial zeta, as formulações apresentaram potencial, em modulo, distante da neutralidade (0 mV), sugerindo uma alta estabilidade físico-química da suspensão coloidal (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A EE% praticamente duplicou com a inserção do tempo de incubação, obtendo-se uma maior encapsulação quando o RVT já estava presente na solução de BSA, durante o processo de coacervação. Sugere-se que a droga sob agitação constante com o polímero, por um tempo prolongado, pode levar a uma maior ocupação dos sítios de ligação da BSA pelo RVT e, por conseguinte, as interações químicas entre os mesmos. Diante os resultados expostos, optou-se pela formulação 1, "*com incubação",* para a realização dos demais ensaios realizados nesse trabalho.

A modificação feita na metodologia, com a inserção do tempo de incubação, antes do processo de dessolvatação, foi realizada baseando-se nos resultados obtidos por MERODIO et al. (2001). Em seu trabalho, MERODIO e colaboradores compararam diferentes estratégias efetuadas na técnica de coacervação, como alterações na ordem de adição dos compostos e inclusão de diferentes tempos de incubação. A melhor EE% foi obtida com incubação de 1 h entre a droga com a BSA, seguidos dos processos de coacervação e reticulação, respectivamente. O mesmo ocorreu para as NP-RVT obtidas no presente trabalho, tendo uma maior EE% quando o RVT permaneceu em solução com a BSA por uma hora antes do processo de coacervação.

O glutaraldeído foi utilizado como agente de reticulação, na menor concentração considerada necessária para completa estabilização da estrutura polimérica (WEBER et al., 2000). A incorporação do glutaraldeído na cadeia polimérica é através da formação das bases de Shiff (C=N), formadas pelas interações químicas entre o aldeído do glutaraldeído e os grupos aminos da BSA. I*n vivo,* as bases de Shiff são reduzidas a C-N, pois sofrem transformações no fígado e no baço. E a molécula reduzida é estável e dificilmente retornará ao estado de aldeído (WEI, 2008). Contudo, as NP-RVT foram purificadas através de lavagens e ultracentrifugações seriadas, para a retirada de todo o glutaraldeído que não incorporou na cadeia polimérica, para que não houvesse vestígios de glutaraldeído na forma livre presente na formulação.

Apesar da toxicidade comprovada do glutaraldeído em seu estado puro, o mercado oferece algumas opções de formulações que utilizam o glutaraldeído reticulado com proteínas plasmáticas. Muitas já estão na avaliação clínica de fase III, como exemplos, podemos citar o Hemopure, Hemolink e PolyHeme, que até o momento não apresentaram nenhuma toxicidade aparente (WEI, 2008).

5.2 Caracterização Físico-Química

5.2.1 Diâmetro Médio da Partícula e Índice de Polidispersão (IP)

Visualmente, as soluções aquosas das NPs-brancas e NP-RVT apresentaram coloração branca com turbidez considerável, denotando um aspecto leitoso característico de NP de BSA. O sistema apresentou-se bem disperso, sem aglomerações detectáveis a olho nu. Para a análise, as amostras foram diluídas, a fim de evitar diâmetros falsos, maiores do que os reais, devido ao baixo movimento browniano que as NP apresentam quando estão concentradas. Logo, em maiores diluições o movimento das NP é maior, levando ao cálculo de um diâmetro mais fidedigno (FINSY, JAEGER, 1991). Os diâmetros médios e o IP das NPs estão representados na Tabela 2, decorrentes da média e desvio padrão de 10 amostras:

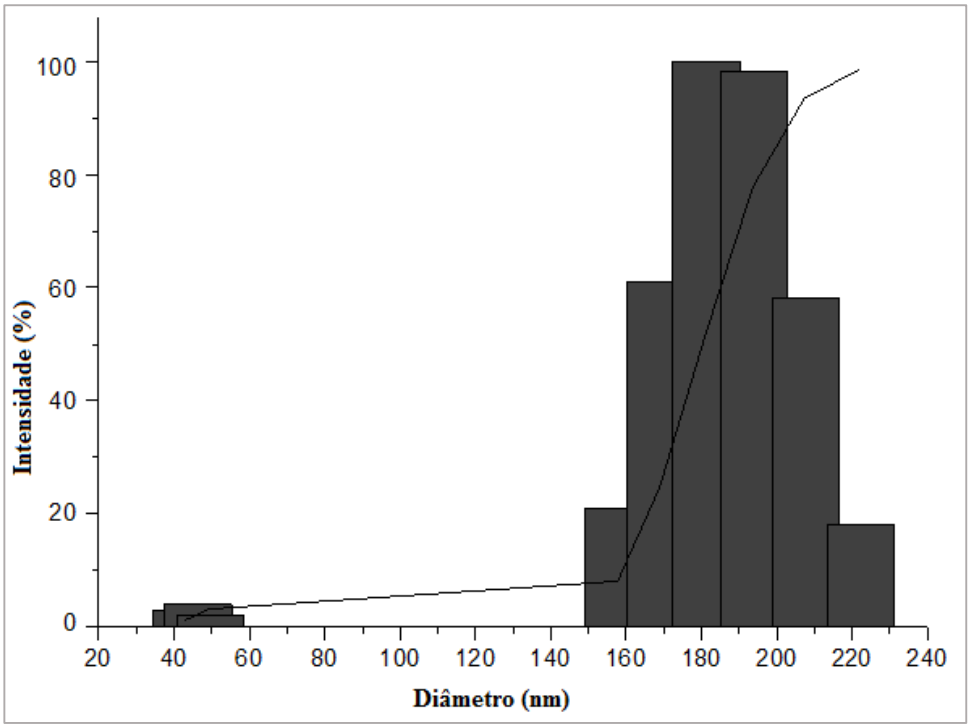
Tabela 2: Diâmetro médio e índice de polidispersão de NP-brancas e NP-RVT.

Formulações	*Diâmetro médio*	*Índice de Polidispersão*
NP-RVT	175 ± 6	0,13 ± 0,01
NP-branca	211 ± 6	0,10 ± 0,02

n = 10, média ± desvio padrão.

As NP apresentaram diâmetros nanométricos abaixo de 300 nm e o índice de polidispersão menor que 0,2, considerados ideais para NP carreadoras de fármacos (AVADI, et al., 2010). Entretanto, houve a formação de duas famílias – sistema bimodal – constituídas de uma família principal, com tamanhos entre 150-230 nm e, uma família com diâmetros abaixo dos 100 nm, responsável por 4% das NPs formadas (Figura 7).

Figura 7: Distribuição do diâmetro médio de uma amostra representativa de NP-RVT, média do diâmetro médio de 176,2 nm e índice de polidispersão de 0,108.



O método de preparo e a composição quali-quantitativa das NP são fatores determinantes para diâmetro médio e o IP apresentado pelas NP. O esperado são NP com diâmetros entre 100-300 nm e distribuição monomodal, com baixo IP entre 0 - 0,2 (SCHAFFAZICK et al., 2003; AVADI et al, 2010). Apesar da distribuição bimodal apresentada, a família de NPs com diâmetro abaixo de 100 nm representa apenas 4% do total das NPs, podendo ser considerada irrelevante quando analisada ao todo. Sendo assim, as NP-RVT apresentaram diâmetros médios satisfatórios, dentro dos parâmetros estabelecidos. As NP-brancas obtidas foram relativamente maiores, porém, com melhor distribuição entre os diâmetros.

Resumidamente de acordo com a equação de Noyes-Whitney, tamanhos nanométricos levam a um aumento da área superficial e, proporcionalmente, um aumento na velocidade de dissolução. O que conduz ao aumento na biodisponibilidade da droga carreada sistemicamente, consequentemente, potencializando seu desempenho *in vivo* (LIVELRSIDGE, CUNDY, 1995; KHARB et al., 2006). Sendo assim, o diâmetro médio pode ser considerado um importante parâmetro na avaliação da qualidade das NPs (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

WEBER et al. (2000) em seu estudo de otimização do método de coacervação, observou que soluções de BSA em pHs alcalinos (9,0) apresentariam melhores diâmetros

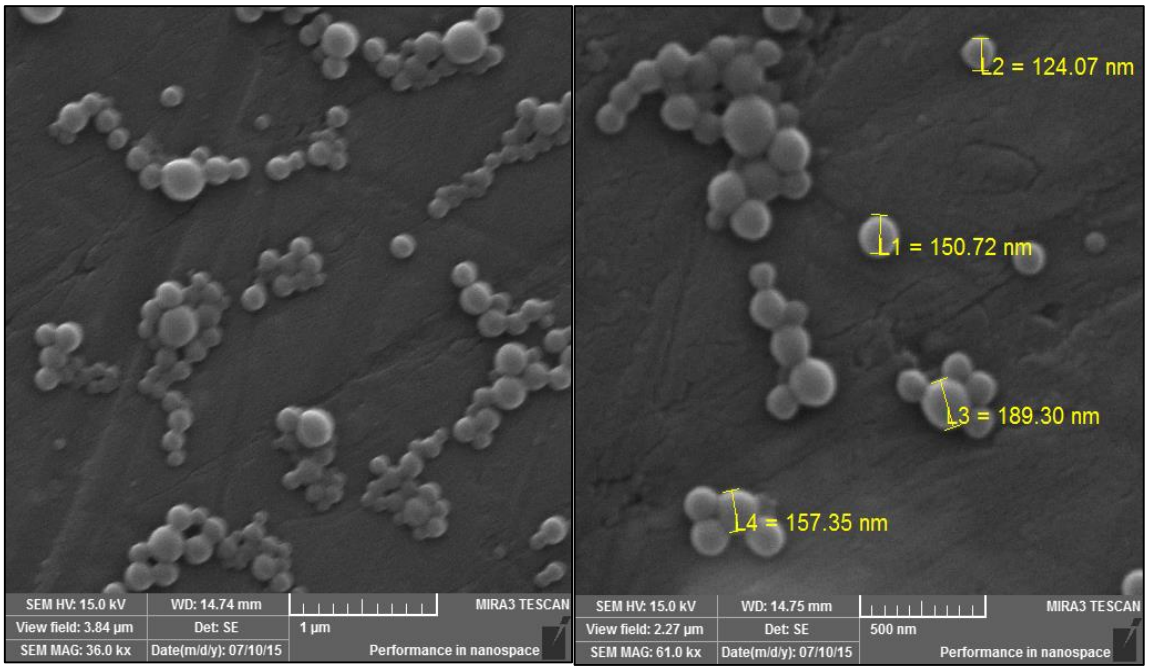
médios, com índice de polidispersão menores e, consequentemente, sistemas monodispersos. No presente estudo, optou-se por não utilizar pHs acima de 7,0, diante do pressuposto que o RVT tende a degradar em pHs acima de 8,0, tornando-se ionizado e, consequentemente, instável, passível de rápida degradação (ROBINSON et al., 2014). O pH não interferiu significativamente no diâmetro das NP-RVT obtidas, apresentando diâmetro médio dentro do esperado.

GUO e colaboradores (2009), obtiveram NP-RVT com diâmetros médios entre 400-500 nm, também produzidas pelo método de coacervação. As NP apresentaram diâmetros médios três vezes maiores que as obtidas no presente trabalho. LI e colaboradores (2012) também obtiveram NP-RVT, pela mesma técnica, apresentando diâmetros médio em torno de 175 nm, equivalente ao diâmetro obtido no presente estudo. Porém, ambos os trabalhos utilizaram pH alcalino (9,0) na metodologia, aumentando as chances de degradações do RVT, comprometendo assim, a integridade da droga presente no sistema nanoestruturado.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)

O MEV permite observar a área superficial de uma partícula e por meio do MEV-FEG é possível examinar as NPs em seu estado original, com grandes ampliações e profundidade de foco (KALAB, 1993). As fotomicrografias obtidas estão apresentadas na Figura 8.

Figura 8: Micrografias das NP-RVT obtidas por MEV-FEG: a) Aumento de 36.000 X e b) 61.000 X.



As NP-RVT apresentaram-se com forma esférica, não sendo possível observar a existência de poros pelos aumentos utilizados. O diâmetro médio observado a partir do MEV-FEG foi menor do que 190 nm, com uma distribuição de tamanho relativamente homogênea. Os valores são condizentes com os valores encontrados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (150-230 nm).

Sugere-se que a conformação apresentada pelas NP-RVT seja nanoesferas, pois baseando-se na estrutura visualizada nas fotomicrografias e pelos componentes que formam as NP, são parâmetros que tendem a formar NP com essa morfologia. Mas, somente por técnicas como a de criofratura, poderá se confirmar tal conformação estrutural.

5.2.3 Potencial Zeta

O valor do potencial zeta das NP-brancas e NP-RVT foram avaliados e estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Potencial Zeta de NP-brancas e NP-RVT.

Formulações	*Potencial zeta (mV)*
NP-RVT	- 38 ± 1
NP-branca	- 42 ± 2

n = 10, média ± desvio padrão

As NP-RVT e as NP-brancas apresentaram cargas superficiais negativas, não demonstrando diferença considerável entre ambas. Dessa maneira, pode-se afirmar que a adição o RVT não alterou significativamente a carga superficial das nanopartículas.

NP com cargas superficiais de +/- 30 mV, indicam uma alta estabilidade físico-química da suspenção coloidal e com baixa tendência à agregação, diante o pressuposto de que grandes forças repulsivas tendem a evitar colisões ocasionais entre as NP (BEDÉ, 2000; MALVERN, 2004; SCHAFFAZICK et al., 2003). Sendo assim, o resultado obtido pode ser considerado significativo, demonstrando uma baixa tendência de agregação entre as NP-RVT.

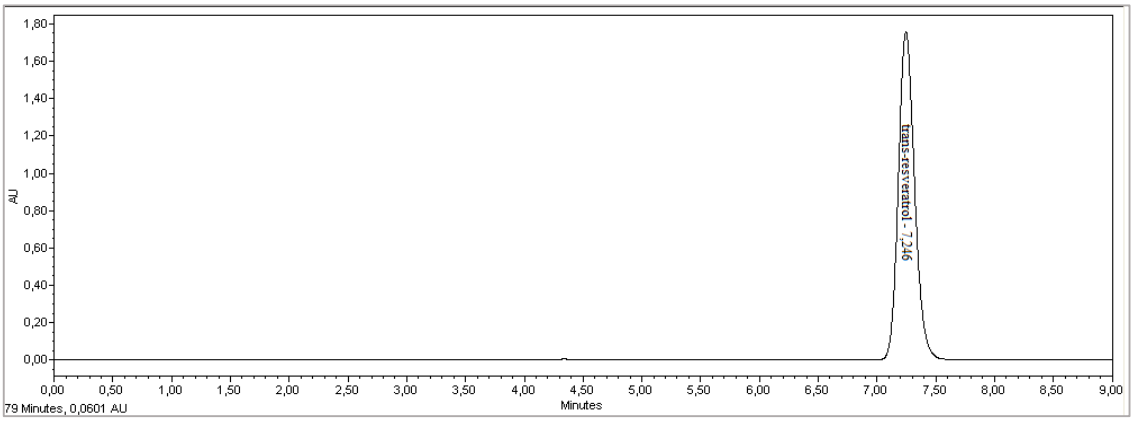
A BSA isoladamente, apresenta uma distribuição desuniforme das cargas em sua molécula em meio neutro, podendo exibir cargas que variam de -10, -8 e 0, mas em geral apresenta-se com carga negativa (HIRAYAMA, et. al., 1990; CARTER & HO et. al., 1994). YEDOMON e colaboradores (2013) em seu estudo de otimização do método de

coacervação para síntese de NP de BSA, obtiveram NP com potencial zeta de -50 mV em pH próximo a 7,0. O mesmo foi observado por LANGER (2003) com NP com POTENCIAL ZETA acima de -45 mV em pH neutro. Esses estudos corroboram com os dados obtidos nesse trabalho, demonstrando alta carga negativa para NP de BSA.

5.2.4 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do RVT por CLAE

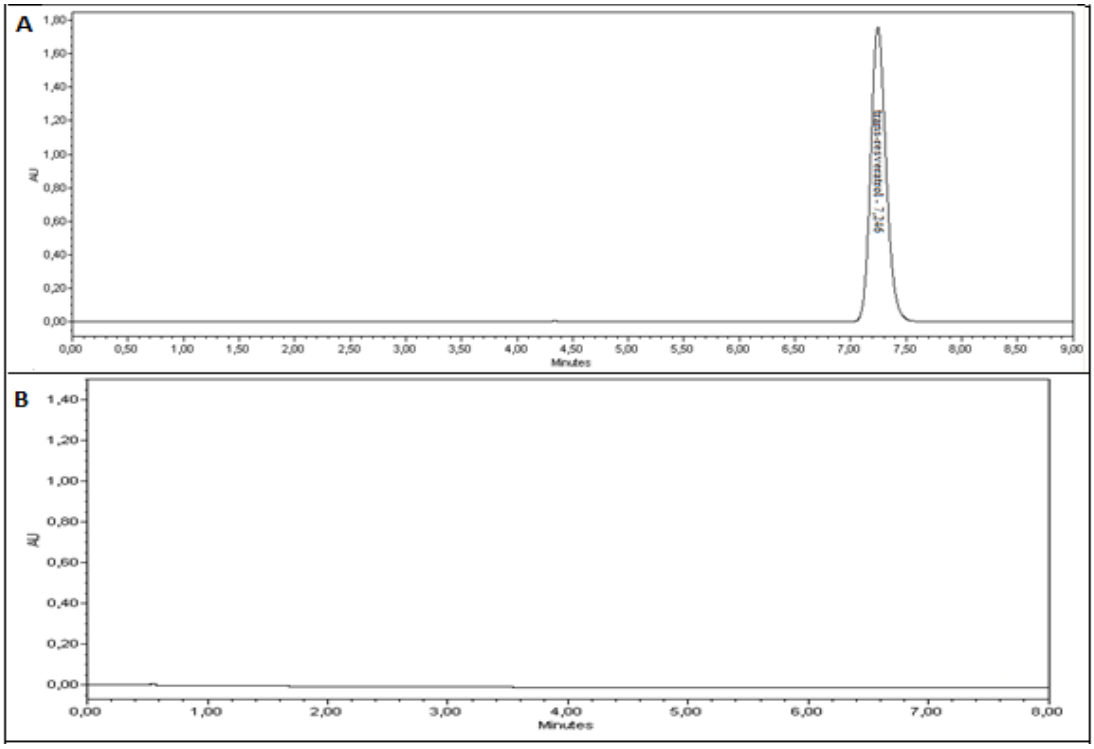
Para a quantificação do RVT por CLAE, primeiramente, foi realizado uma adaptação da validação analítica desenvolvida por LINDNER et al. (2013), para que a quantificação do RVT estivesse dentro dos parâmetros analíticos ideais. Inicialmente, foi realizado uma corrida cromatográfica de uma amostra de RVT, para que houvesse a detecção da droga pelo equipamento, conforme as condições estabelecidas por LINDNER et al. (2013). A Figura 9 demonstra que houve a detecção do RVT no tempo de retenção de 7,24 min. O pico formado apresenta-se de forma estreita e simétrica, com alta absorbância e sem ruídos na linha de base, considerado ideal para as análises posteriores.

Figura 9: Cromatograma de uma amostra de RVT (100 µg/mL) solubilizada em metanol:água (50:50 v/v); fase móvel metanol:água (51:49 v/v), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306nm, volume de injeção 20 µL. Absorbância (AU) em função do tempo (min).



O método cromatográfico foi avaliado quanto a especificidade, com o propósito de demonstrar a eficiência em detectar somente o RVT, sem a interferência de algum outro componente da formulação, no mesmo tempo de retenção do RVT (ANVISA, 2003). A análise foi realizada através da comparação dos cromatogramas dos sobrenadantes das NP-brancas e NP-RVT (Figura 10).

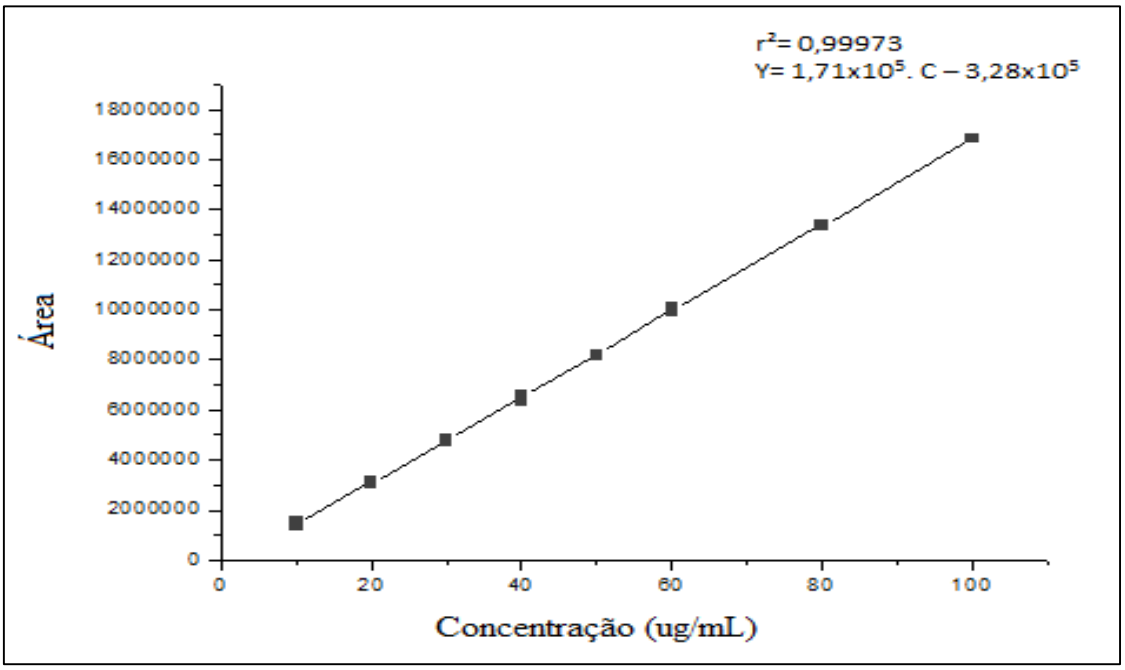
Figura 10: (A) cromatograma de uma amostra de sobrenadante de NP-RVT, identificando a presença do RVT através do pico formado; (B) cromatograma de uma amostra de sobrenadante de NP-brancas, mostrando a ausência da formação de picos.



Comparando os cromatogramas, podemos afirmar que a quantificação do RVT é fidedigna, pois não há nenhum outro componente na formulação com o mesmo tempo de retenção do RVT. Então o método cromatográfico pode ser considerado específico para a identificação e quantificação do RVT.

A linearidade também foi avaliada seguindo a Resolução ANVISA RE n° 899 de maio de 2003, que define a linearidade como à capacidade do método em gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica especificada. A Figura 11 representa a curva analítica, a equação e o coeficiente de correlação (r^2), gerado a partir da equação. Os valores da equação constituem em: Y é a área do pico e o C é a concentração da solução padrão em µg/mL. O valor encontrado do r^2 (0,99973) está muito próximo de 1, correspondendo ao preconizado pela ANVISA (2003), indicando linearidade no intervalo proposto.

Figura 11: Curva analítica do RVT solubilizado em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol:água (51:49, v/v), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306nm, volume de injeção 20µL. Área X Concentração (µg/mL),



O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram calculados a partir dos valores obtidos da curva analítica (Figura 10). O LQ pode ser definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra, que pode ser quantificado com precisão e exatidão sob condições experimentais estabelecidas. Já o LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003). O LD e o LQ foram 0,63 µg/mL e 1,93 µg/mL, respectivamente.

Os parâmetros avaliados para a quantificação do RVT estão dentro do esperado, demonstrando-se adequados para a quantificação do RVT por CLAE, sendo especifico, linear e com LQ e LD dentro da faixa de trabalho. Logo, a EE% das NP-RVT, pode ser determinada por esse método.

5.2.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação

A determinação da EE% foi pelo método indireto, ou seja, o RVT que não encapsulou na matriz polimérica foi quantificado no sobrenadante das NP-RVT por CLAE e, através de cálculos matemáticos, foi determinado a quantidade de RVT encapsulado. A EE% das NP-RVT foi de 60 ± 5 %, com teor de droga encapsulada em torno 6,0 mg. Segundo FRESTA e colaboradores (1995) a droga encapsulada pode

apresentar-se dispersa, adsorvida ou quimicamente ligada a matriz polimérica. Acredita-se que o RVT se encontra ligado a matriz polimérica, proveniente de ligações de hidrogênio e interações de Van Der Walls entre as hidroxilas do RVT e os grupamentos hidrofílicos da BSA.

Estudo similares, que também obtiveram NP de BSA contendo RVT, demonstraram EE% divergentes. LI e colaboradores (2012) obtiveram EE% de 39,4%, resultado semelhante foram obtidos por GUO e colaboradores (2009), alcançando EE% em torno de 34%. Ambas as EE% condizem com a EE% obtida pela *formulação 2* do presente trabalho. Demonstrando assim, que a inclusão do tempo de incubação na metodologia de coacervação, trouxe resultados satisfatórios, tendo as NP-RVT uma maior carga RVT (~59%), quando comparadas aos outros estudos citados.

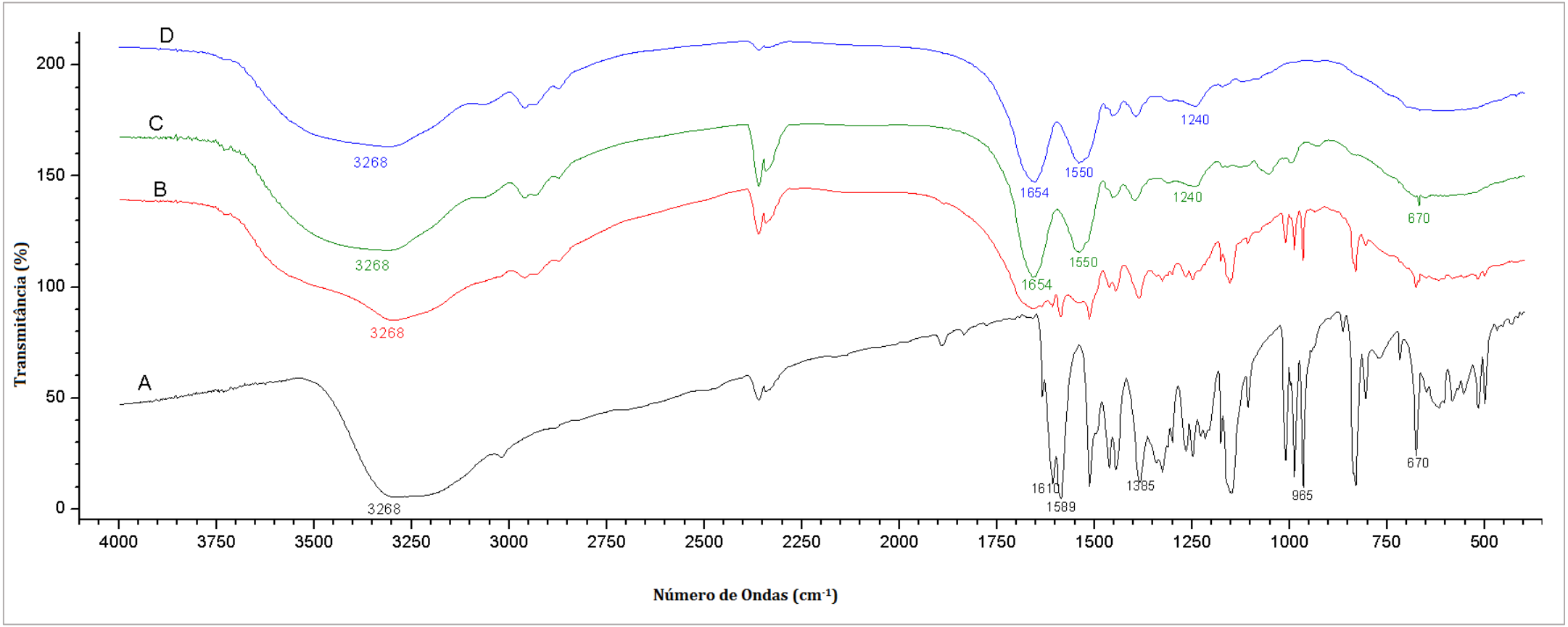
5.2.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do RVT (A), da mistura física entre RVT e BSA (1:10 p/p) (B), NP-branca (D) e NP-RVT (C) estão representados na Figura 12.

O RVT apresentou as principais bandas pertencentes aos seus grupos químicos, como uma banda em 3268 cm^{-1} referente ao estiramento O-H, as bandas 1589 e 1610 cm^{-1}, correspondem ao estiramento C-C das duplas ligações do anel aromático e, a banda 1385 cm^{-1}, correspondente ao estiramento C-O. A conformação *trans* do RVT foi confirmada pela presença da banda em 965 cm^{-1} que caracteriza a ligação C=C dos carbonos da olefínicos. Outra banda forte aparece em torno de 670 cm^{-1}, correspondente a deformação angular C-H fora do plano do anel aromático. O espectro gerado do RVT condiz com outros espectros encontrados na literatura (SHI et al., 2008; KIM et al., 2012; COATES, 2000).

As NP-brancas apresentaram um espectro de FTIR característico da BSA, apresentando suas principais bandas: 3300 cm^{-1} encontra-se uma banda larga e intensa referente ao estiramento O-H e as bandas 1654 cm^{-1} (C=O), 1550 cm^{-1} (N-H) e 1240 cm^{-1} (C-N) características da Amida I, Amida II e Amida III, respectivamente (LAM et al., 2015; COATES, 2000).

Figura 12: Espectros de infravermelho obtido por FTIR, em A) RVT; B) mistura física entre o RVT e a BSA (proporção 1:10); C) NP-RVT e D) NP-brancas



BELLUSCI e colaboradores (2009), demonstraram que o espectro de FTIR da BSA não sofre alteração significativas após o processo de reticulação. Observando somente uma intensificação nas bandas características da BSA, sem a formação de novas bandas ou a ausência das já existentes. Isso pode ser explicado, porque durante o processo de reticulação ocorre a formação de uma ligação C=N (bases de shiff), resultante da ligação de grupos aminos da proteína com os grupos aldeídos do agente de reticulação. A ligação C=N apresenta banda característica em ~1648 cm^{-1}, como esta região é muito próxima a banda característica do C=O, as bandas acabam por ficar sobrepostas (ROKHADE et al., 2007; COATES, 2000).

Para a realização do espectro da mistura física, foi mantido a proporção utilizada na obtenção das NP-RVT e o espectro de FTIR apresentou sobreposição entre as principais bandas que identificam ambas as substâncias. No espectro de FTIR das NP-RVT, também foi possível observar sobreposições entre algumas bandas, mas também uma intensificação na banda próximo a 3300 cm^{-1} (OH) e a identificação da banda em 670 cm^{-1} pertencente a deformação angular C-H fora do plano do anel aromático, atribuídos então ao RVT presente nas NP-RVT.

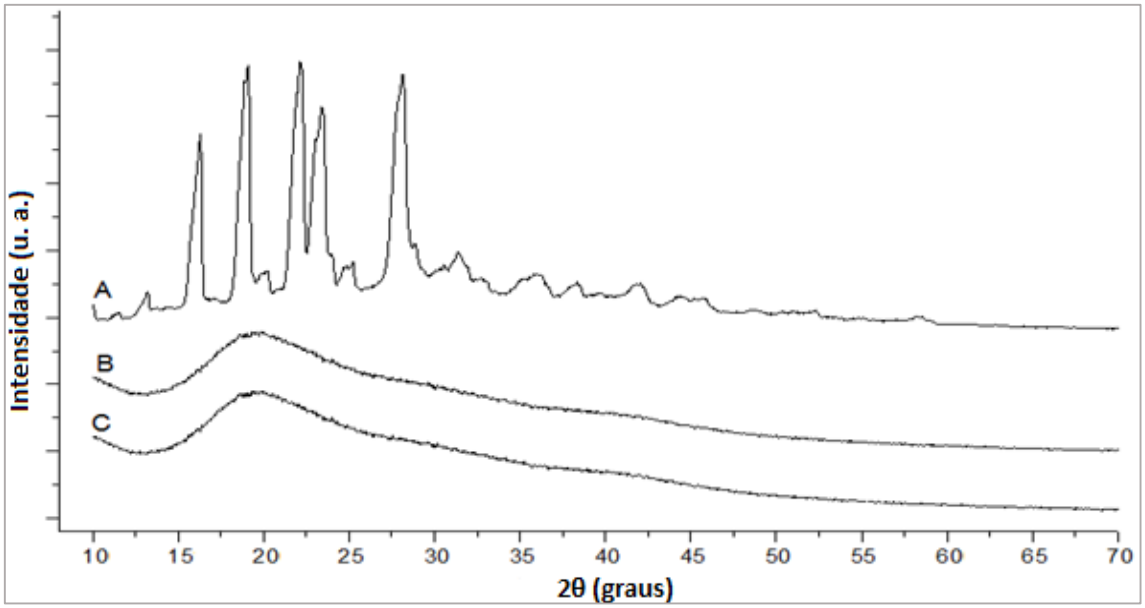
De acordo com os resultados pode-se considerar que o processo de formação das NP-RVT não promoveu alterações nas estruturas químicas dos componentes, demonstrando que a interação polímero-fármaco não alterou os principais grupos funcionais de cada material.

5.2.7 Difração de Raio X (DRX)

Os difratogramas referente ao RVT (A), NP-brancas (B) e NP-RVT (C) estão apresentados na Figura 13.

O difratograma pertencente ao RVT, apresenta intensos picos, entre 10° e 35°, característicos de substâncias cristalinas. Esses resultados corroboram com os obtidos por NAM e colaboradores (2005), onde o RVT apresenta organização estrutural considerável, como as substâncias cristalinas. As NP-brancas exibiram estrutura totalmente amorfa, isenta de picos. O mesmo perfil foi obtido pelas NP-RVT, com características amorfa e sem os picos cristalinos característicos do RVT, demonstrando que o RVT está aleatoriamente disperso na forma amorfa.

Figura 13: Difratogramas obtidos por DRX do (A)RVT, (B)NP-branca e (C)NP-RVT.



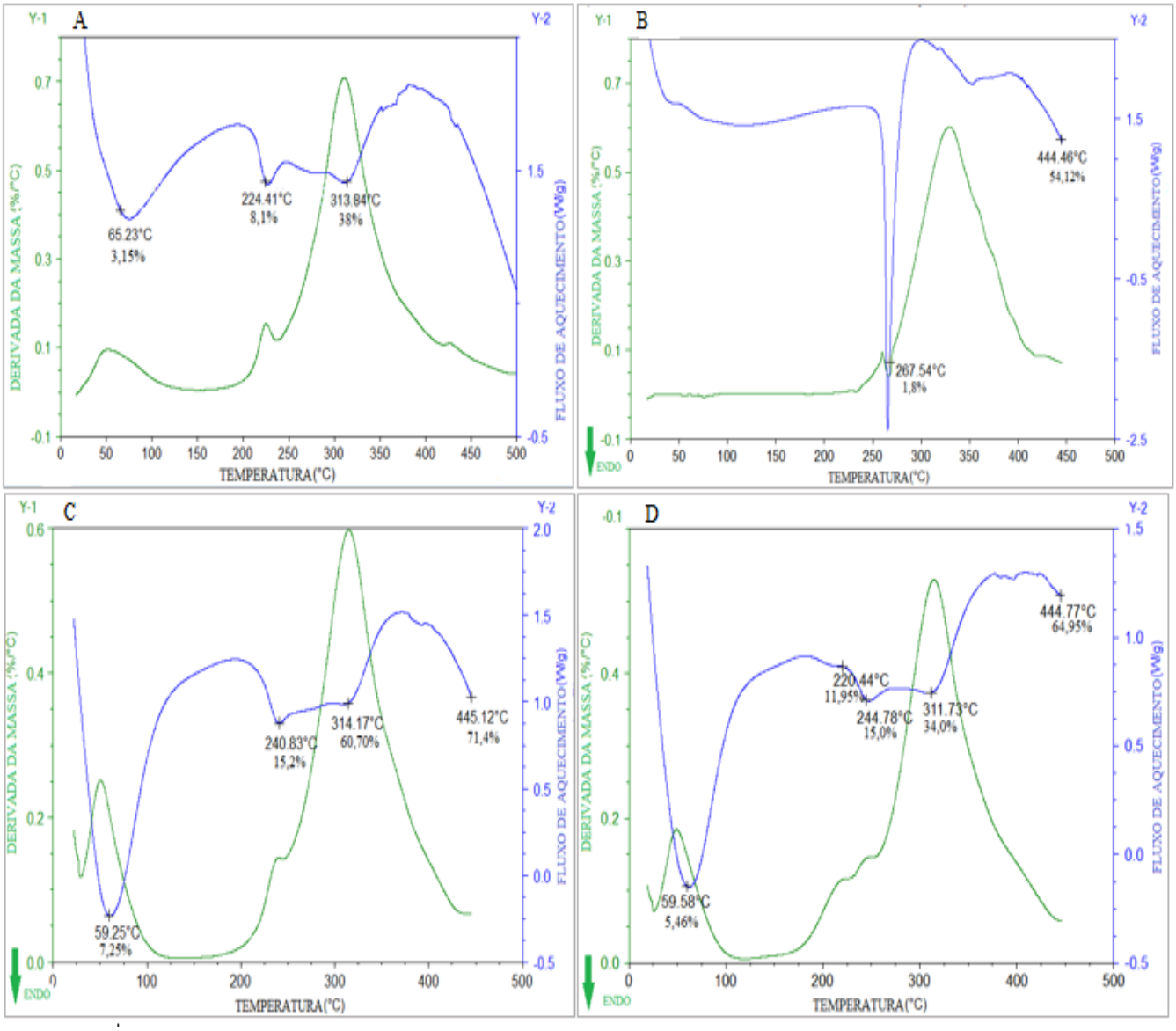
A conformação amorfa proporciona moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, necessita de um menor consumo de energia para separá-las. Da mesma maneira, espera-se uma velocidade de dissolução mais rápida para o RVT encapsulado, com a nova conformação influenciando diretamente na sua liberação e biodisponibilidade (RIEKES et al, 2011).

5.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica Derivada (DTG)

As análises térmicas de DSC e DTG das amostras BSA (A), RVT (B), NP-branca (C) e NP-RVT (D), estão expostas simultaneamente na Figura 14.

A curva do DSC da BSA mostra um primeiro evento endotérmico na temperatura de 65,23°C, correspondente ao ponto de desnaturação da proteína. Um segundo evento endotérmico, com menor intensidade, ocorre na temperatura de 224,41°C. A decomposição térmica da BSA inicia-se com o processo de desnaturação, com cerca de 3,15% de perda de massa e segue, progressivamente, até o final da análise com 72% de perda.

Figura 14: Curvas de DSC-DTG A) BSA; B) RVT; C) NP-branca e D) NP-RVT. Linhas em verde para derivada da massa e linhas em azul para o DSC.



Na curva do DSC do RVT ocorre a formação de um pico endotérmico intenso em 267,54°C, característico do processo de fusão da droga (KIM et al., 2012; TROLLOPE et al., 2014). A decomposição térmica do RVT é lenta, quando atinge temperatura de fusão, ocorre somente 1,8% de perda de massa e quando atinge temperatura de 444°C a perda de massa alcançada é de 54%. A decomposição térmica ocorre de forma espontânea através do calor fornecido, e pode ser considerado o início da degradação do RVT.

As NP-brancas apresentaram termograma semelhante ao termograma da BSA pura, porém houve um pequeno deslocamento no pico característico da desnaturação da BSA, com início em 59,25°C. Também ocorreu uma maior decomposição térmica, com perda de massa de 7,25%. Um segundo evento endotérmico ocorre na temperatura de

240°C, com perda de massa equivalente a 15,2%. O pico endotérmico em ~225°C, presente na curva do DSC da BSA pura, não apareceu na curva do DSC das NP-brancas. Acredita-se que os processos químicos sofridos pela BSA durante o processo de obtenção das NP, culminaram em mudanças estruturais na BSA, influenciando diretamente no perfil termoanalítico das NP-brancas.

As NP-RVT apresentaram na curva do DSC todos os picos endotérmicos presente nas NP-branca, além do evento endotérmico na temperatura próxima a 220°C, característico da BSA pura. Da mesma forma, pode-se verificar a ausência do pico endotérmico do RVT (~267°C), característico do processo de fusão da droga. Esse dado não representa necessariamente uma incompatibilidade química entre a droga e a BSA, caracterizando uma desestruturação do RVT, mas sim, a existência de uma forte interação polímero-droga em função do processo de formação das NP-RVT. Também há relatos na literatura da ausência de picos de fusão de fármacos que se encontravam encapsulados em matrizes poliméricas (MU, FENG, 2002)

No que se refere a decomposição térmica das NP-RVT, foi observado uma menor perda de massa das NP-RVT (65%) em relação a perda de massa observada para as NP-brancas (71%). Esse fato também pode ser atribuído a presença do RVT na estrutura polimérica, retardando a decomposição da NP-RVT.

5.2.9 Espectroscopia de Fluorescência

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi realizada a fim de observar a interação existente entre o RVT e a BSA na composição das NP-RVT, avaliando principalmente a capacidade de supressão do RVT sob a fluorescência da BSA. Para a análise, foi fixado o λ de emissão da BSA (280 nm), todavia é possível observar a emissão de fluorescência da BSA e do RVT, em diferentes intensidades, devido às interações existentes. Os espectros de fluorescência de todas as amostras estão representados na Figura 15 (A) e os comprimentos de onda, correspondentes a emissão máxima de cada amostra, estão dispostas na Tabela 4.

Figura 15: A) Espectros de fluorescência do RVT, BSA, mistura física (BSA/RVT 10:1), NP-brancas e NP-RVT; B) Espectros de fluorescência de NP-brancas (50µg/mL) e NP-RVT (50, 25 e 12,5 µg/mL). Todas as amostras foram solubilizadas em tampão PBS (10mM, pH: 7,4) λex: 280 nm e λem: 300-500 nm.

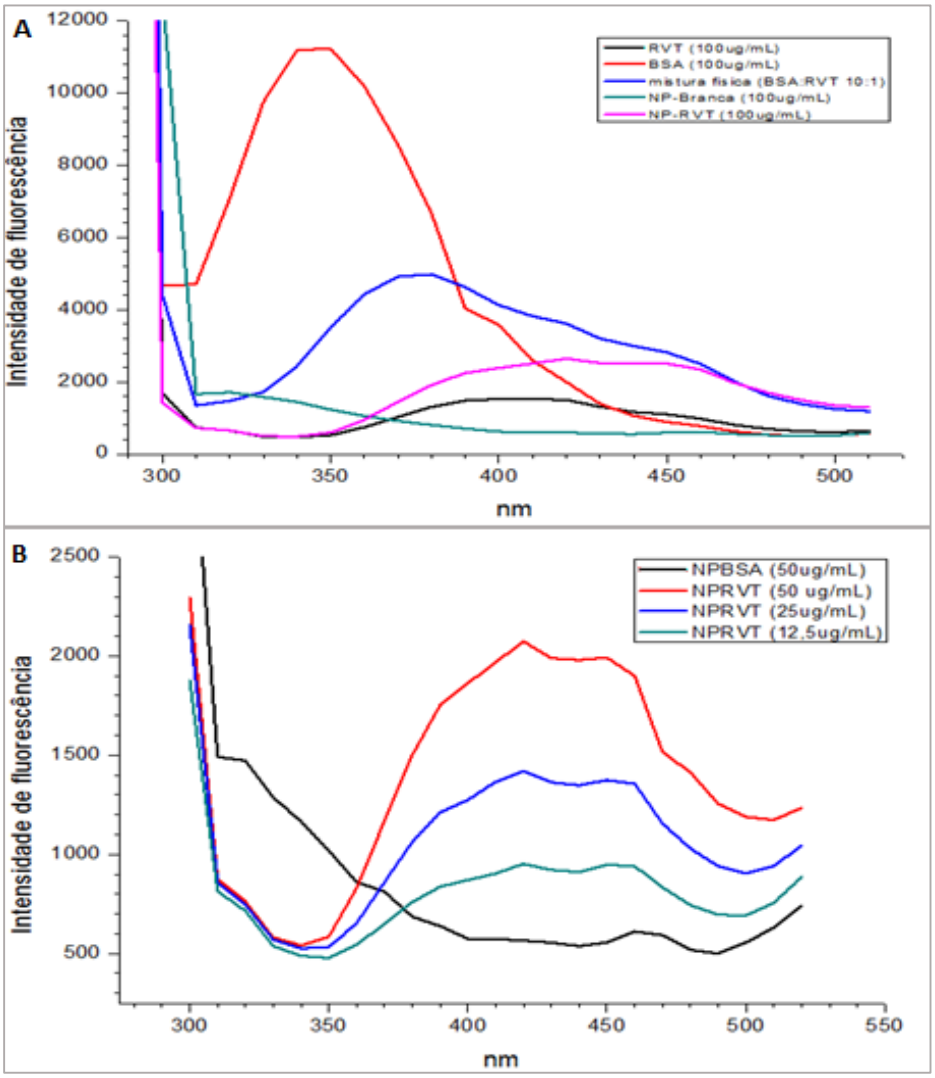


Tabela 4: Emissão máxima da fluorescência da BSA, RVT, Mistura Física (BSA:RVT 10:1), NP-brancas, NP-RVT.

Amostras	***Emissão Máxima (nm)***
BSA	340
RVT	410
Mistura Física (BSA/RVT, 10/1)	370
NP-brancas	330
NP-RVT	420

A fluorescência do RVT é referente aos anéis aromáticos presentes na molécula e a emissão máxima observada para a droga é compatível com os relatados por outros

pesquisadores (LIANG et al., 2008). A BSA apresenta uma alta intensidade de fluorescência e os grupamentos tirosina, fenilalanina e principalmente o triptofano, são os responsáveis pela emissão de fluorescência da proteína. Dos três fragmentos, a emissão dos resíduos de triptofano da BSA (Trp-134 e Trp-212) são os mais significativos, com cerca de 90% de emissão total (NAVEENRAJ, ANANDAN, 2012; SULKOWSKA, 2002; HOLMBERG et al., 2005).

Na mistura física entre BSA e RVT (p/p) é possível observar a interação existente entre droga-proteína pela formação de um pico de emissão extenso, englobando as máximas de emissão de ambas as substâncias. Também é possível verificar uma redução na intensidade de fluorescência (IF), quando comparado a IF da BSA isolada, demonstrando a capacidade do RVT em inibir a fluorescência da BSA. Os resultados são compatíveis com os encontrados por XIAO et al. (2008) e LI et al. (2011), que em seus respectivos trabalhos comprovaram a capacidade do RVT em inibir a fluorescência da BSA através de interações químicas, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Os autores relatam que as interações ocorrem, principalmente, entre hidroxilas do RVT e os grupamentos vizinhos aos resíduos de triptofano da BSA, formando um complexo RVT-BSA. E ao receber energia de um fóton, por exemplo, o complexo BSA-RVT não é mais capaz de emitir luz.

O espectro de fluorescência das NP-brancas mostra uma intensa redução na IF da BSA. Acredita-se que a redução da IF, seja consequência da nova conformação estrutural da BSA, adquirida pelos processos de dessolvatação/reticulação na formação das NP-brancas. A nova constituição estrutural pode ter interiorizado os resíduos de triptofano, dificultando a irradiação dos resíduos aromáticos e, consequentemente, a excitação do mesmo, diminuindo a intensidade de emissão da fluorescência da molécula (LAKOWICZ, 1999; FREIFELDER, 1976).

No espectro de fluorescência das NP-RVT ocorre a extinção completa da emissão de fluorescência da BSA. Conforme o ocorrido no espectro de fluorescência da mistura física, a supressão da fluorescência da BSA ocorre devido a formação do complexo BSA-RVT incapaz de emitir fluorescência (XIAO, et al., 2008; LI, et al., 2011).

A Figura 15 (B) exemplifica melhor o processo de supressão de fluorescência da BSA pela complexação com o RVT. Pode-se observar que os espetros de emissão de fluorescência das NP-RVT e NP-brancas, apresentam-se totalmente distintos entre si, e o RVT é capaz de suprimir por completo a fluorescência da BSA, em todas as concentrações de NP-RVT analisadas.

Diante aos resultados da análise de espectroscopia de fluorescência, podemos afirmar a interação existente entre a BSA e o RVT, na constituição estrutural das NP-RVT, pelos seguintes eventos:

1) A emissão de fluorescência do RVT com máxima de emissão em 420 nm a partir do espectro de fluorescência das NP-RVT;
2) A capacidade do RVT inibir a fluorescência da BSA, formando um complexo que suprimi totalmente sua emissão da fluorescência da BSA;
3) E por fim, a disparidade entre os espectros de fluorescência das NP-brancas e NP-RVT.

O conjunto de resultados encontrados pelas análises que compuseram a caracterização físico-químicas, corroboram entre si. Demonstrando que o processo de nanoencapsulação não favoreceu nenhum tipo de modificação que descaracterizasse os compostos que constituem as NP-RVT. Também comprovaram a existência de uma forte interação entre o RVT e a BSA. Além, de certificar a formação de um sistema amorfo, propriedade físico-química considerada de suma importância para sistemas nanoestruturados, pois influência diretamente na velocidade de liberação da droga e, consequentemente, na biodisponibilidade (ATTAMA et al., 2006).

5.3 Liberação *In Vitro*

5.3.1 Determinação da Solubilidade do RVT

O estudo de liberação *in vitro* determina a quantidade de fármaco liberado das NP em um meio dissolutor, em função do tempo. Mas para tal ensaio, é necessário a manutenção das condições *sink*, a fim de que não ocorra a saturação do fármaco no meio envolvente (KLOSE, et al., 2011). A condição *sink* é mantida quando durante toda a análise, a concentração do fármaco não ultrapasse 10 a 15% da saturação máxima no meio de dissolução. Desse modo, no decorrer da liberação do RVT através das NP-RVT, a concentração do fármaco aumentará linearmente, sem influenciar o gradiente de concentração (KUU, 1989; VASCONCELOS, et al.; 2007).

Em alguns casos, como quando o fármaco é praticamente insolúvel em água ou no meio dissolutor em estudo, são aplicadas estratégias para que a condição *sink* seja alcançada ou mantida, tais como, adição de um surfactante ao meio de dissolução ou adição de solventes orgânicos (SAARINEN-SAVOLAINEN et al., 1997; MANADAS, 2002).

Sabe-se que o RVT é praticamente insolúvel em água (30 µg/mL) (FILIP et al., 2003) e a solubilidade em tampão PBS (pH 7,4) também é muito baixa, aproximadamente 13,6 µg/mL (HUNG et al., 2007). A dificuldade de dissolução da droga, prejudica o estudo da liberação *in vitro*, pois o fármaco tende a não migra para o meio dissolutor. Dessa maneira, diferentes meios dissolutores foram analisados, a fim de avaliar qual meio o RVT apresentava melhor solubilidade. A Tabela 5 traz os resultados para a solubilidade do RVT, frente aos meios dissolutores testados:

Tabela 5: Solubilidade do RVT em tampão fosfato-salino (PBS, 10mM, pH:7,4) com os surfactantes Tween 80 (1 e 5%) e PVA (1 e 5%).

Tampão PBS + Tween 80 (1%)	**Tampão PBS + Tween 80 (5%)**	**Tampão PBS + PVA (1%)**	**Tampão PBS + PVA (5%)**
1,24 ±0,1[a]	1,25 ± 0,1[a]	0,20 ± 0,04[b]	0,45 ± 0,2[c]

n = 3, média e desvio padrão (mg/mL); a- sem diferença estatística significativa; b e c - diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

De acordo com as concentrações expostas na Tabela 5, a solubilidade do RVT nos meios que continham PVA foi muito baixa, com solubilidade inferior a 0,5 mg/mL, porém, maior que do somente tampão PBS (13,6 µg/mL), descrito na literatura. Já os meios com Tween 80, a solubilidade do RVT foi maior, cerca de três vezes mais solúvel que para os meios com PVA.

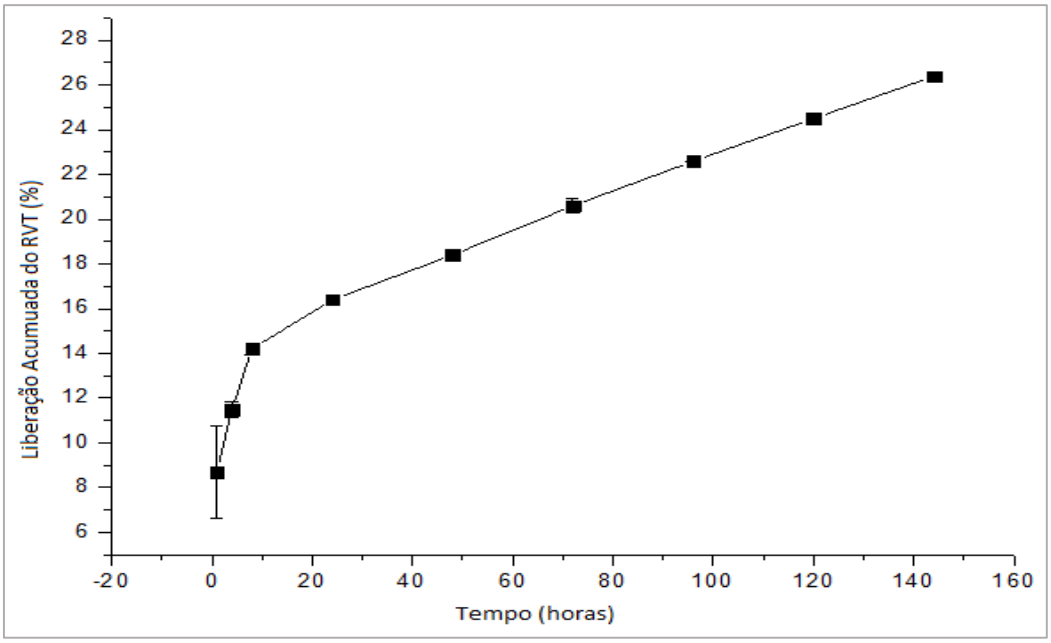
As concentrações do Tween 80, 1% e 5%, quando comparadas, não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre si. Dessa maneira, o aumento na concentração do tensoativo não proporcionou uma maior solubilidade do RVT e a droga alcançou solubilidade máxima com a adição de apenas 1% do Tween 80.

Por tanto, o tampão PBS (10mM, pH 7,4) com Tween 80 1% foi o escolhido como o meio dissolutor para o ensaio de liberação *in vitro.* A condição *sink* foi preservada durante a análise, com a inserção de apenas 10% da concentração máxima da solubilidade do RVT (mg) por mililitro (mL) no meio dissolutor, ou seja, a cada mL do meio dissolutor foi adicionado 0,124 mg do RVT encapsulado nas NP-RVT.

5.3.2 Determinação do Perfil de Liberação

O perfil de liberação *in vitro* do RVT a partir das NP-RVT em função do tempo, está apresentado Figura 16.

Figura 16: Porcentual de liberação acumulativo do RVT a partir das NP-RVT em tampão PBS (10 mM, pH=7,4) em função do tempo (n = 3).



De acordo com o gráfico, pode-se observar que houve uma pronunciada liberação nas primeiras 8 h de experimento, com aproximadamente 15% do fármaco liberado das NP-RVT, correspondente a 150 µg de RVT. Esse efeito, em que ocorre uma liberação rápida de fármaco no início do ensaio, é conhecido como efeito *burst* e está relacionado a uma rápida liberação do fármaco que se encontra na adsorvido na superfície das NP (HUANG, BRAZEL, 2001).

Após essa rápida liberação, ao decorrer das horas observou-se que a velocidade de liberação tornou-se mais lenta e prolongada, liberando somente 26 % (260 µg) de RVT ao final de 144 h. Essa etapa mais lenta de liberação pode ser decorrente da dificuldade do RVT em transpor as estruturas poliméricas, caracterizando em uma liberação bastante gradual e sustentada. São muitos os fatores que podem atuar retardando a liberação, acredita-se que o mais evidente seja à existência das fortes interações químicas entre o RVT e a BSA, desfavorecendo a liberação da droga para o meio dissolutor. Outro fator que pode exercer influência no prolongamento da liberação é o excesso de enrijecimento da rede polimérica durante o processo de reticulação com o glutaraldeído. O uso de

concentrações muito altas de agente reticulante pode dificultar a ruptura da rede polimérica e, por conseguinte, a liberação da droga.

LI e colaboradores (2012) utilizaram 0,25% de agente de reticulação, glutaraldeído, no processo de formação de NP de BSA contendo RVT, pelo do método de coacervação. Em seu estudo de liberação, obteve cerca de 80% de RVT liberado da rede polimérica em 72 h, no meio dissolutor composto por tampão PBS (pH: 7,4). Diferentemente, o presente trabalho utilizou glutaraldeído na concentração de 8%, obtendo perfil de liberação mais lento que os obtidos por LI et al. (2012). Diante da discrepância entre os perfis de liberação encontrados, acredita-se que a concentração utilizada do agente de reticulação possa influenciar diretamente na modulação do perfil de liberação de fármacos através de NP, obtidas pela técnica de coacervação.

THOTE e colaboradores (2005) também observaram que houve redução na velocidade de liberação quando o processo de reticulação era realizado, criando assim uma barreira adicional a difusão do fármaco. Toda via, sob condições *in vivo*, onde o meio fisiológico sofre influência de inúmeros sistemas enzimáticos, espera-se uma quantidade maior de droga liberada (GORNER et al., 1999).

5.3.3 Determinação da Cinética e do Mecanismo de Liberação

Os resultados obtidos no ensaio de liberação *in vitro* foram aplicados em modelos matemáticos e, a partir dos coeficientes de determinação (r^2) e do critério de seleção do método (CSM) gerados, verificamos qual modelo cinético melhor corresponde ao mecanismo de liberação do RVT através das NP. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 6:

Tabela 6: Análise cinética de liberação do RVT a partir das NP-RVT em tampão PBS (10 mM, pH=7,4).

MODELO	***r^2***	***CSM***	***K (h^{-1})***
Ordem Zero	0,9621	-0,9266	0,2243
Primeira Ordem	0,9697	-0,8170	0,0027
****Segunda Ordem***	**0,9790**	**-0,1953**	**α: 0,0011 β: 0,0126**
Higuchi	0,9621	-0,9267	0,1378

R^2=coeficiente de correlação, CSM = critério de seleção de modelo, k= constante de liberação

O modelo cinético que corresponde ao comportamento de liberação *in vitro* é o de segunda ordem, ou também conhecido como biexponencial, onde a orientação da liberação é regida por duas constantes cinéticas, a α, correspondente a velocidade de dissolução rápida observada nas primeiras horas de ensaio e, a constante β, que diz respeito a etapa mais lenta de liberação (PEREIRA et al., 2006).

A liberação dos fármacos através de sistemas nanoparticulados depende de diversos fatores, como: a) dessorção do fármaco da superfície das partículas; b) difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas; c) difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; d) erosão da matriz polimérica; ou ainda e) a combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH, et al., 2001). E a partir do melhor compreendimento do processo de liberação do fármaco *in vitro*, podemos presumir o comportamento de liberação no meio biológico.

O modelo matemático de Korsmeyer-Peppas foi aplicado para melhor entendimento do mecanismo em que o RVT foi liberado das NP-RVT. O modelo de Korsmeyer-Peppas expressa o mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas esféricos, através de três mecanismo (SIEPMANN, PEPPAS, 2001):

- Mecanismo Fickiano, ou transporte por difusão através do polímero, quando o valor de *n* encontrado é inferior a 0,43;
- Mecanismo não-Fickiano, ou transporte por erosão do polímero, o valor *n* é superior a 0,85; e,
- Transporte Anômalo: sendo esse regido pelos dois mecanismos associados, difusão e erosão, o valor de *n* está entre 0,43 e 0,85.

O expoente de liberação (*n*) gerado através da equação de Korsmeyer-Peppas foi de 0,2273, correspondendo ao mecanismo Fickiano de liberação. Dessa maneira, o transporte do RVT através da rede polimérica é predominantemente por difusão. E o processo é movido por um gradiente de concentração, relacionado ao movimento aleatório das moléculas (movimento browniano), regido pela primeira lei de Fick (MARTIN et al., 1993). Semelhantes perfis cinéticos foram obtidos por DAS e colaboradores (2005) através de NP de BSA contendo Aspirina, e por LEO e colaboradores (1999) por NP de Gelatina contendo Doxorrubicina.

Ao analisar o perfil de liberação *in vitro* do RVT a partir das NP-RVT, em termos teóricos, verificamos que ao final das 144 h ainda encontrava-se, aproximamente, 70% do fármaco aprisionado, sendo liberado lentamente de forma contínua e sustentada. *In vivo*, isso poderia refletir em: a) Menores flutuações dos níveis plasmáticos da droga; b)

redução da frequência de administração; c) redução no efeitos colaterais; além de cobertura terapêutica de duração prolongada (DAS et al., 2005; ANSEL et al., 2007).

5.4 Ensaio de Estabilidade Físico-química

O estudo da estabilidade físico-química tem por finalidade fornecer evidências de como a qualidade de um produto varia com o tempo sob influência dos fatores ambientais como, temperatura, umidade, luz e ar atmosférico (LEITE, 2005). As condições básicas de armazenamento a serem testadas, em estudos de estabilidade, são estocagem em diferentes temperaturas (ambiente, moderada e baixa) e atmosferas com variação de umidade relativa (ORIQUI, MORI, 2013).

Dessa maneira, os ambientes: temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento foram estabelecidos para o acondicionamento das NP-RVT, por serem considerados os mais comuns no armazenamento de fármacos e insumos farmacêuticos. E a estabilidade físico-química das NP-RVT foi determinada através da avaliação da estabilidade das NP durante um período de tempo pré-determinado, sob as diferentes condições de armazenamento.

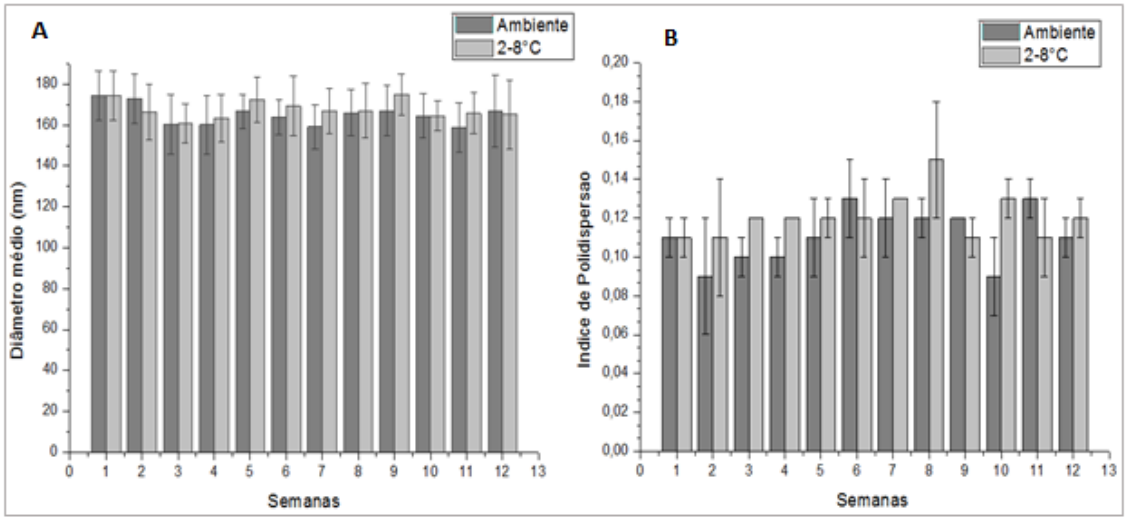
Após os primeiros 7 dias de acompanhamento, foi possível observar que as NP-RVT congeladas, com e sem crioprotetor, sofreram agregação. Visualmente, foi possível observar a formação de sedimentos no fundo dos tubos de microcentrifugação e ao homogeneizar as amostras formavam-se grumos. Os parâmetros de diâmetro médio e IP corroboraram com o aspecto visualizado, com diâmetros maiores que 1000 nm e IP acima de 0,5. Diante as características observadas, foi possível constatar que as NP-RVT congeladas demonstraram instabilidade quando acondicionadas em refrigerador, consideradas então, inadequadas para NP carreadoras de fármacos.

Os crioprotetores são empregados em processo de congelamento e liofilização de NP, para protegê-las durante o congelamento. A proteção é alcançada devido a formação de uma matriz amorfa ao redor das NP, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as passíveis de ressuspensão (KONAN et al., 2002). Geralmente, usa-se carboidratos como a glicose, sacarose e o manitol (SAEZ et al., 2000) e a quantidade de crioprotetor adicionado varia de uma formulação para outra, na literatura encontram-se dados descrevendo desde o uso de 2% de crioprotetor até 30% (p/v) (SCHWARZ et al., 1997; CAVALLI et al., 1997; SAEZ et al., 2000).

Porém, a adição do crioprotetor não foi capaz de impedir a agregação das NP-RVT quando armazenadas em temperaturas negativas. Acredita-se que a concentração de crioprotetor utilizado (5%) foi insuficiente, não sendo capaz de garantir proteção às NP. Por tanto, as NP-RVT mantidas sob congelamento foram consideradas instáveis e o ambiente impróprio para o acondicionamento das NP-RVT. As amostras congeladas não foram mais avaliadas nas semanas subsequentes, por serem consideradas inapropriadas.

As NP-RVT armazenadas nos demais locais, sob refrigeração e temperatura ambiente, foram analisadas semanalmente. Macroscopicamente, no decorrer do tempo, as NP-RVT de ambos os armazenamentos, apresentavam-se idênticas, conservando as características iniciais, como: coloração branca e aspecto leitoso, visualmente bem dispersas e sem formação de precipitados. Os parâmetros avaliados semanalmente, diâmetro médio e IP e também as análises de potencial zeta e teor de fármaco liberado, estão expostos nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

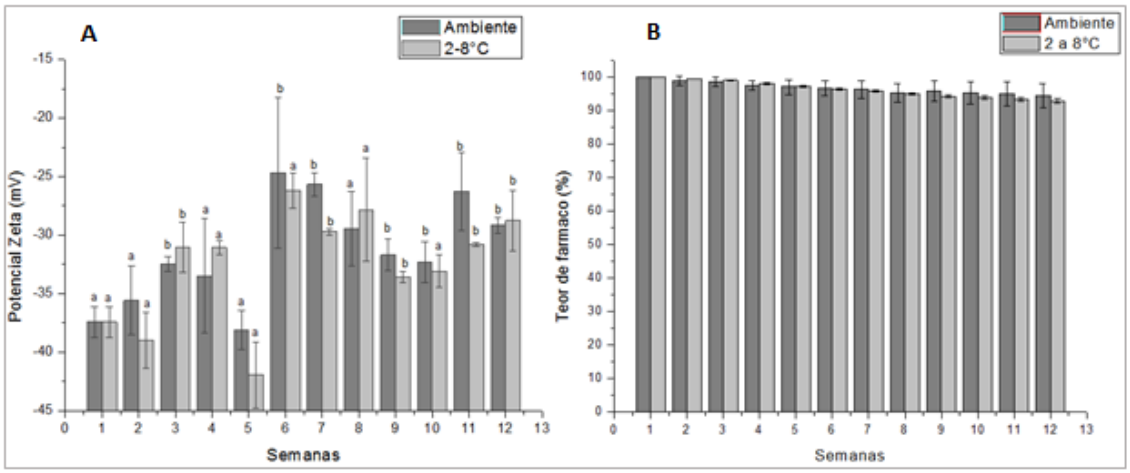
Figura 17: A) Diâmetro médio das NP-RVT e B) Índice de polidispersão das NP-RVT em função do tempo, conservados em temperatura ambiente e sob refrigeração (2-8°C).



n = 3, Média e desvio padrão.

A Figura 17 (A) mostra o gráfico com as médias dos diâmetros médios das NP-RVT, armazenadas em temperatura ambiente e sob refrigeração, durante 12 semanas. Nota-se, que no decorrer das semanas as NP-RVT permaneceram na faixa de ~175 nm nos dois locais de estocagem, não ocorrendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as semanas. O mesmo ocorreu para o IP, observado na Figura 17 (B), mantendo-se entre 0,08 – 0,18, permanecendo estáveis durante todo período avaliado, sem indícios de agregação entre as NP.

Figura 18: A) Potencial Zeta das NP-RVT e B) Teor de RVT liberado das NP-RVT em função do tempo, conservados em temperatura ambiental e sob refrigeração (2-8°C).



n = 3, Média e desvio padrão; a- sem diferença estatística; b- diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

O gráfico (A) da Figura 18, mostra o potencial zeta das NP-RVT acondicionadas em temperatura ambiente e sob refrigeração, ao longo das semanas. Inicialmente, podemos observar que o potencial zeta oscilou no decorrer do tempo, com diferença estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre a 3°, 7° e a partir da 9°semana, para as duas condições de armazenamento. Apesar das diferenças estatísticas, todas as cargas superficiais foram acima de -25 mV, considerado um alto potencial zeta, capaz de conferir uma grande estabilidade das suspensões coloidais (NEVES et al., 2013).

Alguns autores relataram oscilações entre os valores de potencial zeta, de uma mesma partícula, durante um prolongado período de análises. Esse fenômeno foi observado por GRILLO e colaboradores (2012) em suas NP de poli(ε-caprolactone) contendo atrazina, e também por OLIVERA et al. (2015) em NLS contendo atrazina e simazina. Porém, os autores consideraram as NP estáveis, pois as oscilações encontravam-se bem distantes da neutralidade.

O teor de fármaco liberado foi obtido através da leitura dos sobrenadantes recolhidos semanalmente das NP-RVT e analisados por CLAE. Os percentuais de decaimento da concentração do RVT, para ambos os ambientes, estão contidos no gráfico (B) da Figura 18. As NP-RVT, mantidas sob refrigeração, apresentaram um teor de RVT liberado de aproximadamente 8%, até a 7° semana, mantendo esse percentual nas semanas seguintes. As NP-RVT em temperatura ambiente, obtiveram uma menor liberação do RVT, com cerca de 5% ao longo do tempo. O teor de fármaco liberado para os NP-RVT para os dois locais, refere-se ao RVT adsorvido na superfície das NP, que ao

entrarem em contato com a água, ocorre rapidamente a dessorção do RVT da superfície das NP-RVT e este é liberado no meio aquoso.

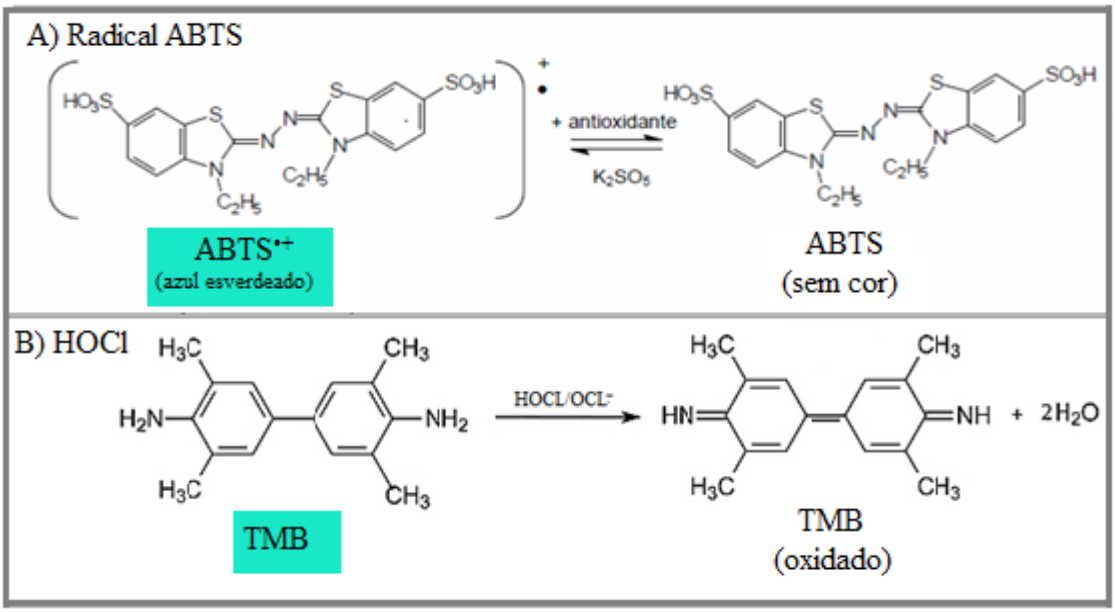
Durante o tempo de armazenamento, as NP podem sofrer influência de diversos fatores, e consequentemente, comprometer a estabilidade físico-química das partículas. Dessa forma, a limitação de uma estabilidade de curto prazo, reflete em dificuldades de produção, como transpor em grande escala, ou até mesmo a incerteza da permanência das condições iniciais das NP (SCHAFFAZICK et al., 2003). O conjunto de resultados obtidos pela avaliação dos principais parâmetros das NP, armazenadas em temperatura ambiente e sob refrigeração, demonstra que não houve diferenças significativas entre os dois locais de estocagem. Sendo assim, pode-se considerar seguro o acondicionamento das NP-RVT em ambos os ambientes, por no máximo de 3 meses. Durante esse período, as características das NP-RVT são garantidas e a sua aplicabilidade segura.

5.5 Atividade Antioxidante *In Vitro*

Atualmente, são relatados inúmeros mecanismos em que os radicais livres (RL) podem atuar nos organismos vivos, e também, da variedade de moléculas reativas que podem ser formadas. Dessa forma, não existe um ensaio *in vitro* universal que englobe todos os RL, além de ser efetivamente preciso e capaz de determinar quantitativamente a atividade antioxidante (AA) dos mesmos. O critério de escolha dos ensaios antioxidantes a serem empregados, devem ser os que mais assemelham-se aos processos *in vivo,* pois um composto que exibe baixa AA *in vitro,* tenderá a exibir pouca atividade quando em nível sistêmico (HALLIWELL, 1995).

Os ensaios antioxidantes *in vitro,* estabelecidos para avaliar a AA das NP-RVT foram: inibição dos radical $ABTS^{\bullet+}$ e do ácido hipocloroso (HOCl). Essas análises são colorimétricas, ou seja, elas avaliam a reação de transferência de elétrons, através da mudança de intensidade da cor (BENZIE, STRAIN, 1999). Além de tratar-se de métodos rápidos, com alta simplicidade operacional e reprodutibilidade (APAK et al, 2007) (Figura 19).

Figura 19: A) Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante (sem cor) e formação do radical a partir do perssulfato de potássio (coloração esverdeada); B) Representação da oxidação do TMB pelo HOCl / OCl-.



5.5.1 Captura do ABTS•+

Diante das inúmeras metodologias que avaliam a interação entre substâncias antioxidantes e os RL, é comum utilizar radicais-modelos, ou radicais não biológicos, também capazes de avaliar o potencial antioxidante dos compostos. Entre esses, destaca-se a captura do ABTS•+, que avalia a AA devido a sua semelhança com o radical hidroxila (HO•), considerado um dos RL mais reativos no organismo, capaz de causar danos em várias estruturas biológicas (PRABHU et al.,2011; RE et al., 1999). A capacidade antioxidante do ABTS•+ foi avaliada para as amostras de RVT, NP-RVT e NP-brancas (0,5-5,0 µg/mL), nos tempos pré-determinados, sendo os resultados apresentados na Tabela 7.

Ao analisarmos os resultados, podemos observar que o RVT, na sua forma livre, apresentou um perfil de inibição dose-dependente, ou seja, quanto maior era a concentração da droga maior era a inibição do radical. Isso ficou bem evidente nas concentrações baixas da droga, pois em concentrações acima de 3,0 µg/mL a AA foi completa, com total captura do radical. GÜLÇIN (2010) obteve resultados similares em seu estudo da avaliação da AA do RVT. Outros autores, também avaliaram o potencial antioxidante do RVT na captura do ABTS•+ e há consenso sobre a grande capacidade antioxidante do RVT, atribuída principalmente as hidroxilas livres presentes na molécula (SIMIC, JAVANOVIC, 1994).

Tabela 7: Porcentagem de inibição do $ABTS^{\bullet+}$ pelo RVT, NP-RVT e NP-branca em concentrações de 0,5 ,1, 2, 3, 4, 5 µg/mL nos tempos 0, 24, 48 e 72 h.

	RVT	***NP-RVT***	***NP-branca***
0 h			
0,5 µg/mL	41 ± 2[a]	15 ± 1[b]	12 ± 0,5[b]
1,0 µg/mL	68 ± 0,8[a]	17 ± 1[b]	15 ± 1[b]
2,0 µg/mL	84 ± 0,5[a]	25 ± 0,3[b]	18 ± 1[c]
3,0 µg/mL	98 ± 0,4[a]	33 ± 0,3[b]	26 ± 1[c]
4,0 µg/mL	99 ± 0,4[a]	42 ± 3[b]	31 ± 0,7[c]
5,0 µg/mL	100 ± 0,1[a]	50 ± 2[b]	32 ± 2[c]
24 h			
0,5 µg/mL	46 ± 1[a]	15 ± 6[b]	17 ± 2[b]
1,0 µg/mL	75 ±0,8[a]	22 ± 2[b]	19 ± 0,2[b]
2,0 µg/mL	96 ± 0,4[a]	32 ± 0,6[b]	25 ± 2[c]
3,0 µg/mL	98 ± 0,4[a]	36 ± 1[b]	30 ± 2[c]
4,0 µg/mL	99 ± 0,2[a]	42 ± 2[b]	32 ± 1[c]
5,0 µg/mL	100 ± 0,2[a]	50 ± 2[b]	34 ± 3[c]
48 h			
0,5 µg/mL	40 ± 3[a]	13 ± 2[b]	10 ± 2[b]
1,0 µg/mL	63 ± 2[a]	15 ± 3[b]	11 ± 0,3[b]
2,0 µg/mL	98 ± 1[a]	20 ± 1[b]	15 ± 1[c]
3,0 µg/mL	98 ± 1,7[a]	27 ± 4[b]	17 ± 2[c]
4,0 µg/mL	99 ± 0,3[a]	39 ± 7[b]	20 ± 0,4[c]
5,0 µg/mL	100 ± 0,1[a]	51 ± 3[b]	33 ± 2[c]
72 h			
0,5 µg/mL	31 ± 2[a]	15 ± 0,6[b]	14 ± 2[b]
1,0 µg/mL	52 ± 1[a]	16 ± 4[b]	14 ± 1[b]
2,0 µg/mL	79 ± 0,7[a]	18 ± 2[b]	15 ± 1[c]
3,0 µg/mL	94 ± 0,3[a]	25 ± 3[b]	17 ± 1[c]
4,0 µg/mL	98 ± 0,4[a]	40 ± 3[b]	25 ± 0,8[c]
5,0 µg/mL	99 ± 0,3[a]	49 ± 5[b]	33 ± 3[c]

n = 3, médias ± desvio padrão. a, b: análise estatística ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferenças desigualdade estatísticas.

O perfil antioxidante apresentado pelas NP-RVT também foi dose-dependente, porém com menor AA, quando comparada ao RVT livre. Apesar disso, esse resultado corrobora com o perfil de liberação *in vitro* (Figura 15), que demonstra que a taxa de liberação do RVT a partir das NP-RVT foi lenta e gradual. Desse modo, a concentração do RVT no meio reacional é muito baixa (menor do que o exposto na tabela 7), refletindo diretamente na AA exercida pelas NP-RVT.

Surpreendentemente, as NP-brancas também demostraram AA consideráveis, atingindo capacidade antioxidante máxima de ~30%. O potencial antioxidante da BSA é

atribuído, principalmente, aos grupos funcionais: aminas e sulfidrilas (KOUOH et al., 1999). Nota-se que em todos os tempos analisados, as NP-RVT e NP-brancas, nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL, não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Acredita-se que em baixas concentrações de NP-RVT, a AA seja provinda integralmente da AA da BSA, pois a concentração do RVT é muito baixa, além da droga encontra-se interiorizada na estrutura polimérica, desse modo, a expressão da AA do RVT torna-se dificultada.

5.5.2 Inibição do Ácido Hipocloroso (HOCl)

O HOCl é um potente agente oxidante, gerado pelos neutrófilos com finalidade microbicida, sua produção *in vivo*, ocorre através reação de íons cloretos com hidróxido de hidrogênio. Entretanto, sua produção excessiva pode acarretar em danos em diversos tecidos, decorrente da alta reatividade com moléculas biológicas (KLEBANOFF, 1980; MIYAMOTO et al., 2006). A atividade antioxidante das amostras de RVT, NP-RVT e NP-brancas (0,5-5,0 µg/mL) em tempos pré-determinados, foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Tabela 8. Através da análise dos dados contidos na tabela, em geral, o perfil de inibição do HOCl foi equivalente ao apresentado pelo ensaio do $ABTS^{\bullet+}$. A droga livre também obteve AA máxima em torno de 3,0 µg/mL, demonstrando o alto poder antioxidante da droga. Porém, na inibição do HOCl nota-se um maior potencial antioxidante exercido pelas amostras, principalmente para as NP-RVT, que em concentrações mais altas atingiu AA próxima a 70%.

Tabela 8: Porcentagem de inibição do HOCl pelo RVT, NP-RVT e NP-branca em concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μg/mL nos tempos 0, 24, 48 e 72 h.

	RVT-Livre	***NP-RVT***	***NP-branca***
0 h			
0,5 μg/mL	68 ± 5^{a}	34 ± 3^{b}	19 ± 5^{c}
1,0 μg/mL	69 ± 8^{a}	40 ± 1^{b}	22 ± 4^{c}
2,0 μg/mL	88 ± 2^{a}	48 ± 2^{b}	33 ± 2^{c}
3,0 μg/mL	92 ± 2^{a}	61 ± 3^{b}	35 ± 3^{c}
4,0 μg/mL	96 ± 1^{a}	66 ± 2^{b}	37 ± 2^{c}
5,0 μg/mL	$98 \pm 0,1^{a}$	73 ± 2^{b}	42 ± 4^{c}
24 h			
0,5 μg/mL	37 ± 5^{a}	31 ± 4^{a}	16 ± 6^{c}
1,0 μg/mL	36 ± 2^{a}	35 ± 3^{a}	19 ± 4^{c}
2,0 μg/mL	90 ± 2^{a}	45 ± 5^{b}	22 ± 6^{c}
3,0 μg/mL	96 ± 3^{a}	5 ± 4^{b}	33 ± 3^{c}
4,0 μg/mL	$99 \pm 0,1^{a}$	56 ± 2^{b}	38 ± 2^{c}
5,0 μg/mL	$100 \pm 0,1^{a}$	65 ± 3^{b}	40 ± 5^{c}
48 h			
0,5 μg/mL	53 ± 3^{a}	36 ± 4^{b}	20 ± 3^{c}
1,0 μg/mL	63 ± 4^{a}	48 ± 2^{b}	25 ± 2^{c}
2,0 μg/mL	89 ± 4^{a}	51 ± 3^{b}	30 ± 4^{c}
3,0 μg/mL	$96 \pm 0,5^{a}$	62 ± 5^{b}	38 ± 2^{c}
4,0 μg/mL	$97 \pm 0,8^{a}$	65 ± 2^{b}	40 ± 4^{c}
5,0 μg/mL	$99 \pm 0,5^{a}$	$69 \pm 0,8^{b}$	43 ± 4^{c}
72 h			
0,5 μg/mL	56 ± 3^{a}	28 ± 3^{b}	19 ± 4^{c}
1,0 μg/mL	66 ± 3^{a}	47 ± 3^{b}	20 ± 2^{c}
2,0 μg/mL	$86 \pm 0,4^{a}$	53 ± 2^{b}	28 ± 3^{c}
3,0 μg/mL	$99 \pm 0,1^{a}$	65 ± 1^{b}	34 ± 2^{c}
4,0 μg/mL	$99 \pm 0,1^{a}$	$65 \pm 0,8^{b}$	$34 \pm 0,6^{c}$
5,0 μg/mL	$100 \pm 0,1^{a}$	67 ± 3^{b}	45 ± 1^{c}

n = 3, médias ± desvio padrão. a, b, c: análise estatística ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferenças desigualdade estatísticas .

O potencial antioxidante da BSA também foi evidente na reação de inibição do HOCl, com AA em torno de 40%. O mecanismo antioxidante exercido pela BSA sobre o HOCl deve-se, principalmente, pelas interações do HOCl com grupos funcionais das cadeias laterais das proteínas. Alguns grupos químicos, que são sítios de ligação funcional da proteína, podem ser desativados ao interagirem com o HOCl, como a interação com os grupos tióis livres e tioésteres, dos aminoácidos cisteína e metionina, respectivamente (PATTISON, DAVIES, 2006). As reações com os grupamentos aminas, formam as cloraminas, que também são reativas com as estruturas biológicas, porém, é um oxidante

mais suave com toxicidade variável, dependendo da polaridade e da permeabilidade das membranas. Os mecanismos de atuação das cloraminas ainda não estão bem elucidados, mas alguns autores relatam que elas possuem alvos moleculares diferentes dos HOCl (BABIOR, 2000; ZGLICZYNSKI, 1971; VASCONCELOS, 2007, MIDWINTER et al., 2006).

A Tabela 9 demonstra os valores de IC_{50} para o RVT livre e nanoencapsulado (NP-RVT) para a inibição do HOCl.

Tabela 9: IC_{50} do resveratrol (livre e nanoencapsulado), através da inibição do ácido hipocloroso em tampão fosfato salino (50 mM, pH 7.4) nos tempos 0, 24, 48, 72 horas (λ = 734 nm).

Tempo (h)	***IC_{50} RVT (µg/mL)***	***IC_{50} NP-RVT (µg/mL)***
0	$0,7 \pm 0,1^{a}$	$2 \pm 0,1^{b}$
24	$1 \pm 0,1^{a}$	$3 \pm 0,1^{b}$
48	$0,2 \pm 0,06^{a}$	$2 \pm 0,2^{b}$
72	$0,1 \pm 0,05^{a}$	$2 \pm 0,1^{b}$

O valor calculado do IC_{50} para o RVT livre, demonstrou ser bem menor do que o valor do IC_{50} das NP-RVT, pois, como discutido anteriormente, a liberação lenta do RVT a partir das NP-RVT influencia diretamente no potencial antioxidante das NP. Da mesma forma, ao analisar o IC_{50} *versus* tempo, apesar das variações aparentes, não se observa uma redução significativa na AA das NP-RVT. Desse modo, acredita-se que a AA das NP-RVT perdurará por um período prolongado, devido a gradual liberação do RVT, mantendo a AA constante. MUNHOZ (2010) encontrou em seu estudo um IC_{50} = 1,02 µg/mL para o RVT livre, corroborando com os valores encontrados no presente trabalho, onde fica evidente a forte capacidade antioxidante do RVT mesmo em concentrações baixas.

Durante os processos infecciosos ocorre uma produção excessiva de HOCl e o organismo humano não possui meios para eliminá-los, dessa maneira, o controle desses radicais *in vivo* torna-se de extrema importância (ALLEN, 1994). As proteínas e os lipídios são os principais alvos de ataques do HOCl; nas proteínas ele pode interagir com grupos aminas e tióis dos aminoácidos produzindo cloraminas e cloreto de sulfonila; com os lipídios, o HOCl liga-se as duplas C-C, dando origem a cloridrinas, necessárias no processo de indução da peroxidação lipídica (ALLEN, 1994; WINTERBOURN, KETTLE, 2000).

O HOCl também pode contribuir indiretamente nos processos oxidativos, através da geração de outros ROS, como ao reagir, por exemplo, com o peróxido de oxigênio dando origem ao oxigênio singleto ($^1O_2$) altamente reativo com estruturas biológicas, capaz de oxidar lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos (RONSEIN et al. 2006).

Em tais condições, a presença de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o HOCl pode ajudar a combater a injúria tecidual. Acredita-se que o sequestro do HOCl por agentes farmacológicos, só será terapeuticamente significativo se, *in vivo*, a reação com o HOCl for suficientemente rápida, capaz de proteger as moléculas-alvo, biologicamente importantes, do ataque do HOCl. Sendo assim, o poder antioxidante da droga em análise deve ser altamente eficiente na captura e neutralização do HOCl (HALLIWELL,1995; LAPENNA, CUCCURULLO, 1996). Dessa maneira, o RVT apresentou-se como um promissor inibidor do HOCl, mostrando resultados *in vitro* satisfatórios, capaz de inibir o HOCl em concentrações baixíssimas.

Ao analisarmos os dois ensaios antioxidantes *in vitro*, fica evidente o grande potencial antioxidante do RVT, principalmente por sua propriedade redutora, capaz de neutralizar e capturar as moléculas reativas (SIMIC, JAVANOVIC, 1994). Além disso, a droga também pode atuar, *in vivo*, de forma inespecífica no combate aos RL, ativando outras vias capazes de aumentar a concentração intracelular de enzimas importantes na proteção dos efeitos deletérios dos RL, incluindo as enzimas glutationa peroxidase e glutationa redutase (LOSA, 2003; OLAS et al., 2004; YEN et al., 2003).

Da mesma forma, os mecanismos antioxidantes da BSA estão elucidados por muitos autores, que demonstraram sua capacidade em interagir diretamente com os RL. CHA e KIM (1996) e ZGLICZYNSKI e colaboradores (1971) citam que as principais vias de inativação dos RL, são por meio de interações químicas com os grupos sulfidrilas e aminas presente na proteína, através de reações com o H_2O_2 e HOCl, respectivamente. Sendo assim, no sistema NP-RVT como um todo, a BSA não possui somente função estrutural e transportadora, característico dos polímeros em sistemas nanoestruturados, mas também propriedades funcionais importantes.

Ao avaliar a AA das NP-RVT *in vitro*, temos que inicialmente levar em consideração a taxa de liberação da droga através da cadeia polimérica (Figura 15). Desse modo, ao longo das 72 h de ensaio antioxidante, somente 20% de RVT encapsulado foi liberado, ou seja, a concentração de RVT no meio reacional é cerca de 5 vezes menor do que o adicionado no ensaio. Ainda assim, as NP-RVT alcançaram AA em torno de 50% em concentrações mais altas (conforme os dados da Tabela 9 e 10). Outra questão acerca

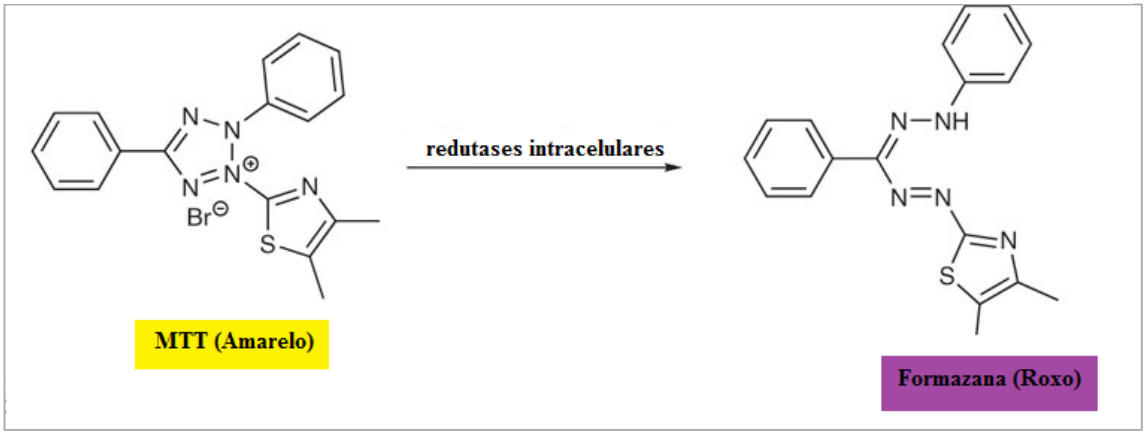
da liberação, é de se tratar de uma liberação biexponencial, com uma liberação rápida nas primeiras horas, seguida de uma liberação mais lenta. Dessa maneira, o combate aos RL pode ser constante, sem necessidade de altas doses e administrações contínuas das NP-RVT, mantendo os níveis plasmáticos baixos, sem comprometer o potencial antioxidante.

Portanto, as NP-RVT tendem a ter um efeito antioxidante ainda mais promissor do que a droga livre, devido aos seguintes fatores: a) grande potencial antioxidante exercido pelo RVT, que mesmo em concentrações baixas apresenta AA relevante; b) constante liberação da droga a partir das NP-RVT no meio biológico, diminuindo as chances da droga sofrer metabolização antes de atuar fármacologicamente; c) capacidade antioxidante exercida pela BSA, atestando que a AA exercida pela NP-RVT é proveniente da somatória entre a AA RVT com a AA da BSA.

5.6 Atividade Citotóxica *In Vitro*

A avaliação da citotoxicidade é essencial na fase inicial do desenvolvimento de fármacos, principalmente na avaliação de novos agentes antitumorais, uma vez que permiti determinar o grau de apoptose das células tumorais, assim como as concentrações necessárias para atingir citotoxicidade considerável. A técnica empregando o MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio) é uma das mais utilizadas como indicadora colorimétrica da viabilidade celular avaliando-se a função mitocondrial das células .

Figura 20: Esquema da redução do MTT (cor amarelo) pelas redutases intracelulares dando origem à formazana (cor roxa).

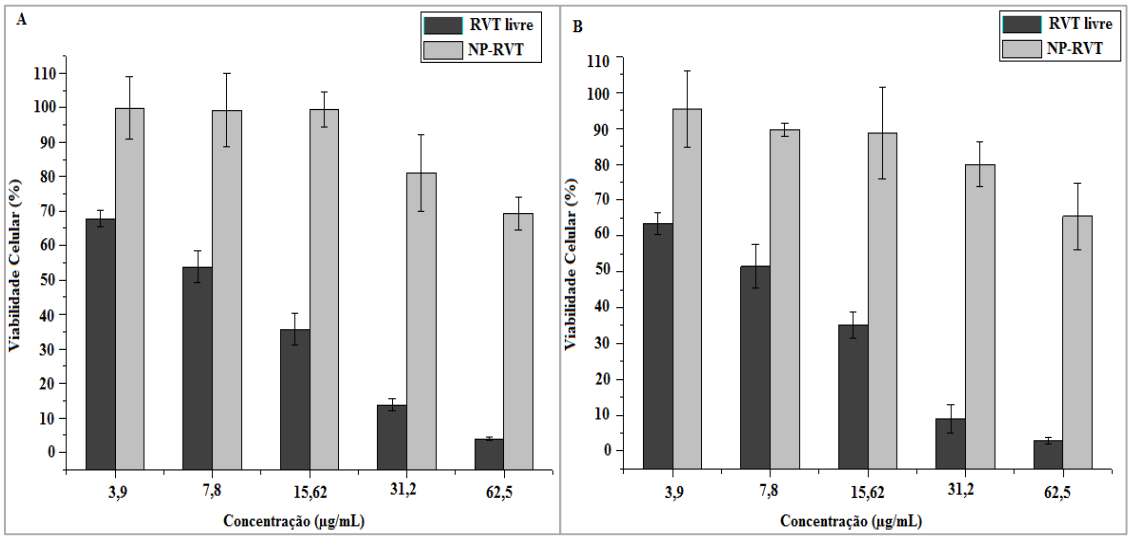


O método baseia-se na redução do MTT e as reações de redução só ocorrem quando redutase intracelulares estão ativas, portanto, a conversão é uma medida de células viáveis, metabolicamente ativas (Figura 20). No processo de redução, o MTT (cor

amarelo) transforma-se em formazana (cor azul). Assim, quando as células sadias são expostas a algum agente citotóxico e sofrem apoptose, não corre a formação da formazana, consequentemente, a intensidade de cor é proporcional a viabilidade celular (DENIZOT e LANG, 1986; MOSMANN, 1983).

A atividade citotóxica *in vitro* do RVT livre e nanoencapsulado foi avaliada sobre linhagem de células B16F10 (modelo de melanoma murino) em diversas concentrações e em tempos pré-determinados. Nas primeiras horas analisadas, 24 e 48 h, o RVT apresentou atividade citotóxica considerável, porém, as NP-RVT apresentam viabilidade celular próximas à 100% em todas as concentrações analisadas. Isso ocorreu devido ao perfil de liberação lento do RVT a partir das NP-RVT, desse modo, os dados obtidos não foram expostos no presente estudo. Os controles do solvente (etanol) e as NP-brancas não afetaram significativamente a viabilidade celular, quando comparados com o meio controle, permanecendo próximos a 100% em todos os tempos analisados. O perfil de citotoxicidade do RVT livre e nanoencapsulado, nos tempos de 72 e 96 h, estão contidos no Figura 21.

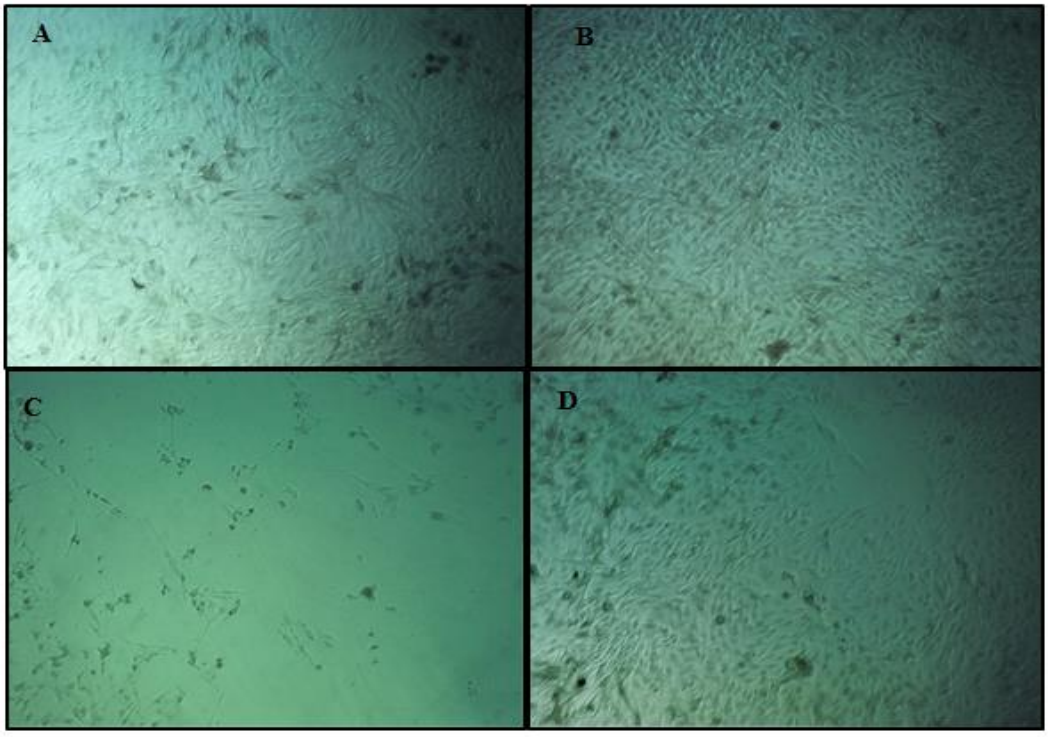
Figura 21: Porcentagem de índice de sobrevivência das concentrações de RVT livre e encapsulado sobre B16F10, em a) 72 h e em b) 96 h.



O RVT livre demonstrou um perfil citotóxico potente e dose-dependente, com viabilidade celular abaixo de 10% em concentrações acima de 31,2 µg/mL, para os dois tempos analisados. O resultado obtido, corrobora os valores encontrados por outros autores, com citotoxicidade considerável em concentrações de 30,0 µg/mL (RUAN et al., 2011; SATOOKA, KUBO, 2012). AGGARWALL e colaboradores (2004) relatam que o mecanismo citotóxico do RVT deve-se, principalmente, a capacidade da droga interromper o ciclo celular, induzindo as células a apoptose.

As NP-RVT apresentaram potencial citotóxico menor, quando comparado ao da droga livre, ao final das 96 horas, a viabilidade celular foi próxima a 75% na concentração mais altas (62,5 µg/mL) de NP-RVT. Também não é possível observar diferenças consideráveis entre os dois tempos analisados. Os resultados obtidos para a citotoxicidade das NP-RVT corroboram com o perfil de liberação *in vitro* apresentado pelas NP-RVT, sendo lento e prolongado. Pois, ao final de 96 h de experimento, somente 23% do RVT foi liberado da estrutura polimérica. Desse modo, a concentração de RVT envolvido no meio reacional é menor do que a concentração adicionada. Toda via, a nível sistêmico o mecanismo de liberação pode ser influenciado por outros sistemas, como por exemplo, alguns sistemas enzimáticos, dessa forma, espera-se que *in vivo* a liberação do RVT seja maior. A Figura 22 ilustra as culturas de B16F10 expostas aos controles, meio e etanol, ao RVT livre e nanoencapsulado.

Figura 22: Fotos do ensaio com as células B16F10, incubadas por 96 h. a) controle com etanol b) controle com NP-brancas c) RVT livre (62,5 µL/mL) e d) NP-RVT (62,5 µL/mL).



As imagens são concordantes com os dados apresentados no gráfico da Figura 19. Onde, as células expostas ao RVT livre (C) apresentam poucas células viáveis, decorrentes do grande efeito citotóxico da droga livre. Da mesma maneira, um potencial citotóxico menor foi observado nas células expostas as NP-RVT (D), porém, quando comparadas ao controle do meio (B), é possível observar uma redução na viabilidade das células.

Os mecanismos antitumorais do RVT já estão bem elucidados na literatura. JANG et al. (1997) relatou que o RVT era capaz de afetar diretamente os três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção. Desde então, novos trabalhos surgiram demonstrando os possíveis mecanismo exercidos pelo RVT. Entre as principais vias, cita-se: 1) a excelente atividade antioxidante, devido a sua habilidade em bloquear alguns tipos de processos carcinogênicos, devido a captura de RL importante nos processos mutagênicos; 2) inibição de várias enzimas indispensáveis na gênese de tumores, como quinases, cicloxigenases, ribonucleotídeos redutases e DNA polimerases; 3) induz a apoptose de algumas células tumorais, seja em parte pela inibição das DNA polimerase e ribonucleotídeo redutase ou pela indução da suspensão do ciclo celular; e 4) atuar indiretamente, ocasionando quimiossensibilização das células tumorais, tornando-as mais sensíveis a outros fármacos quimioterapêuticos (ATHAR et al., 2007; SUBBARAMAIAH et al., 1998; STEWART et al., 2000; GUSMAN et al., 2001; GATOUILLAT et al., 2010).

Estudos de citotoxicidade do RVT frente as diferentes linhagens celulares de melanoma, tiveram resultados contraditórios. CALTAGIRONE e colaboradores (2000) ao injetar o RVT por via intraperitoneal, inibiu o crescimento de células B16-BL6 de melanoma extremamente metastático em ratinhos. No entanto, ASENSI et al. (2002) observou que o RVT, por via oral, não inibiu o crescimento de células melanoma B16M, injetadas na pata de ratos. NILES et al. (2006) em seus dados, observaram que o RVT não tem efeito significativo na redução do crescimento de um xenoenxerto de melanoma humano A375 em ratos e que, em doses maiores, o RVT estimulava o crescimento das células tumorais. Esses resultados para melanoma, demonstram que os efeitos do RVT dependem da dose, da via de administração e também, do modelo de células analisado.

GATOUILLAT e colaboradores (2010) observaram que associando o RVT a outras drogas antitumorais, como a doxorrubicina, o RVT aumentava a citotoxicidade induzida pela doxorrubicina em melanoma B16 resistente à quimioterapia. O mecanismo de quimissensibilização foi através da diminuição da expressão de ciclina D1, proteína necessária para a progressão do ciclo celular da fase G1 para S. Geralmente, nos processos carcinogênicos a expressão dessa proteína está aumentada. Dessa forma, o tratamento combinado com RVT foi associado à um aumento no bloqueio do ciclo celular na fase G1/S.

Dessa forma, o presente trabalho avaliou dois importantes mecanismos exercidos pelo RVT, demonstrado que a droga possui uma potente atividade antioxidante e uma ação citotóxica moderada. A junção dessas atividades, exaltam o RVT como uma droga

promissora no tratamento antitumoral, pois o controle da carcinogênese ocorreria em duas importantes vertentes. Primeiramente, no controle das mutações, devido a eliminação dos RL e, consequentemente, menores chances de novos processos carcinogênicos. E também, no apoptose das células tumorais, através dos efeitos citotóxicos exercidos pelo RVT.

Apesar do sistema nanoestruturado liberar lentamente o RVT e, consequentemente, influenciar na potencialidade das atividades *in vitro.* A estrutura nanométrica torna-se interessante ao pensarmos em seus inúmeros benefícios *in vivo*. Acredita-se que em nível sistêmico, os problemas relacionados a administração do RVT sejam contornados com a sua nanoencapsulação, como o aumento do seu tempo de meia vida e, consequentemente, na sua biodisponibilidade. Da mesma forma, os tamanhos nanométricos compõe um importante parâmetro para sistemas de liberação de fármacos antitumorais, pois os vasos sanguíneos que permeiam os tecidos tumorais apresentam fenestrações de 300 a 700 nm (LEMBO & CAVALLI, 2010). Por tanto, devido as NP-RVT apresentarem tamanhos nanométricos menores que as fenestrações, as mesmas serão capazes de adentrar os tumores e liberar o RVT no sitio de ação pretendido.

As contrações de NP-RVT administradas para ensaios *in vivo* também podem ser maiores dos que as realizadas no ensaio *in vitro* do presente trabalho. Pois alguns estudos já comprovaram que o RVT não apresenta feitos hemolíticos em eritrócitos, em concentrações menores do que 100 µg/mL (JUNG et al., 2007). Dessa forma, concentrações maiores de NP-RVT não provocariam efeitos citotóxicos nas hemácias, e inversamente, ocasionaria um maior efeito antioxidante e citotóxico, em células tumorais, devido a maior liberação do RVT, levando-se em consideração o perfil citotóxico dose-dependente do RVT.

As NP-RVT apresentaram propriedades satisfatórias, porém, é necessário e imprescindível estudar com maior profundidade o potencial NP-RVT, principalmente os mecanismos de liberação *in vivo* e análise da biodisponibilidade da droga liberada a partir das NP-RVT. Além da análise de outros parâmetros importantes, como o estudo de fotoestabilidade, para observar se ocorre proteção do RVT ao ser incorporado nas NP, garantido então que a molécula do RVT está em sua forma estável (*trans),* responsável pelos efeitos biológicos. E outros estudos complementares, incluindo ensaios para sistemas de entrega parenteral, como esterilidade com controle de pirogênios, antes das aplicações dos testes *in vivo*. Dessa maneira, seria possível explorar melhor as inúmeras propriedades apresentadas pelo RVT.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois:

✓ As NP-RVT foram obtidas com êxito através do método de coacervação. E a partir da modificação na técnica, com inserção de incubação entre a droga e o polímero, houve uma maior encapsulação da droga, comparado a estudos similares;

✓ As NP-RVT apresentaram eficiência de encapsulação satisfatórias, com cerca de 60% de droga encapsulada, equivalente a 6 mg de RVT;

✓ As análises físico-químicas mostraram que as nanopartículas obtidas apresentaram forma esférica e diâmetro médio reduzido, com índice de polidispersão baixo e carga superficial negativa. O conjunto das análises físico-químicas demonstraram que as NP-RVT eram amorfas e que existe de uma forte interação entre o RVT e a BSA;

✓ O ensaio de liberação *in vitro* indicaram que as nanopartículas foram capazes de prolongar a liberação do RVT, com uma cinética de liberação regida por duas constantes, sendo liberado rapidamente no início, seguida de liberação lenta e sustentada.

✓ Ao avaliar o melhor local para o acondicionamento das NP-RVT, foi possível observar que as nanopartículas preservavam suas características em temperatura ambiente e sob refrigeração, durante o período de 90 dias, sem perder suas propriedades;

✓ As atividades antioxidantes das NP-RVT foram avaliadas diante a capacidade de captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ e inibição do ácido hipocloroso. Em ambos os ensaios, as NP-RVT demonstraram atividade antioxidante consideráveis, com perfil dose-dependente, sem decaimento da atividade antioxidante em 72 h.

✓ A avaliação da atividade citotóxica do RVT livre e nanoencapsulado sobre linhagem celular B16F10, demonstrou que a viabilidade das células, expostas ao RVT livre, era aproximadamente de 10% e as NP-RVT apresentaram citotoxidade menor (75% de viabilidade celular), devido a liberação lenta do RVT através das NP-RVT.

7. REFERÊNCIAS

ABC DO CÂNCER: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação; organização Luiz Claudio Santos Thuler. – 2. ed. rev. e atual.– Rio de Janeiro : Inca, 2012. p. 129.

AFANAS'EV, I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. **Aging and disease**, v. 5, n. 1, p. 52-62, 2013.

AGGARWAL, B. B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R. S.; SEERAM, N. P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research,** v. 24, n. 5A, p. 2783-2840, 2004.

ALLEN, R. C. Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. **Environmental Health Perspectives,** v. 102, n. 10, p. 201-208, 1994.

ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v.108, n.1, p.55-63, 2008.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.V. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos **Quimica Nova,** v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMES B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

AMES, B. N. Carcinógenos e anticancerígenos dietéticos. Radicais de oxigênio e doenças degenerativas. **Science,** v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.

ANEKONDA, T. S. Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? **Brain research reviews,** v. 52, n. 2, p. 316-326, 2006.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Formas farmacêuticas com velocidade controlada e sistemas de liberação de fármacos. In: _____. **Fármacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2007. cap. 9, p. 283-300.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELIK, S. E.; BEKTAPOOLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-1547, 2007.

ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BAÑO, M.C.; OBRADOR, E.; ESTRELA , J. M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability, **Free Radical Biology and Medicine,** v. 33, n. 3, p. 387-398, 2002.

ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 274-283, 2007.

ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MULLER-GOYMANN, C. C. Further characterization of theobroma oil–beeswax admixtures as lipid matrices for improved

drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 64, n. 3, p. 294-304, 2006.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine,** v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.

BABIOR, B.M. Phagocytes ad Oxidative Stress. **The American journal of medicine**, v.109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BASLY, J. P.; MARRE-FOURNIER, F.; LE BAIL, J. C.; HABRIOUX, G.; CHULIA, A. J. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. **Life sciences,** v. 66, n. 9, p. 769-777, 2000.

BEDÊ, P. M. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomedical. Dissertação (Mestrado) - Ciência dos Materiais Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.

BELLUSCI, M.; LA BARBERA, A.; SERALESSANDRI, L.; PADELLA, F.; PIOZZI, A.; VARSANO, F. Preparation of albumin–ferrite superparamagnetic nanoparticles using reverse micelles. **Polymer International**, v.58, n.10, p. 1142-1147, 2009.

BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology,** v. 299, p. 15–27,1999.

BEYERLEIN, K.R., SOLLA-GULLÓN, J., HERRERO, E., PAILLOUX, F., LEONI, M., SCARDI, P., SNYDER, R.L., ALDAZ, A., FELIU, J.M. Characterization of (1 1 1) surface tailored Pt nanoparticles by electrochemistry and X-ray powder diffraction. **Materials Science and Engineering: A,** v. 528, n. 1, p. 83-90, 2010.

BLACHE, D.; RUSTAN, I.; DURAND, P.; LESGARDS, G.; LOREAU, N. Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications,** v. 702, n. 1-2, p. 103-110, 1997.

BONDY, S. C. The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** v. 208, n. 4, p. 337-345, 1995.

BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. Genética Humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 278 – 299.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of agricultural and food chemistry,** v.49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BUDAVARI, S. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 12. ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1996, p. 186.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN M. E.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines

during vinification. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G., GOLIMOWSKI, J., URBAN, P. L. Nanoparticles: their potencial toxicity, waste and environmental management. **Wast Management**, v. 29, n. 9, p. 2587-2595, 2009.

CALTAGIRONE, S.; ROSSI, C.; POGGI, A.; RANELLETTI, F. O.; NATALI, P. G.; BRUNETTI, M.; AIELLO, F. B.; PIANTELLI, M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 87, n. 4, p. 595-600, 2000.

CAMPOS, C. E. M. Estudo de propriedades físicas de nanomateriais produzidos por síntese mecânica. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2005.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5226-5231, 2003.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15-25, 2013.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in protein chemistry,** v. 45, n. 1, p.153-203, 1994.

CASA, D. M.; CARRARO, T. C. M. M., 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. 14, n. 1, p. 1-7, 2014.

CAVALHEIRO, E. T. G. et al. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 305-308, 1995.

CAVALLI, R., CAPUTO, O., CARLOTTI, M. E., TROTTA, M., SCARNECCHIA, C., GASCO, M. R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, n. 1, p. 47–54, 1997.

CHA, M. K.; KIM, I. H. Gluthathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 222, n. 2, p. 619-625, 1996.

CHAU, C.; WU, S.; YEN, G. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology,** v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CLÉMENT, M. V.; HIRPARA, J. L.; CHAWDHURY, S. H.; PERVAIZ, S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. **Blood**, v. 92, n. 3, p. 996-1002, 1998.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach in Encyclopedia of Analytical Chemistry, Ed. R.A. Meyers, Wiley, Chichester, UK: 2000, p. 10815–10837.

COLIN, D.; LANCON, A.; DELMAS, D.; LIZARD, G.; ABROSSINOW, J.; KAHN, E.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Antiproliferative activities of resveratrol and related

compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1674-1684, 2008.

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

CREASY, L. L.; COFFEE, M. Phytoalexin production potential of grape berries. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** v. 113, n. 2, p. 230-234, 1988.

DAMASCELLI, B.; CANTÙ, G.; MATTAVELLI, F.; TAMPLENIZZA, P.; BIDOLI, P.; LEO, E.; DOSIO, F.; CERROTTA, A. M.; DI TOLLA, G.; FRIGERIO, L. F.; GARBAGNATI, F.; LANOCITA, R.; MARCHIANÒ, A.; PATELLI, G.; SPREAFICO, C.; TICHÀ, V.; VESPRO, V.; ZUNINO, F. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity, **Cancer**, v. 92, n. 10, p. 2592–2602, 2001.

DAS S., BANERJEE R., BELLARE J. Aspirin Loaded Albumin Nanoparticles by Coacervation: Implications in Drug Delivery. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs,** v. 18, n. 2, p. 203-212, 2005.

DE MELO, C. P.; PIMENTA, M. A. **Nanociência e Nanotecnologia**. Parcerias Estratégicas. (2004), n.18, p. 1-248.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DORÉ, S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. **Neuro-Signals,** v. 14, n. 1-2, p. 61-70, 2005.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v.43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKAL, J.; SPICKOVA, Z.; MELZOCH, K.; SCHMIDT, S. Resveratrol and its na tioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 585–593, 2003.

FINSY, R.; JAEGER, N. Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part II: Average values. **Particle & Particle Systems Characterization,** v. 8, n. 1-4, p. 187-193, 1991.

FREIFELDER, D. Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, W H Freeman and Co, San Francisco: 1976, p. 410 – 443.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M. Pefloxacine mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation, **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 84, n. 7, p. 895-902, 1995.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B. G.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed & Pharmacother**, v. 53, n. 4, p. 169-80, 1999.

GATOUILLAT, G.; BALASSE, E.; JOSEPH-PIETRAS, D.; MORJANI, H.; MADOULET, C. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 4, p. 893-902, 2010.

GLOBOCAN – ESTIMATED CANCER INCIDENCE, MORTALITY AND PREVALENCE WORLDWIDE IN 2012. Cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, Acesso em 11 agosto 2015.

GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E. P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.; WATERHOUSE, A. L. Global Survey of *Trans*-Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. **American Journal of Enology and viticulture,** v. 46, n. 2, p. 159-165, 1995.

GORNER, T.; GREF, R.; MICHENOT, D.; SOMMER, F.; TRAN, M.N.; DELLACHERIE, E. Lidocaine-loaded biodegradable nanoispheres. I. Otmization of the drug incorporation into the polymeric matrix. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v.57, n.3, p.259-268,1999.

GRILLO, R.; DOS SANTOS, N. Z.; MARUYAMA, C. R; ROSA, A. H.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F. Poly(ε-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of hazardous materials**, v. 231-232, n. 1, p. 1-9, 2012.

GÜLÇIN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v.11, n. 1, p. 210–218, 2010.

GUO, L.; YAO, J.; SUI, L. Preparation and Effects of Resveratrol Bovine Serum Albumin Nanoparticles on Proliferation of Human Ovarian Carcinoma Cell SKOV3**. Chemical Journal of Chinese Universities,** v. 30, n. 3, p. 474-477, 2009.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B, Nanoparticle technology for drug delivery. New York: Taylor & Francis Group; 2006. p. 139–154.

GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001.

GUYTON, A.; HALL, J. C. Controle Genético da Síntese de Proteínas, do Funcionamento e da Reprodução Celular._____In: **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997, p.30.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology,** v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases, **Drugs & Aging,** v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERDGE, J. M. C. Free radical, other reactive species and disease. _____In: Free radicals in biology and medicine. 3rd Oxford: Clarenton Press 1999. p.617-783.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, n. 1, p. 1-85, 1990.

Harwood M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzelleca, J. F.; Flamm, G. W.; Williams, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology,** v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

HIRAYAMA, K., AKASHI, S., FURUYA, M., FUKUHARA, K. Rapid confirmation and revision of the primary struture of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 2, p. 639-646, 1990.

HOLAND, W.; RHEINBERGER, V.; APEL, E.; RITZBERGER, C.; ROTHBRUST, F.; KAPPERT, H.; KRUMEICH, F.; NESPER, R. Future perspectives of biomaterials for dental restoration. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1291-1297, 2009.

HOLMBERG, K., JÖNSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAN, B., Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2 edition. Editora Wiley, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, X.; BRAZEL C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release,** v. 73, n. 2001, p. 121-136, 2001.

HUNG, C. F.; FANG, C. L.; LIAO, M. H.; FANG, J. Y.The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: tocol emulsions versus lipid emulsion**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 335, n. 1-2, p. 193–202, 2007.

HUNG, L. M.; CHEN, J. K.; HUANG, S. S.; LEE, R. S.; SU, M. J. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular research,** v. 47, n. 3, p. 549-555, 2000.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. O que é câncer? Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>, Acesso em 11 agosto de 2015.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 124p. Rio de janeiro, INCA, 2015.

IRACHE, J. M.; ESPUELA, S. Albumin nanoparticles._____ In: C. S. S. R. Kumar (Ed.), Biological and pharmaceutical nanomaterials, Nanotechnologies for the life sciences: Wiley-VCH., v. 2, 2006, p. 185-218.

ITO, T.; AKAO, Y.; YI, H.; OHGUCHI, K.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. **Carcinogenesis,** v. 24, n. 9, p. 1489-1497, 2003.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Eletronic Version. Disponível em: http://goldbook.iupac.org/C01116.html . Acesso em setembro de 2006.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 172-183, 2008.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A. C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2731-2741, 2002.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON B.The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. **American Journal of Enology and viticulture,** v. 42, n. 1, p. 41-46, 1991.

JUNG, H. J.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. Candicidal action of resveratrol isolated drom grapes on human pathogenic yeast *C. albicans.* **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 17, n. 8, p. 1324-1329, 2007.

KALAB, M. Food Structure and milk products. _____In: Huy, Y.H. Encyclopedia of food science and technology. New York, Wiley Interscience: 1993, p.1170-1196.

KAMATH, M. S.; AHMED, S. S. S. J.; DHANASEKARAN, M.; SANTOSH, S. W. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 183-195, 2014.

KHARB, V.; BHATIA, M.; DUREJA, H.; KAUSHIK, D. Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. **Pharmaceutical Technology,** v. 30, n. 3, p. 82, 2006.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. H. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering** v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International journal of pharmaceutics,** v. 284, n.1-2, p.109-122, 2004.

KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y. W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1133-1139, 2008.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes**. Annals of internal medicine**, v. 93, n. 3, p. 480-489, 1980.

KLOSE D.; DELPLACE C.; SIEPMANN J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 75-82, 2011.

Konan, Y.; Gurny, R.; Allémann, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239–252, 2002.

KONAN, Y.N.; CERNY, R.; FAVET, J.; BERTON, M.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 115-24, 2003.

KOUOH, F.; GRESSIER, B.; LUYCKX, M.; BRUNET, C.; DINE, T.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. **Il Fármaco,** v. 54, n. 10, p. 695-699, 1999.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin,** v. 25, n. 6, p. 695-704, 2002.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release,** v. 132, n.3, p. 171-183, 2008.

KRATZ, F.; FICHTNER, I.; SCHUMARCHER, P.; ROTH, T.; FEIBIG, H. H.; UNGER, C. Antitumor activity of acid labile transferrin and albumin doxorubicin conjugates in

vitro and in vivo human tumor xerograft models, **European Journal of Cancer,** v. 33, n. 8, p. 175-175, 1997.

KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex Coacervation of Proteins and Anionic Polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.

KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual review of phytopathology,** v. 33, n. 1, p. 275-297, 1995.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles **Basedkonan drug delivery systems,** v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUU W.; PRISCO M. R.; WOOD R. W.; ROSEMAN T. J. Studies of dissolution behavior of highly soluble drugs using a rotating disk. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 77-89, 1989.

LAKOWICZ, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed. 1999: Cambridge.

LAM, P. L.; STANTON, K. H. L.; GAMBARI, R.; KOK, T.W.; LEUNG, H. Y.; K. L. CHOI; WONG, C. S.; HAU, D. K. P.; WONG, W. Y.; LAM, K. H.; BIAN, Z. X.; LEE, K. K. H.; CHUI, C. H. Evaluation of berberine/bovine serum albumin nanoparticles for liver fibrosis therapy, **Green Chemistry,** v. 17, n. 3, p. 1640-1646, 2015.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* nad other members of the Vitaceae as a response to infection or injury, **Physiological Plant Pathology,** v. 9, n. 1, p. 77-86, 1976.

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.

LANKIN, V. Z.; LISINA, M. O.; ARZAMASTSEVA, N. E.; KONOVALOVA, G. G.; NEDOSUGOVA, L. V.; KAMINNYI, A. I.; TIKHAZE, A. K.; AGEEV, F. T.; KUKHARCHUK, V. V.; BELENKOV, Y. N. Oxidative stress in atherosclerosis and diabetes. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 140, n.1, p. 41-43, 2005.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: An update Picture. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1549-1560, 2009.

LEITE, E. G. **Estabilidade:** importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, nível de mestrado profissionalizante. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

LEMBO, D.; CAVALLI, R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral chemistry & Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 53-70, 2010.

LEO, E.; CAMERONI, R.; FORNI, F. Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates. **International journal of pharmaceutics**, v. 180, n. 1, p. 23-30, 1999.

LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B.; STINEFELT , B.; KLANDORF , H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 309, n. 4, p. 1017-1026, 2003.

LI, J.; ZU, Y.; ZHAO, X.; ZHAO, D.; CHEN, X.; NA, Z.; WANG, K. Preparation, Characterization, and in Vitro Evaluation of Resveratrol-Loaded Bovine Serum Album Nanoparticles. **Advanced Materials Research,** v. 345, n. 1, p. 349-354, 2012.

LI, X.; LI, H.; LIU, M.; LI, G.; LI, L.; SUN, D. From guest to ligand – A study on the competing interactions of antitumor drug resveratrol with β-cyclodextrin and bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, n. 521, n. 1-2, p. 74-79, 2011.

LIANG, L.; TAJMIR-RIAHI, H. A.; SUBIRADE, M. (2008). Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p.50–56, 2008.

LINDNER, G.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Determination Of Resveratrol In Polymeric Nanoparticles By An Hplc-Pda Method And Evaluation Of Its Antioxidant Activity. **The Scientific World Journal**, v.2013, n.1, p. 1-9, 2013.

LIVELRSIDGE, G. G.; CUNDY, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs. I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 91-97, 1995.

LOSA, G. A. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. **European journal of clinical investigation,** v. 33, n. 8, p. 818-823, 2003.

LUNA, D. M. N.; ANDRADE, C. A. S. Nanotecnologia aplicada à odontologia. **International Journal of Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 161-168, 2011.

LUZZI, L. A.; Microencapsulation. **Journal of pharmaceutical sciences,** v. 59, n. 10, p. 1367-1376, 1970.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical care,** v. 10, n. 1, p. 1-8, 2006.

MAGENHEIM B, BENITA S, Nanoparticle Characterization: a Comprehensive Physicochemical Approach**. S.T.P. pharma sciences**, v.1, n.1, p. 221-241, 1991.

MAINARDES, R. M. GREMIÃO, M. P. D., BRUNETTI, I. L., DA FONSECA, L. M., KHALIL, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 98, n. 1, p. 257-267, 2009.

MAINARDES, R. M., URBAN M. C., CINTO, P. O., CHAUD, M. V., EVANGELISTA, R. C., GREMIÃO, M. P. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.

MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A.; ZIMMERMAN, M. D.; JABLONSKA, K.; STEWART, A. J.; CHRUSZCZ, M.; MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and habbit serum albumins. **Molecular Immunology,** v. 52, n. 3-4, p. 174-182, 2012.

MALVERN. Zetasizer Nano Series. User Manual. MAN 031, Issue 2.1., 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANADAS R.; PINA M. E.; VEIGA F.A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MARIMOTO, Y.; e FUJIMOTO, S. Albumin microspheres as drug carriers. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems,** v. 2, n.1, p. 19-63, 1985.

MARTIN, A., SWARBRICK, J. E., CAMMARATA, A. Physica l Pharmacy. 4 ed. Pensilvania: Lippincott Williams & Willians, 1993.

MARTINEZ, J.; MORENO, J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. **Biochemical pharmacology,** v. 59, n. 7, p. 865-870, 2000.

MARTY, J. J. The Preparation, Purification, and Properties of Nanoparticles. D. Pharm. Thesis. Victorian College of Pharmacy: Parkville, Austral, 1977, p. 30.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MÉNDEZ FILHO, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. Sobre los benefícios de los radicales libres. **Revista Médica del IMSS,** v. 35, n. 4, p. 309-313, 1997.

MÉRILLON, J. M., FAUCONNEAU, B.; TEGUO, P. W.; BARRIER, L.; VERCAUTEREN, J.; HUGUET, F. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from Vitis vinifera cell cultures. **Clinical chemistry,** v. 43, n. 6-1, p. 1092-1093, 1997.

MERODIO, M.; ARNEDO, A.; RENEDO, M. J.; IRACHE, J. M. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. **European journal of pharmaceutical sciences,** v. 12, n. 3, p. 251-259, 2001.

MEZIANI, J. M.; SUN, Y. Protein-Conjugated Nanoparticles from Rapid Expansion of Supercritical Fluid Solution into Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society,** v. 125, n. 26, p. 8015-8015, 2003.

MIDWINTER, R. G.; CHEAH, F. C.; MOSKOVITZ, J.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation. **The Biochemical Journal**, v. 396, n. 1, p. 71-78, 2006.

MILLER, N. J., RICE-EVANS C. A. Factors influencing the antioxidante activity determined by the $ABTS^{\cdot+}$ radical cation assay. **Free radical research,** v. 26, n. 3, p. 195-199, 1997.

MINCHIN, R. F.; MARTIN, D. J. Nanoparticles for molecular imaging--an overview. **Endocrinology,** v. 151, n. 2, p. 474-481, 2009.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; RETTORI, D.; AUGUSTO, O.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxyl radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 103, n. 2, p. 293-298, 2006.

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

MU, L.; FENG, S. S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v.80, 1-3, p.129-144, 2002.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

MUNHOZ, A. C. M. **Avaliação fitoquimica e da atividade antioxidante e antimicrobiana de cascas de caule de *Synadenium grantii* Hook. f. (Euphorbiaceae).** Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, nível de mestrado. 84 f. Ponta Grossa, PR: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013

NAKAGAWA, H.; KIYOZUKA, Y.; UEMURA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; HIOKI, K.; TSUBURA, A. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 127, n. 4, p. 258-264, 2001.

NAM, J. B.; RYU, J. H.; KIM, J. W.; CHANG, I. S.; SUH, K. D. Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres**. Polymer**, v. 46, n. 21, p. 8956–8963, 2005.

NAVEENRAJ S., ANANDAN S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C,** v. 14, n. 2013, p. 53-71, 2012.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of resveratrol-loaded lipid-based nanocarriers for cutaneous administration. **Química Nova,** v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p.177-187, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NILES, R. M.; COOK, C. P.; MEADOWS, G. G.; FU, Y-M.; MCLAUGHLIN, J. L.; RANKIN, G. O. Resveratrol is rapidly metabolized in athymic (Nu/Nu) mice and does not inhibit human melanoma xenograft tumor growth. **The Journal of Nutrition,** v. 136, n. 10, p. 2542-2546, 2006.

NONOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants. i. studies on the components of ko-j o-kon. (polygonum cuspidatum sieb. et zucc.). **Yakugaku Zasshi,** v. 83, n. 1, p. 988–990, 1963.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; BALD, E.; GŁOWACKI, R. The protective effects of resveratrol against changes in blood platelet thiols induced by platinum compounds. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 55, n. 2, p. 467-476, 2004.

OLIVEIRA, J. L. ; CAMPOS, E. V. R. ; SILVA, C. M. G. ; Pasquôto, T. ; LIMA, R. ; FRACETO, L. F. . Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 422-432, 2015.

ORIQUI, L. R.; MORI, M. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. **Química Nova,** v. 36, n. 2, p. 340-347, 2013.

PAINO, I. M. M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; KANEGAE, M. P. P.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 38, n. 4, p. 543-51, 2005.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress.

Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme, v. 34, n. 6, p. 1093-1097, 2009

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PARVEEN, S.; SAHOO S. K. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. **Journal of drug targeting,** v. 16, n. 2, p. 108-123, 2008.

PATTINSON, D. I.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 439-449, 2003.

PEREIRA M. R.; CRUZ L.; RÉ M. I.; GUTERRES S. S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmacéutica Bonaerense,** v. 25, n. 2, p. 198-205, 2006.

PLAPIED, L., DUHEM, N., DES RIEUX, A., PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228–237, 2011.

PRABHU P, R.; HEGDE, K.; SHABARAYA, A.R.; RAO, M. N. A. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.5, p.114-118, 2011.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 16, p. 2371-2384, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. **Fármacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 6ª ed., 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cátion decolourisation assay. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M. ; VECCHIA, D. D.; BOHATCH. M. JR.; FARAGO, P.V.; FERNANDES, D; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. "Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers". **Materials Science and Engineering C,** v. 31, n. 5, p. 962–968, 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROBINSON, K.; MOCK, C.; LIANG, D. Pre-formulation studies of resveratrol. **Drug development and industrial pharmacy,** v. 16, n. 1, p. 1-6, 2014.

ROKHADE, A. P.; SHELKE, N. B.; PATIL, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 678–687, 2007.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova,** v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência & Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54 – 57, 2008.

ROTONDO, S.; RAJTAR, G.; MANARINI, S.; CELARDO, A.; ROTILLO, D.; DE GAETANO, G.; EVANGELISTA, V.; CERLETTI, C. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. **British journal of pharmacology,** v. 123, n. 8, p. 1691-1699, 1998.

RUAN, B. F.; LU, X.; TANG, J. F.; WEI, Y.; WANG, X. L.; ZHANG, Y. B.; WANG, L. S.; ZHU, H. L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of resveratrol derivatives possessing chalcone moiety as potential antitubulin agents. **Bioorganic & medicinal chemistry,** v. 19, n. 8, p. 2688-2695, 2011.

SAARINEN-SAVOLAINEN P.; JÄRVINEN T.; TAIPALE H.; URTTI A. Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 159, n. 1, p. 27-33, 1997.

SAEZ, A.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine,** v.3. n.1, p. 20-31, 2007.

SAITO, A.; MAIER, C. M.; NARASIMHAN, P.; NISHI, T.; SONG, Y. S.; YU, F.; LIU, J.; LEE, Y. S.; NITO, C.; KAMADA, H.; DODD, R. L.; HSIEH, L. B.; HASSID, B.; KIM, E. E.; GONZÁLEZ, M.; CHAN, P. H. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. **Molecular neurobiology**, v. 31, n. 1-3, p. 105-116, 2005.

SALMONM, S. E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do Câncer. In:_____**Fármacologia básica & clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.629-655, 1998.

SANTAMARIA, A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.),** v. 926, n. 1-12, 2012.

SATOOKA, H,.; KUBO, I. Resveratrol as a kcat type inhibitor for tyrosinase: potentiated melanogenesis inhibitor. **Bioorganic & medicinal chemistry,** v. 20, n. 2, p. 1090-1099, 2012.

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

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHNEIDER, Y.; VINCENT, F.; DURANTON, B.; BADOLO, L.; GOSSÉ, F.; BERGMANN, C.; SEILER, N.; RAUL, F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, n. 1, p. 85-91, 2000.

SCHWARZ, C., MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drugloaded solid lipid nanoparticles, **International journal of pharmaceutics,** v. 157, n. 2, p. 171–179, 1997.

SEVILLA, P.; RIVAS, J. M. GARCIA-BLANCO, F.; GARCIA-RAMOS, J. V.; SANCHEZ-CORTES, S. Identification of the anti tumoral drug emodin vinding sites in

bovine serum by spectroscopic methods, **Biochimica Biophysica Acta – Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 11, p. 1359-1369, 2007.

SHI, G.; RAO, L.; YU, H.; XIANG, H.; YANG, H.; JI, R. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 83-93, 2008.

SIEPMANN J.; PEPPAS N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA, M.; DONARD, O. F. X.; BELIN, C. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 294-301, 1996.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, n. 8, p. 449-466, 2005.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R. T., eds.; Food Phytochemicals for Cancer Prevention: Washington, 1994, p. 20.

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

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYLE, C. B. Química Orgânica. 7 ed. LTC. Rio de Janeiro, 2001.

SOPPIMATH K. S.; AMINABHAVI T. M.; KULKARNI A. R.; RUDZINSKI W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, v.46, p.S14-S18, 1997. Supplement 2.

STASSEN, S.; NIHANT, N.; MARTIN, V.; GRANDFILS, C.; JÉRÔME, R.; TEYSSIÉ, PH. Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide): 1. Physicochemical characteristics of the phase separation process. **Polymer,** n. 35, v. 4, p. 777-785, 1994.

STASZEWSKI, M.; PILOSOF, A.M.R.; JAGUS, R.J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 186-192, 2011

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phor-bol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosp-horylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.

SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhi-bits ciclooxygenase-2 transcription and activity in phor-bol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 21875-21882, 1998.

SULKOWSKA, A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin, **Journal of Molecular Structure**, v. 614, n. 1-3, p. 227–232, 2002.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage". **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2491-2507, 2010.

TAK, P. P.; ZVAIFLER, N. J.; GREEN, D. R.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. **Immunology today,** v. 21, n. 2, p. 78-82, 2000.

TAKAOKA M. The phenolic substances of white hellebore (Veratrum Grandiflorum Loes. Fill). V. Synthesis of Resveratrol (3, 5, 4-Trioxystilbene) and its Derivatives. **Nippon Kagaku Kaishi,** v. 61, n. 10, p. 1067–1069, 1940.

TANTRA, R.; TOMPKINS, J.;, QUINCEY, P. Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces,** v. 75, n. 1, p. 275-281, 2009.

TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI J. R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 2. p. 107-116, 2009.

THOTE, A. J.; CHAPPELL, J. T. JR.; GUPTA, R. B.; KUMAR, R. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. **Drug development and industrial pharmacy,** 1v. 31, n. 1, p. 43-57, 2005.

TROLLOPE, L.; CRUICKSHANK, D. L.; NOONAN, T.; BOURNE, S. A.; SORRENTI, M.; CATENACCI, L.; CAIRA, M. R. Inclusion of trans-resveratrol in methylated cyclodextrins: synthesis and solid-state structures. **Beilstein journal of organic chemistry,** v. 10, n.1, p. 3136-3151, 2014.

VALEUR, B.; BROCHON, J. C. (Org.). On the origin of terms fluorescence, phosphorescence and luminescence (2001). _____In: **New trends in fluorescence spectroscopy:** application to chemical and life sciences. Berlin: Springer, 2001, p. 3-6.

VASCONCELOS, T., SARMENTO, B., COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs**. Drug discovery today**, v. 12, n. 23-24, p.1068-1075, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E. JR.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition,** v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Y.; CATANA, F. YANG, Y.; RODERICK, R.; BREEMEN, R.B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine, **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** n. 50, v. 3, p. 431-435, 2002.

WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 194, n. 1, p. 91-102, 2000.

WEI, W; WANG L. Y.; YUAN, L.; YANG, X. D.; SU, Z. G.; MA, G. H. Bioprocess of uniform-sized crosslinked chitosan microspheres in rats following oral administration.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.69, n. 3, p.878–886, 2008.

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Molecular nutrition & food research,** v. 49, n. 5, p. 472-481, 2005.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 243S-255S, 2005.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 29, n. 5, p. 403-409, 2000.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

XIAO, J. B.; CHEN, X. Q., JIANG, X. Y., HILCZER, M., TACHIYA, M. Probing the Interaction of Trans-resveratrol with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study with Tachiya Model. **Journal of fluorescence,** v. 18, n. 3-4, p. 671-678, 2008.

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C**.** Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: a new tool for large scale production**. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.,** v. 85, n. 3 Pt A, p. 398-405, 2013.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; LIN, C. W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Research,** v. 37, n. 5, p. 509-514, 2003.

ZGLICZYNSKI, J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKI, J.; OSTROWSKI, W. Chloramines as intermediaites of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase, **Biochimica et biophysica acta,** v. 235, n. 3, p. 419-424, 1971.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical pharmacology and therapeutics,** v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.

ZINI, R.; MORIN, C.; BERTELLI, A.; BERTELLI, A. A.; TILLEMENT, J. P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 25, n. 2-3, p. 87-97, 1999.

ZINI, R.; MORIN, C.; BERTELLI, A.; BERTELLI, A. A.; TILLEMENT, J. P. Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. **Life Sciences,** v. 71, n. 26, p. 3091-3108, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. _____In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Fármacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 577-614.