

SUELEN DAIANE LADWIG

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA
DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CONTENDO DISSELENETO DE
DIFENILA.**

**GUARAPUAVA
2016**

SUELEN DAIANE LADWIG

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA
DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CONTENDO DISSELENETO DE
DIFENILA.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

**GUARAPUAVA
2016**

TERMO DE APROVAÇÃO

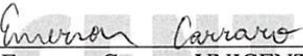
SUELEN DAIANE LADWIG

Obtenção, Caracterização físico-química e avaliação citotóxica de nanopartículas de Albumina contendo Disseleneto de Difênila

Dissertação aprovada em 30/06/2016 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:



Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, UNICENTRO
Presidente



Prof. Dr. Emerson Carraro, UNICENTRO
Membro



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña, UNIOESTE
Membro

Guarapuava - PR
2016

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

LADWIG, Suelen Daiane.

L157o Obtenção, caracterização físico – química e avaliação citotóxica de nanopartículas de albumina contendo disseleneto de difenila / Suelen Daiane Ladwig. – Guarapuava, PR : [s.n.], 2016.
67f.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica. Área de concentração Fármacos Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR.

1. Ciências Farmacêuticas – dissertação. 2. Nanopartículas poliméricas.
3. Albumina sérica bovina. 4. Citotoxicidade. I. Khalil, Najeh Maissar.
II. UNICENTRO. III. UEPG. IV. Título.

CDD 615

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cilly e Geraldo Ladwig com gratidão pelo amor incondicional, ao apoio em todas as minhas decisões. Por me sustentarem sempre em oração e pelas palavras de ânimo.

“Honra a teu pai e a tua mãe, que é o primeiro mandamento com promessa.”

(Efésios 6:2)

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor da vida, pela graça e bondade que tem me guiado em todos meus dias, pela força em cada momento, pela capacidade em cada dificuldade e a vitória de ter chegado até aqui.

Aos meus pais que não mediram esforços, pelas orações, pelo carinho, dedicação e palavras de conforto em dias difíceis. Juntamente com demais familiares que deram todo apoio e fazem parte da minha história, nada seria possível sem vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil e à Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pela confiança e conhecimentos fornecidos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À Soraia Zaioncz pela amizade e colaboração com o projeto.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos do Laboratório de química fitobiomassa – UFPR pela disponibilização do equipamento de espectroscopia na região do Infravermelho.

Ao Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin do Grupo de Química de materiais – UFPR por disponibilizar o difratômetro de raios X.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Policiano Almeida por permitir a utilização do Laboratório de Pesquisa em Ciências Interfaciais - UNICENTRO, e ao Matheus Felipe Viante que auxiliou nas análises.

Ao Prof. Dr. Ricardo Yoshimitsu Miyahara do Departamento de Física – UNICENTRO, por permitir a utilização do equipamento de calorimetria exploratória diferencial.

Ao CLabMu – UEPG pela realização das análises de microscopia de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).

À Emilli, Osmar, Dyenifer, Michel, Rossana e aos demais colegas do Laboratório de Nanotecnologia farmacêutica por toda a ajuda, compreensão, amizade e aprendizado transmitidos.

À minha grande amiga Patrícia de Campos pelo companheirismo desde a graduação que se estendeu ao mestrado, sua amizade foi muito importante pra mim.

Aos meus amigos da Rede Universitária, por fazerem os meus dias mais alegres, fortalecendo a minha fé.

Aos amigos que mesmo distantes foram tão importantes em cada momento, participando desse desafio, que compartilharam alegrias, tristezas e esperanças, tornando-se essenciais nessa caminhada.

Aos que não me referi, mas que de alguma forma participaram e me auxiliaram neste período.

Ao Programa e ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À Fundação Araucária e CAPES pelo auxílio financeiro neste estudo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

RESUMO

O disseleneto de difenila (DPDS) apresenta diversas propriedades farmacológicas, porém as suas características físico-químicas e sua toxicidade limitam o seu uso. O presente trabalho consistiu na obtenção, caracterização físico-química e avaliação da atividade citotóxica de nanopartículas poliméricas de albumina sérica bovina (BSA) contendo DPDS por meio da técnica de dessolvatação. A porcentagem de eficiência de encapsulação das nanopartículas foi de 65%, com um diâmetro médio de 200 ± 20 nm, forma esférica e superfície lisa e potencial zeta obtido de -34 ± 3 mV. A caracterização físico-química demonstrou que o processo de nanoencapsulação resultou em um sistema amorfo. Através do estudo de estabilidade foi possível determinar que a melhor condição de armazenamento das nanopartículas foi sob refrigeração a 4°C, temperatura na qual as nanopartículas mantiveram-se estáveis pelo período avaliado de 12 semanas, não sendo observados aumento de tamanho e tendência à agregação. A partir do ensaio de citotoxicidade frente à hemácias, foi possível observar um efeito protetor das nanopartículas em relação à toxicidade do DPDS livre. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o sistema nanoestruturado contendo DPDS foi obtido com sucesso e apresenta grande potencial para aplicação biológica.

Palavras-chave: nanopartículas poliméricas, disseleneto de difenila, albumina sérica bovina, citotoxicidade.

ABSTRACT

Diphenyl diselenide (DPDS) has several pharmacological properties but their physicochemical properties and toxicity limit their use. This work consisted of the obtention, physico-chemical characterization and cytotoxic activity of polymeric nanoparticles bovine serum albumin (BSA) containing DPDS obtained by desolvation method. The percentage of encapsulation of the nanoparticles was 65%, with an average diameter of 200 ± 20 nm, spherical shape and smooth surface and zeta potential of -34 ± 3 mV obtained. The physicochemical characterization showed that Nanoencapsulation process resulted in an amorphous system. Through the stability study it was determined that the best nanoparticles storage condition was under refrigeration at 4°C , temperature at which the nanoparticles were stable at assessed 12 weeks with no noticeable increase in size and tend to aggregate. From the front cytotoxicity assay to red blood cells, we observed a protective effect of nanoparticles in relation to the toxicity of free DPDS. Based on the results, it was concluded that the nanostructured system containing DPDS was obtained successfully and has great potential for biological application.

Keywords: polymeric nanoparticles, diphenyl diselenide, bovine serum albumin, cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do DPDS (PhSe) ₂	16
Figura 2. Representação proteica da albumina sérica bovina (BSA)	22
Figura 3. Esquema do processo da obtenção de nanopartículas de albumina pelo método de dessolvatação.....	26
Figura 4. Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de BSA contendo DPDS. Diâmetro médio de 206,5 nm e índice de polidispersão de 0,159, perfil bimodal, n=3.	35
Figura 5. Curva analítica do DPDS solubilizado em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol:água acidificada (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/min; detecção no comprimento de onda de 240nm, volume de injeção 40µL. Área x Concentração (µg/mL).....	37
Figura 6. Cromatograma de uma amostra de DPDS (10 µg/mL) solubilizada em metanol:água (50:50 v/v); fase móvel metanol:água acidificada (90:10 v/v), fluxo de 1,0 mL/min; detecção no comprimento de onda de 240nm, volume de injeção 40 µL. Absorbância (AU) em função do tempo (min).	37
Figura 7. Cromatograma de uma amostra de sobrenadante de nanopartículas brancas, mostrando a ausência de formação de picos.	38
Figura 8. Espectros de FTIR: a) DPDS, b) Nanopartícula contendo DPDS, c) Nanopartícula vazia e d) BSA.	41
Figura 9. Difrátogramas obtidos por DRX.....	42
Figura 10. A) Curva de termogravimetria para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS. B) Curva da derivada da TG para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS.	45
Figura 11. Curva de Calorimetria exploratória diferencial para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS.	46
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de BSA contendo DPDS.	48
Figura 13. Diâmetro médio das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.	49
Figura 14. Índice de polidispersão das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.	50

Figura 15. Potencial zeta das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.....	51
Figura 16. Porcentagem de hemólise para água, tampão PBS, etanol, nanopartículas brancas, concentrações de DPDS livre e nanopartículas de BSA contendo DPDS em A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h e em D) 96 h.....	53
Figura 17. Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para a leitura dos sobrenadantes resultantes da centrifugação da suspensão de hemácias.	54

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas de BSA contendo DPDS, n=10, expressos em média \pm DP.....	33
Tabela 2. Potencial zeta das nanopartículas de BSA na ausência e presença de DPDS, n=3, expressos em média \pm DP.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catequina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DP	Desvio padrão
DPDS	Disseleneto de difenila
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Curva termogravimétrica derivada
ECAT	Epicatequina
EE%	Eficiência de encapsulação
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com fonte emissão por efeito de campo
mV	Milivolts
NaOH	Hidróxido de sódio
NPS	Nanopartículas
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PDA	<i>Photodiode Array</i>
pHPMA	poli(N- 2-hidroxipropil metacrilamida)
pI	Ponto isoelétrico
PLA	Poli(ácido-lático)
PLGA	Poli(D,Lácido-lático-co-glicólico)
r	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Se	Selênio
TGA	Termogravimetria

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
1.1. DISSELENETO DE DIFENILA (DPDS).....	16
1.2. NANOTECNOLOGIA	18
1.2.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	20
1.3. ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)	21
1.4. PROCESSO DE DESSOLVATAÇÃO	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção de nanopartículas de BSA contendo disseleneto de difenila (DPDS).	25
3.2 Caracterização físico-química das nanopartículas.....	26
3.2.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas	26
3.2.2 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do DPDS em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	27
3.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação.....	28
3.2.4 Potencial zeta	28
3.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	29
3.2.6 Difração de Raios X (DRX)	29
3.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA)	29
3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	30
3.3 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo DPDS.....	30
3.4 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de BSA contendo DPDS sobre hemácias.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Obtenção de nanopartículas de Albumina contendo Disseleneto de difenila (DPDS).....	33
4.2 Caracterização físico-química das nanopartículas.....	34

4.2.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas	34
4.2.2 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do DPDS por CLAE	36
4.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação (EE%)	38
4.2.4 Potencial zeta	39
4.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	40
4.2.6 Difração de Raios X (DRX)	41
4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA)	43
4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	47
4.3 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo DPDS	48
4.4 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de BSA contendo DPDS sobre hemácias	52
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. ANEXOS	63
7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos	63

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

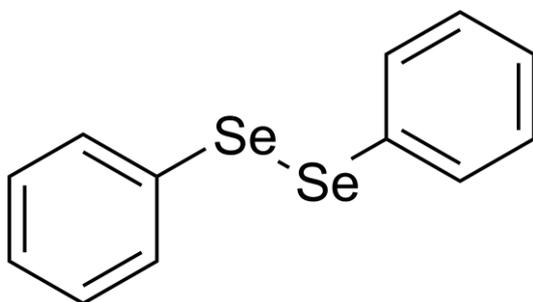
1.1. DISSELENETO DE DIFENILA (DPDS)

O selênio (Se) foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. É um elemento essencial tanto para seres humanos como para animais, sendo adquirido através da ingestão de alimentos que contenham selenocisteína e selenometionina (ROSA *et al.*, 2007^a).

Os derivados sintéticos produzidos a partir de compostos de selênio apresentam moléculas com potencial farmacológico, com atividades antioxidantes, imunomoduladores, neuroprotetores, antitumoral, anti-infeccioso, além da capacidade de inibir enzimas e induzir citocinas (ROSA *et al.*, 2007^a; NOGUEIRA *et al.*, 2004; JUNG & SEO, 2010; GABRYEL & MALECKI, 2006).

O DPDS (PhSe)₂ (Figura 1) é um composto orgânico resultante da síntese de compostos de selênio que apresenta atividades biológicas e farmacológicas interessantes, porém, com mecanismos de ação pouco esclarecidos.

Figura 1. Estrutura química do DPDS (PhSe)₂.



Têm-se demonstrado que os compostos como disselenetos de alquila e arila podem ser considerados potenciais antioxidantes (POSSER *et al.*, 2006). Em um estudo, realizado em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês), pôde-se observar o mesmo efeito antioxidante do DPDS em proteger as células contra lesões oxidativas induzidas por peróxido de hidrogênio (ROSA *et al.*, 2007^b).

Existem relatos na literatura da atividade fungistática *in vitro* e atividade fungicida contra leveduras, fungos filamentosos e *Pythium oomiceto insidiosum* (LORETO *et*

al., 2012; LORETO *et al.*, 2011; ROSSETI *et al.*, 2011; DENARDI *et al.*, 2013). Recentemente, demonstrou-se a capacidade do composto em inibir o crescimento e formação do tubo germinativo de *C. albicans* (ROSSETI *et al.*, 2011) que se constitui uma etapa essencial de virulência desta levedura em infecções sistêmicas da mucosa em modelos animais. Bem como, a inibição da formação de biofilme por aumento na permeabilidade da membrana e produção de espécies reativas de oxigênio (ROSSETI, ROCHA & COSTA, 2015). Além disso, outros estudos mostraram que o DPDS inibiu o crescimento *in vitro* de *C. glabrata* (DENARDI *et al.*, 2013).

Uma toxicidade pequena foi verificada quando administrada em baixas doses em ratos como 10 (mg / kg), assegurando a atividade anti-inflamatória (NOGUEIRA *et al.*, 2003^a; ROSA *et al.*, 2007^a). Além disso, a administração sistêmica facilita a formação de memória de reconhecimento de objetos (ROSA *et al.*, 2003). Existem ainda estudos que relatam um efeito neuroprotetor *in vitro* em modelos de isquemia cerebral (GHISLENI *et al.*, 2003).

Entretanto, a exposição aguda e crônica ao DPDS aumenta o nível de selênio total no cérebro de ratos, demonstrando que o DPDS atravessa a barreira hematoencefálica. Isso ocorre devido à sua alta lipofilicidade e falta de eliminação pelo transportador de glicoproteína (BARBOSA *et al.*, 1998; PRIGOL *et al.*, 2012; PRIGOL *et al.*, 2013). Em camundongos a exposição crônica a doses elevadas de DPDS (62,46 mg/kg) afeta o sistema nervoso central, provocando convulsões e diminuindo as transmissões glutamínérgicas (NOGUEIRA *et al.*, 2004^b; ROSA *et al.*, 2007^a). O cérebro é, portanto, um dos órgãos alvo para o DPDS, pois este atua em várias proteínas e pode induzir a neurotoxicidade. A elevada atividade metabólica, conteúdo lipídico e baixa capacidade de reparo do DNA podem estar relacionadas ao mais alto nível de genotoxicidade observado no cérebro (ROSA *et al.*, 2007^a). O DPDS apresenta também outros efeitos tóxicos, como a inibição da enzima aminolevulinato desidratase a partir de tecidos e órgãos tais como fígado, rins, cérebro de ratos adultos e eritrócitos humanos (MACIEL *et al.*, 2000; MEOTTI *et al.*, 2003).

Esses efeitos, aparentemente contraditórios, podem ser explicados baseando-se no fato que os compostos de selênio são considerados “compostos Janus”, ou seja,

produtos com dupla face, pois seu comportamento depende da concentração utilizada. Em doses baixas, obtêm-se efeitos benéficos, enquanto que em doses mais altas pode-se desenvolver uma resposta tóxica. Porém, a concentração limite para estabelecer essas atividades ainda não foi devidamente esclarecida (ROSA *et al.*, 2007^b).

O DPDS é um composto altamente lipofílico que possui baixa solubilidade em água, em torno de 0,98 μM (PRIGOL *et al.*, 2013) e altos valores de coeficiente de distribuição, bem como alta ligação a proteínas plasmáticas o que explica a sua baixa biodisponibilidade na corrente sanguínea (GIORDANI *et al.*, 2014). Deste modo, uma alternativa para solucionar estes problemas encontra-se na sua formulação sob a forma de nanopartículas.

1.2. NANOTECNOLOGIA

O advento da nanotecnologia trouxe a promessa de revolucionar muitos campos da ciência, trazendo a possibilidade de manipular diferentes materiais em nanoescala (FONSECA *et al.*, 2014). O conceito introduzido por Richard Feynman em 1959 (FEYNMAN, 1960) foi o impulsionador da história da nanotecnologia que hoje traz avanços em diversas áreas, tais como: comunicações, engenharia, química, física, robótica, biologia e medicina, dentre muitas outras (SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

Nas últimas décadas, com o crescente interesse e os avanços no campo da nanotecnologia, tem havido um aumento progressivo no número de agentes terapêuticos à base de nanopartículas aprovados para uso clínico (FONSECA *et al.*, 2014). As nanopartículas são projetadas para entrega de drogas específicas, o uso de transportadores melhora a distribuição da droga, tendo como alvo moléculas ativas para tecidos doentes e ao mesmo tempo protegendo o tecido saudável (BOISSEAU & LOUBATONB, 2011).

Desde que emergiu no início de 1970, sistemas de liberação controlado de fármacos, destinados a entregar drogas em taxas mínimas e períodos pré-definidos de tempo, têm atraído cada vez mais atenção (QIU & PARK, 2012; SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

A farmacocinética e a farmacodinâmica de um fármaco são altamente dependentes de suas características físico-químicas, que por sua vez, são

influenciadas pelo tipo de formulação utilizada para a entrega. Compostos nanoparticulados podem modular e melhorar o desempenho de muitas drogas em medidas não realizáveis pela formulação convencional (ANDRADE *et al.*, 2013). Uma das principais ferramentas da nanotecnologia, no que se refere ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, é a oportunidade de converter as drogas existentes que apresentam pouca ou nenhuma solubilidade em água e taxa de dissolução, em dispersões prontamente solúveis ao transformá-las em nanopartículas (KUMAR, 2010).

A redução do tamanho de partícula de drogas para a escala nanométrica, aumenta a sua área superficial e, por consequência, a sua capacidade de ser absorvida (KUMAR, 2010). Muitas enzimas, moléculas de sinalização e receptores apresentam tamanho nanométrico, estando as proteínas na faixa de 3 a 90 nm (NISHIYAMA, 2007; WANG *et al.*, 2014). A nanotecnologia abre um vasto campo de pesquisa e aplicação, visto que interações entre agrupamentos moleculares artificiais ou nanodispositivos e biomoléculas podem ser compreendidas, tanto no meio extracelular quanto no interior das células humanas (BOISSEAU & LOUBATONB, 2011), tendo um futuro promissor no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, de prevenção e diagnóstico (ZHANG *et al.*, 2008).

A nanotecnologia permitiu um novo olhar sobre fármacos com uma janela terapêutica estreita ou farmacocinética pobre, até então considerados como última escolha, dando um passo adiante como importante alternativa na redução da toxicidade ao longo do tratamento existente, oferecendo, assim, uma maior adequação e expectativa de vida para o paciente (FONSECA *et al.*, 2014).

As vantagens de se veicular fármacos baseados em nanotecnologia segundo Andrade *et al.*, (2013) incluem:

- (i) aumento da sua solubilidade;
- (ii) proteção contra a degradação;
- (iii) aumento da sua absorção epitelial e aumento do seu tempo de circulação no sangue;
- (iv) liberação do fármaco alvo para células, tecidos e órgãos específicos de um modo controlado, como uma resposta a uma estimulação específica;
- (v) melhora da sua absorção pelas células.

Além disso, a liberação controlada pode aumentar significativamente a eficácia terapêutica dos fármacos, reduzindo seus efeitos colaterais sistêmicos e melhorando

a adesão do paciente ao regime através da redução da frequência de dosagem e administração (LEE & YEO, 2015). Compostos naturais e sintéticos podem ser carregados em nanopartículas, melhorando assim, a sua solubilidade em água, estabilidade, biodisponibilidade, tempo de circulação e especificidade, alcançando os tecidos doentes e afetando minimamente as células e tecidos saudáveis (CHENG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

Na indústria farmacêutica, os principais sistemas nanoestruturados utilizados para a encapsulação de princípios ativos são os lipossomas, as nanopartículas poliméricas, as ciclodextrinas, as nanopartículas lipídicas, os dendrímeros e os nanotubos de carbono (ALVES, MARTINS & SANTANA, 2008).

1.2.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas apresentam como vantagem sua maior estabilidade em fluidos biológicos, quando comparadas com outros veículos coloidais. Além disso, a sua natureza polimérica oferece uma liberação controlada do fármaco de forma sustentada por um maior período de tempo (RONEY *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2014).

As nanopartículas poliméricas estão compreendidas em uma faixa de tamanho de 1 a 1000 nm. Estas nanopartículas podem ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos (WILSON *et al.*, 2014). Exemplos de polímeros naturais incluem: albumina, dextrano, hialuronato e quitosana. Dentre os polímeros sintéticos utilizados no encapsulamento de fármacos, podemos citar o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(cianoacrilato) e poli(N-2-hidroxipropil metacrilamida) (pHPMA) (MORA HUERTAS *et al.*, 2010).

Os polímeros utilizados na entrega de fármacos devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Isso implica na capacidade do carreador agir com uma resposta apropriada em sua aplicação específica, sem a formação de produtos de degradação tóxicos e, portanto, ser facilmente eliminado do organismo após o transporte da droga até o alvo (WILLIAMS, 1999; SAFARI & ZARNEGAR, 2014).

As nanopartículas poliméricas podem ser obtidas a partir de diversas metodologias, entre elas a nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsão e coacervação/dessolvatação (MORA HUERTAS *et al.*, 2010; LEE & YEO, 2015). De

acordo com a metodologia utilizada para a produção das nanopartículas, dois principais sistemas distintos podem ser gerados, resultando em nanocápsulas ou nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. No sistema de nanocápsulas, há um núcleo oleoso rodeado por uma membrana polimérica, o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Enquanto que no sistema de nanoesferas o fármaco é aprisionado na matriz ou uniformemente adsorvido à superfície da estrutura polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOSNIK *et al.*, 2010).

Nanopartículas produzidas a partir de polímeros naturais tais como proteínas, têm recebido grande interesse como carreadores de fármacos hidrofóbicos (ROHIWALA *et al.*, 2015). Além disso, tem havido uma preferência crescente por proteínas, tais como albumina e gelatina, para a preparação de nanopartículas (OFOKANSI *et al.*, 2010), uma vez que não apresentam toxicidade, são biodegradáveis, fáceis de preparar e sua distribuição de tamanho pode ser facilmente monitorada. As proteínas possuem ainda grupamentos funcionais, como amino, carboxílico e hidroxila, os quais facilitam o processo de interação entre a droga e a matriz polimérica da nanopartícula (WEBER *et al.*, 2000; OZGURA *et al.*, 2012).

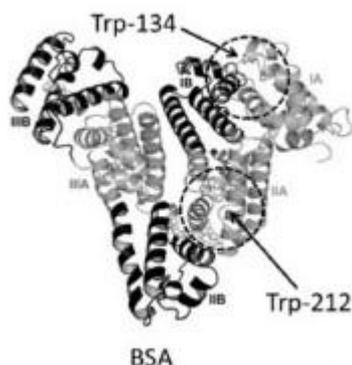
1.3. ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

A albumina sérica é a proteína mais abundante no plasma de mamíferos. Sendo sintetizada no fígado e exportada como uma proteína não glicosilada no plasma, onde atinge uma elevada concentração contribuindo para a pressão osmótica (MAJOREKA *et al.*, 2012). A albumina é uma proteína multifuncional com uma grande capacidade de ligação, tendo um grande potencial como nanocarreador em sistemas de entrega de drogas. Muitas moléculas orgânicas e inorgânicas podem interagir facilmente com nanopartículas de albumina, devido aos seus grupos funcionais adequados na superfície da partícula (OZGURA *et al.*, 2012).

A albumina de soro bovino (BSA) (Figura 2) pode ser identificada, segundo Peters, (1985) como uma grande proteína globular (66 KDa), constituída por uma única cadeia de 583 resíduos de aminoácidos emparelhados por 17 pontes dissulfeto. BSA é formada a partir de três domínios I, II e III, divididos em dois sub-

domínios (A e B), contendo dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212, localizados respectivamente em domínios I e II. O resíduo Trp-212 é rodeado por um ambiente hidrofóbico dentro da proteína, enquanto o resíduo Trp-134 está localizado num ambiente hidrofílico, perto da superfície da proteína (TAYEH *et al.*, 2009).

Figura 2. Representação proteica da albumina sérica bovina (BSA)



A flexibilidade na conformação da BSA permite que seja ligada a compostos com diferentes estruturas. Os conjugados do soro de albumina têm propriedades úteis; eles aumentam a solubilidade de fármacos no plasma e desempenham uma função importante na modulação da administração de fármacos (KRATZ, 2008). As nanopartículas de albumina desempenham um papel essencial na entrega de drogas hidrofóbicas para o tecido alvo através de ligação reversível ou não covalente que permite que a droga seja transportada e prontamente entregue na superfície da célula (ROHIWALA *et al.*, 2015).

Nanopartículas à base de albumina representam uma estratégia atraente, uma vez que quantidade significativa de fármaco pode ser incorporada na matriz da partícula por efeito dos diferentes sítios de ligação presentes na molécula de albumina (PATIL, 2003; ELZOGHBY *et al.*, 2012). Devido à sua carga superficial, os fármacos podem estar adsorvidos fisicamente sobre a superfície da proteína ou ligar-se covalentemente à matriz (YEDOMON *et al.*, 2013).

BSA tem sido amplamente estudada e aplicada devido à sua ampla disponibilidade, baixo custo, boa estabilidade estrutural, propriedades de ligação com ligantes incomuns, biodegradabilidade e não imunogenicidade (SITTA *et al.*, 2014). Além de manter certas vantagens, como maior estabilidade tanto durante o armazenamento *in vitro* quanto *in vivo*, é atóxica e facilmente dimensionável durante a fabricação das nanopartículas em relação a outros sistemas de distribuição de

drogas (LANGER *et al.*, 2003). A BSA pode ser facilmente purificada e solubilizada em água, permitindo sua entrega por diversas vias, incluindo a via intravenosa, sendo assim, é considerada um excelente candidato para a preparação de nanopartículas (ELZOGHBY *et al.*, 2012).

As nanopartículas de albumina são preparadas geralmente por duas principais metodologias: emulsão e dessolvatação (WILSON *et al.*, 2014). Este último, apresenta-se vantajoso para a produção de nanopartículas de BSA uma vez que não exige solventes orgânicos para a remoção de resíduos e tensoativos e, por se tratar de uma reação a temperatura ambiente, é compatível com compostos sensíveis ao calor (ROHIWAL *et al.*, 2015).

1.4. PROCESSO DE DESSOLVATAÇÃO

O processo de dessolvatação da albumina com solventes orgânicos seguido pela reticulação é um método comumente utilizado para a produção de nanopartículas de BSA.

O princípio da dessolvatação, segundo Paik e colaboradores (2013), é baseado em mudanças na solubilidade da BSA em solução. O processo envolve a adição de um solvente miscível em água para a suspensão de BSA, como por exemplo o etanol. A solubilidade de BSA em água é elevada, ao passo que a solubilidade em etanol é relativamente baixa. Como resultado, os agregados insolúveis de moléculas de BSA tornam a suspensão turva. A turbidez é relacionada com o número, tamanho e propriedades das nanopartículas de BSA em suspensão (PEREYRA, SCHMIDT & WICKER, 1997).

A preparação de nanopartículas de albumina por dessolvatação envolve um procedimento em três passos: (1) um sistema disperso instável (coacervado) é obtido por adição de um agente de dessolvatação da albumina (normalmente etanol ou acetona) a uma solução aquosa da proteína; (2) os coacervados são enrijecidos (estabilizados) através da formação de ligações cruzadas; (3) as nanopartículas resultantes são purificadas e eventualmente liofilizadas ou secas por pulverização (YEDOMON *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade citotóxica *in vitro* de nanopartículas de albumina (BSA) contendo disseleneto de difenila (DPDS).

2.2. Objetivos específicos

- Obtenção de nanopartículas de BSA contendo disseleneto de difenila pelo método de dessolvatação;
- Determinação da eficiência de encapsulação do disseleneto de difenila nas nanopartículas;
- Caracterização das nanopartículas de acordo com os parâmetros físico-químicos (morfologia, diâmetro médio, índice de polidispersão, interação polímero-fármaco);
- Avaliação da estabilidade das nanopartículas de BSA contendo DPDS;
- Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de BSA contendo DPDS sobre eritrócitos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de nanopartículas de BSA contendo disseleneto de difenila (DPDS).

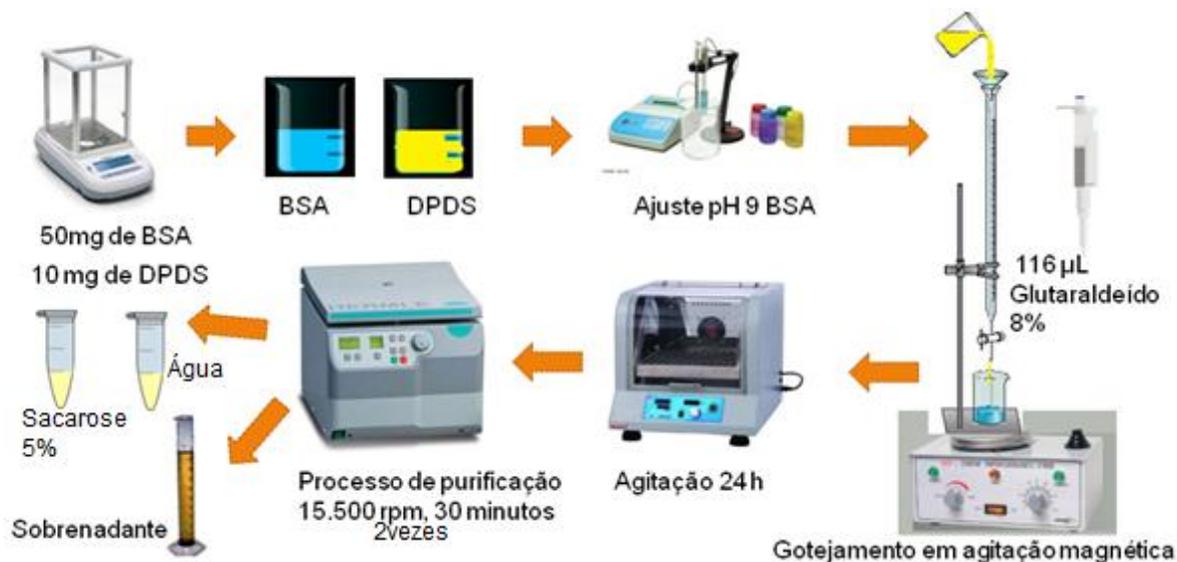
As nanopartículas de BSA contendo DPDS foram obtidas pela técnica de dessolvatação (LANGER *et al.*, 2003; WEBER *et al.*, 2000; Figura 3). Onde, 50 mg de BSA - Sigma-Aldrich® foram pesados (Balança analítica Bel Engineering - M214A) e dissolvidos em 2 mL de água ultrapura. O pH foi então ajustado para 9,0 a partir de uma solução de NaOH 0,1 M (pHmetro Max Labor - mPA210). Em seguida, 10 mg de DPDS - Sigma-Aldrich® foram pesadas e dissolvidas em 8 mL de etanol. A solução de DPDS foi adicionada gota a gota à solução aquosa de BSA com o auxílio de uma bureta para o controle do gotejamento, sob agitação magnética (Biomixer, 78 HW-I), até que a solução tornou-se turva.

Após o processo de dessolvatação, 116 µL de solução aquosa de glutaraldeído (8%) foram adicionados para induzir a reticulação das cadeias de proteína. O processo de reticulação foi realizado sob constante agitação em Shaker – (Químis®); a 200 rpm, por um período de 24 h, à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, o disseleneto de difenila não encapsulado, presente no sobrenadante foi retirado da dispersão de nanopartículas por meio de dois processos de centrifugação (15.500 rpm, 30 min em Microcentrífuga refrigerada CT-15000R Cientec®).

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

Também foram obtidos lotes nas quais as nanopartículas foram ressuspensas em 200 µL de solução com crioprotetor sacarose 5%, sendo congeladas e liofilizadas, para posterior caracterização como no caso do FTIR, DRX e DSC, para os demais ensaios utilizou-se as nanopartículas em solução aquosa.

Figura 3. Esquema do processo da obtenção de nanopartículas de albumina pelo método de dessolvatação.



3.2 Caracterização físico-química das nanopartículas

3.2.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas

As análises do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas obtidas foram realizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida por *Dynamic Light Scattering*. Este método baseia-se na dispersão da luz provocada pelo movimento Browniano das partículas, possibilitando a determinação do raio hidrodinâmico das mesmas (GAUMET *et al.*, 2008). As suspensões de nanopartículas de DPDS foram diluídas em 10 µL de água purificada (1:20 V/V) e transferidas para uma cubeta, a qual foi colocada na câmara de análise, de forma que o feixe de luz atravessasse toda a extensão da dispersão. Para isso, foi utilizado um feixe de luz laser He-Ne de 10 mV, com comprimento de onda de 659 nm, em ângulo de espalhamento de 90°. A luz espalhada é detectada por uma célula fotomultiplicadora, que a transforma em sinal elétrico, o qual é enviado para um correlator, que processa os dados. Esses resultados foram processados a partir de um software que forneceu os valores de diâmetros médios das partículas, índice de polidispersão e os respectivos desvios padrão e coeficientes de variabilidade.

Para cada amostra foram avaliadas 10 determinações de diâmetro e índice de polidispersidade, calculando-se a média e os respectivos desvios padrão e coeficientes de variação.

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

A quantificação do DPDS por CLAE, seguiu a metodologia previamente determinada por Antunes Junior *et al.*, (2015). Em uma coluna C18 (125 mm X 4mm) 5 μ m, onde a fase móvel consistiu em metanol/ água acidificada 0.5% (90:10, v/v), com fluxo isocrático de 1,0 mL/min, volume de injeção de 40 μ L, temperatura da coluna e da amostra de 25°C e o detector PDA definido com comprimento de onda de 240 nm. Com tempo de corrida de 5 minutos e o tempo de retenção do DPDS em 3,7 minutos.

Inicialmente foi determinada a linearidade, conforme o preconizado pela ANVISA (2013). Para isso, foram analisadas triplicatas de 7 concentrações de DPDS (10, 20, 30, 40, 50, 60, e 80 μ g/mL), preparadas a partir de uma solução mãe, com concentração de 1 mg/mL em metanol/água (50:50 v/v). Assim, a linearidade do método foi determinada com base no cálculo de regressão linear, empregando mínimos quadrados, onde os valores correspondentes da área sob a curva foram utilizados para o cálculo da equação da reta e do coeficiente de correlação (r), sendo ideal o mais próximo de $r = 1$.

Também foi realizado o teste de especificidade, que é determinado como uma característica que o método analítico possui em não permitir que componentes da formulação interfiram na quantificação do analito. Dessa maneira, a especificidade foi avaliada com os possíveis interferentes, por meio da comparação dos cromatogramas do sobrenadante das nanopartículas contendo DPDS e do sobrenadante das nanopartículas brancas. A análise buscou avaliar a ocorrência de sobreposição de picos que interferissem na quantificação do DPDS.

3.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação (EE%) foi realizada pelo método indireto, o qual quantifica quanto há de DPDS no sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação/lavagem, pelo método CLAE descrito anteriormente, com limite de detecção de 0,219 ug/ml e quantificação de 0,666 ug/ml.

Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e diluída (1:10), em triplicata, em metanol:água acidificada (90:10, V/V) e analisadas. A concentração foi determinada a partir do cálculo feito por meio da equação da reta fornecida pela curva analítica.

Após as análises, a EE% foi determinada pela seguinte equação:

$$EE\% = [(DPDS\ inicial - DPDS\ livre) / DPDS\ inicial] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

DPDS inicial, concentração de DPDS inicial na formulação;

DPDS livre, concentração de DPDS no sobrenadante;

Os resultados da EE% foram expressos como média e desvio padrão, considerando n=5 amostras.

3.2.4 Potencial zeta

As suspensões de nanopartículas foram diluídas em 10 µL de água purificada (1:20 V/V) e acondicionadas em uma célula eletroforética a 25°C, por meio de um equipamento ZetaSizer (ZS - Malvern®); onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potenciais foram calculados como a média e DP dos valores da mobilidade eletroforética e as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em equipamento Varion 660 - IR. Amostras da droga livre, nanopartículas contendo DPDS e nanopartículas brancas foram maceradas com brometo de potássio (KBr) e prensadas por meio da compressão em prensa hidráulica para a obtenção de pastilhas homogêneas. As análises foram realizadas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com um total de 64 scans.

3.2.6 Difração de Raios X (DRX)

Foram realizadas análises de DRX das amostras de nanopartículas contendo DPDS, nanopartículas brancas e da droga na sua forma livre. A análise foi realizada em difratômetro de Raios X Shimadzu XRD-6000, com radiação Cu K(alfa) e operando com voltagem 40 kV, corrente de 30 mA e passo de 0,02° à temperatura ambiente, no intervalo de 3° a 60°.

3.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA)

As amostras foram analisadas em calorímetro (TA Instruments®, Mod. SDT Q600). As amostras foram pesadas em cadinho de alumina (10 mg), seladas e submetidas a aquecimento sob atmosfera de nitrogênio, na faixa de 30 a 450 °C, razão de aquecimento de 10°C/min e vazão de gás de arraste de 100mL/min. A célula de DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

As análises da morfologia das nanopartículas contendo DPDS foram realizadas a partir de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), utilizando 15.0 kV. As suspensões de nanopartículas foram diluídas (1:10 V/V) e depositadas sobre suportes metálicos, secas à temperatura ambiente e recobertas com uma fina camada de ouro antes da análise.

3.3 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo DPDS

Após o preparo das nanopartículas, estas foram ressuspensas em 500 μ L de água purificada e posteriormente aliquotadas e armazenadas à temperatura ambiente ou refrigeradas à 4°C.

As amostras foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio das nanopartículas, índice de polidispersão, potencial zeta, taxa de liberação do DPDS das nanopartículas, bem como as características macroscópicas da formulação logo após o preparo e em intervalos de 7 dias, até completar 12 semanas de armazenamento. Onde, a cada semana foi retirada uma pequena fração, cerca de 20 μ L da suspensão para a mensuração de cada um dos parâmetros citados e posteriormente, cada amostra foi centrifugada à 15500 rpm por 30 min e o sobrenadante resultante foi analisado por CLAE para se obter a porcentagem de liberação do DPDS. Após o término de cada ciclo de análise, as amostras foram novamente ressuspensas em água ultra pura e armazenadas nas condições pré estabelecidas.

O estudo foi realizado em triplicata e os resultados foram submetidos à ANOVA, com pós teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

3.4 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de BSA contendo DPDS sobre hemácias

O protocolo do experimento para a avaliação da citotoxicidade em hemácias humanas foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob registro nº 1.213.358/2015 (Anexo 1).

Foram coletados 5 mL de sangue venoso de três indivíduos voluntários, maiores de 18 anos de idade, em perfeitas condições de saúde e sem fazer o uso de nenhum medicamento que pudesse interferir no ensaio. Esses pacientes voluntários foram convidados verbalmente para se dirigirem ao laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, onde farmacêuticos habilitados fizeram a coleta do sangue com seringas e agulhas descartáveis, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2010).

O sangue coletado foi adicionado em tubo de vidro contendo 10µL de heparina sódica e homogeneizado. Em seguida foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm, e o plasma resultante descartado. As hemácias obtidas foram lavadas, por três vezes, com solução de tampão PBS 10 mM, pH=7,4 acrescidas de glicose (1,08 mg/mL) e os antibióticos penicilina - Sigma-Aldrich® (0,3 mg/mL) e estreptomicina - Sigma-Aldrich® (0,5 mg/mL) com a finalidade de manter as hemácias íntegras. Ao final da terceira lavagem as hemácias foram resuspensas em PBS 10 mM, pH 7,4 acertando-se o volume globular para 2,5%.

Para o ensaio foi utilizada uma suspensão de hemácias à 2,5%, e incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas, a temperatura de 37°C, sob constante homogeneização. Foram realizados controles com água destilada, PBS 10 mM (pH 7,4), etanol (99,5% -Fmaia®) e nanopartícula branca. Foram utilizadas as concentrações finais de 40 e 20 µg/mL, tanto de DPDS livre como de nanopartículas carregadas.

A citotoxicidade foi avaliada pelo conteúdo de hemoglobina liberado, determinado no sobrenadante por meio da medida da absorbância em 540 nm, no leitor de microplacas - Spectra Max 190 – Molecular Devices® (SILVA *et al.*, 2001). A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Abs}_a / \text{Abs}_{cp}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Abs_a , absorvância da amostra.

Abs_{cp} , controle positivo, apresentando 100% de hemólise que no estudo correspondeu a amostra incubada com água destilada.

O estudo foi realizado em triplicata e os resultados foram submetidos à ANOVA, com pós teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DPDS é um composto altamente lipofílico que possui baixa solubilidade aquosa e altos valores de coeficiente de distribuição, bem como alta ligação a proteínas plasmáticas o que explica a sua baixa biodisponibilidade na corrente sanguínea (GIORDANI *et al.*, 2014) e que apresenta assim, vários efeitos tóxicos. Deste modo, o desenvolvimento de nanopartículas apresenta uma alternativa para solucionar esta questão. Portanto, buscou-se um método que se mostre eficiente para o agente encapsulante BSA.

4.1 Obtenção de nanopartículas de Albumina contendo Disseleneto de difenila (DPDS).

A técnica de dessolvatação, descrita no item 3.1, mostrou ser satisfatória, pois, proporcionou a obtenção de nanopartículas com diâmetro médio abaixo de 300 nm (Tabela 1) e boa eficiência de encapsulação do fármaco. As nanopartículas resultantes foram armazenadas sob a forma de suspensão aquosa, apresentando um aspecto leitoso de coloração ligeiramente amarelada. Quando liofilizadas apresentaram-se como um pó fino e de coloração amarelada, porém nessa condição o diâmetro médio foi alterado, sendo utilizadas apenas para fins de caracterização físico-química.

Tabela 1. Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas de BSA contendo DPDS, n=10, expressos em média \pm DP.

Tamanho nm	Índice de polidispersão
200 \pm 20	0,16 \pm 0,02

Um dos pontos importantes para a obtenção das nanopartículas pelo processo de dessolvatação é a participação do glutaraldeído nesse processo, uma vez que atua como agente de reticulação, estabilizando as partículas formadas, onde as porções amino nos resíduos de lisina e cadeias laterais de guanidina da arginina na albumina são enrijecidas através da reação de condensação com o

grupo aldeído do glutaraldeído. Essa estabilidade se faz necessária, para que as nanopartículas de albumina pré-formadas não se dissolvam ao serem resuspensas em água (ELZOGHBY *et al.*, 2012). Por se tratar de um agente relativamente tóxico, buscou-se utilizar uma baixa concentração de glutaraldeído, além disso, foram realizados processos de purificação para a remoção do glutaraldeído dissociado, reduzindo assim a sua toxicidade conforme estudos de Rohiwal *et al.*, (2015), assegurando o uso das nanopartículas de BSA contendo DPDS.

Outro fator importante para o desenvolvimento da formulação remete-se ao pH. As proteínas são altamente sensíveis ao pH, portanto, qualquer alteração pode afetar o tamanho e a conformação de nanopartículas de BSA. O ponto isoelétrico (pI) de BSA é cerca de 4,9 (JUN *et al.*, 2011). Neste pI, existe a falta de repulsão eletrostática que leva à formação de agregados através de interações hidrofóbicas. Por outro lado, em pH distante do pI, ocorre maior repulsão entre as moléculas retardando a agregação e favorecendo a reorganização estrutural de proteínas (ROHIWAL *et al.*, 2015). O pH 9 favorece uma condição eletrostática altamente repulsiva para as moléculas de BSA, onde a formação de coágulos por interações proteína-proteína são limitados, reduzindo assim o tamanho da nanopartícula (JUN *et al.*, 2011). Relatos semelhantes foram encontrados em estudos de Rohiwal *et al.*, (2015), Paik *et al.*,(2013) e Yedomon *et al.*,(2013).

4.2 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.2.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas

A determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão foram realizados conforme foi descrito no item 3.2.1. Foram utilizadas 10 amostras para realizar a média das análises do diâmetro médio das nanopartículas de BSA contendo DPDS. A média obtida de diâmetro médio foi de 200 ± 20 nm, e para o índice de polidispersão foi de $0,16 \pm 0,02$.

O diâmetro médio é uma propriedade fundamental para a interação com sistemas biológicos na medida em que determina a capacidade das nanopartículas

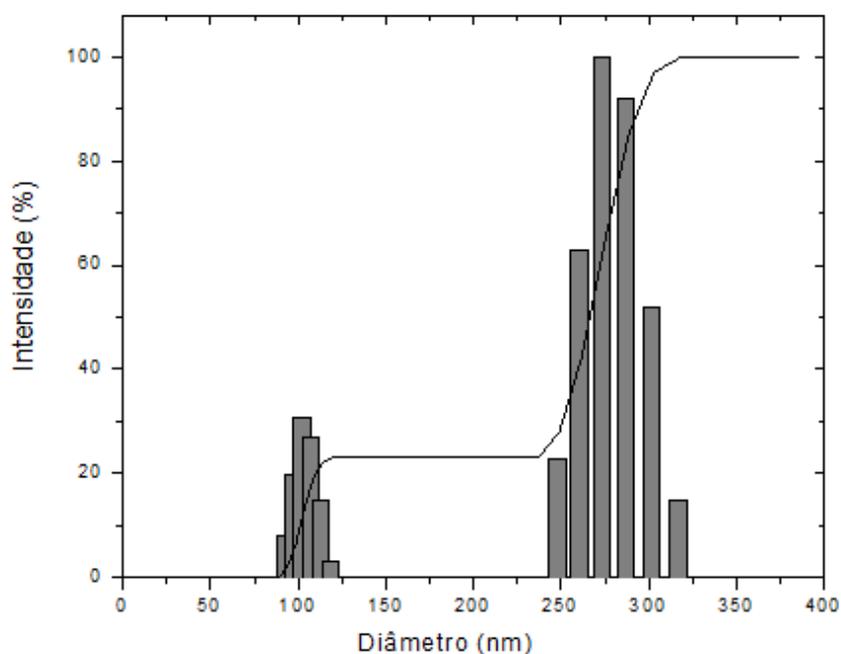
em penetrar nas membranas celulares, facilitando assim, a passagem através de barreiras biológicas, a absorção e distribuição do fármaco (VISCIDO *et al.*, 2014).

Desse modo, é importante e faz-se necessário o pequeno tamanho das nanopartículas para que possam extravasar através do endotélio em locais com processo inflamatório, tumores locais, e em pontos de amostragem de antígeno onde ocorre um aumento da permeabilidade e efeito de retenção da vasculatura (GIORDANI *et al.*, 2014).

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes metodologias, apresentam uma distribuição monomodal, que se refere a um baixo índice de polidispersão, onde as nanopartículas encontram-se em uma mesma faixa de distribuição de tamanho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Tem sido relatado que partículas maiores que 300 nm não conseguem ser transportadas para a circulação sistêmica, não alcançando o sítio alvo (JOYE *et al.*, 2014).

Na Figura 4 está representada a distribuição de tamanhos de um dos lotes de amostra de nanopartículas de BSA contendo DPDS, que apresentaram um diâmetro médio de 206,5 nm e um índice de polidispersão de 0,159.

Figura 4. Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de BSA contendo DPDS. Diâmetro médio de 206,5 nm e índice de polidispersão de 0,159, perfil bimodal, n=3.



Essa amostra apesar de um índice de polidispersão baixo apresentou um perfil bimodal, onde as nanopartículas estão distribuídas em duas famílias, sendo que 77% das nanopartículas encontram-se na faixa de 249 a 318 nm e 23% apresentam diâmetro de até 119nm. Assim, as nanopartículas produzidas encontram-se dentro dos padrões de diâmetro médio e têm condições de exercer sua atividade biológica.

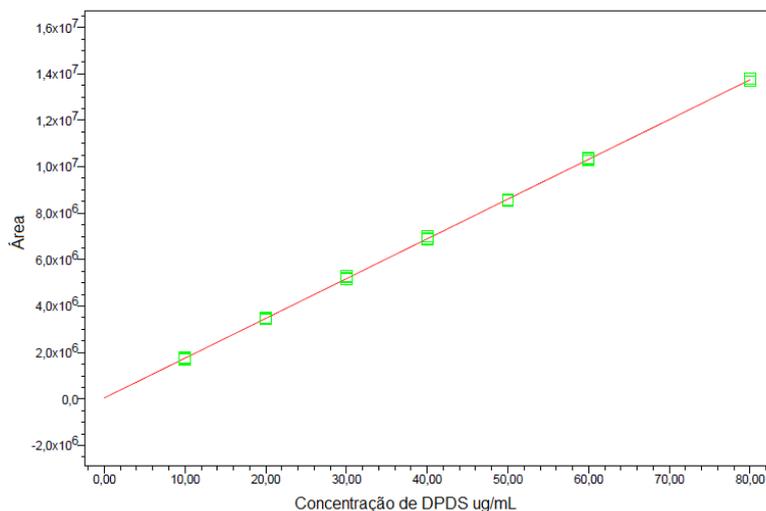
4.2.2 Adaptação da Validação do Método Analítico para Quantificação do DPDS por CLAE

Para a quantificação do DPDS por CLAE, foi realizado uma adaptação da validação analítica desenvolvida por Antunes Junior *et al.* (2015), afim de que a quantificação do DPDS estivesse dentro dos parâmetros preconizados seguindo a ANVISA (2003).

Inicialmente, foi determinada a linearidade do método que refere-se como à capacidade em gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica especificada. O valor de r é aceitável quando no mínimo esse valor seja de 0,99 (ANVISA, 2003). Assim a linearidade da curva garante a qualidade do método para análise do DPDS, garantindo uma confiança no uso da equação da reta obtida. A Figura 5 representa a curva analítica, a equação e o coeficiente de correlação (r^2), gerado a partir da equação. O r obtido foi de 0,9998 e a equação dada por:

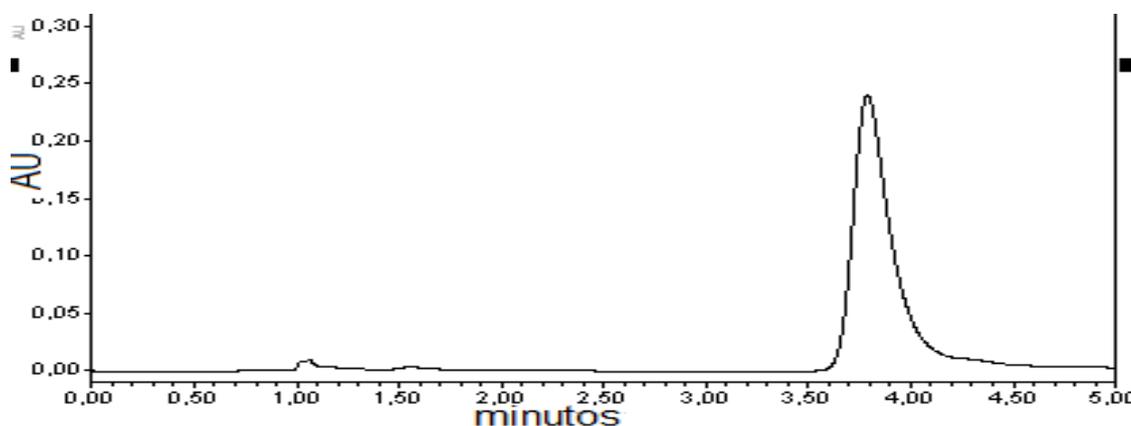
$$A = 1,71 \cdot 10^5 \cdot [\text{DPDS}] + 4,67 \cdot 10^4$$

Figura 5. Curva analítica do DPDS solubilizado em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol:água acidificada (90:10, v/v), fluxo de 1,0 mL/min; detecção no comprimento de onda de 240nm, volume de injeção 40µL. Área x Concentração (µg/mL).



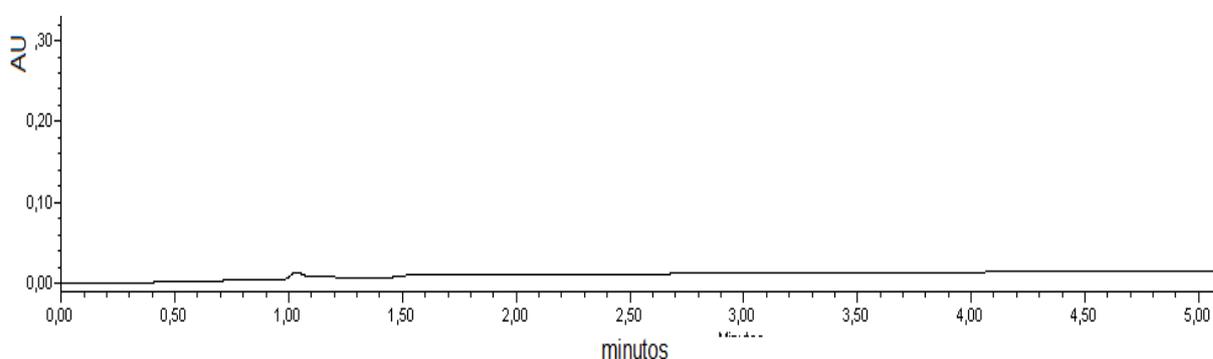
Posteriormente, foi realizada uma corrida cromatográfica de uma amostra de DPDS, para que houvesse a detecção da droga pelo equipamento, conforme as condições estabelecidas por Antunes Junior *et al.* (2015). A Figura 6 demonstra que houve a detecção do DPDS no tempo de retenção de 3,7 min. O pico formado apresenta-se de forma estreita e simétrica, com alta absorvância e sem ruídos na linha de base, considerado ideal para as análises posteriores.

Figura 6. Cromatograma de uma amostra de DPDS (10 µg/mL) solubilizada em metanol:água (50:50 v/v); fase móvel metanol:água acidificada (90:10 v/v), fluxo de 1,0 mL/min; detecção no comprimento de onda de 240nm, volume de injeção 40 µL. Absorvância (AU) em função do tempo (min).



O método cromatográfico também foi avaliado quanto à especificidade, com a finalidade de demonstrar a eficiência em detectar somente o DPDS, sem a interferência de algum outro componente da formulação, no mesmo tempo de retenção do DPDS (ANVISA, 2003). A análise foi realizada através da comparação dos cromatogramas dos sobrenadantes das nanopartículas contendo DPDS (Figura 6) e das nanopartículas brancas que contem todos os demais componentes da formulação, com excessão somente da droga (Figura 7).

Figura 7. Cromatograma de uma amostra de sobrenadante de nanopartículas brancas, mostrando a ausência de formação de picos.



Comparando os cromatogramas, podemos afirmar que essa metodologia mostrou-se especifica para a identificação e quantificação do DPDS, pois não houve nenhum outro componente na formulação com o mesmo tempo de retenção do DPDS.

4.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação (EE%)

A EE% das nanopartículas de BSA contendo DPDS foram determinadas pelo método indireto, de acordo com o item 3.2.3.

A presente formulação alcançou uma taxa média de EE% 65 ± 6 sendo analisadas 5 amostras. Na literatura são escassos os relatos de encapsulação de disseleneto de difenila, por isso buscou-se a comparação com moléculas que possuam as mesmas limitações que o DPDS, encapsuladas com BSA pelo método de dessolvatação.

No estudo de Yadad *et al.*, (2014) com a encapsulação de moléculas antioxidantes de catequina (CAT) e epicatequina (ECAT), que também apresentam baixa solubilidade aquosa e assim baixa biodisponibilidade, limitando o seu uso, em nanopartículas de (BSA), foi constatada uma eficiência de encapsulação de CAT e ECAT de 60,5 e 54,5%, respectivamente, corroborando com o resultado obtido neste trabalho. Sendo assim, o presente estudo pode ser considerado promissor, tendo em vista seu aspecto inovador, visto que a encapsulação de DPDS em nanopartículas de BSA ainda não foi relatada.

4.2.4 Potencial zeta

O potencial zeta traz informações sobre as cargas superficiais das nanopartículas e desempenha um papel fundamental na estabilidade das mesmas em suspensão. Um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação e conseqüentemente, facilita a redispersão do produto. (OZGUR *et al.*, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Partículas com elevados valores de potencial zeta positivos ou negativos produzem maiores forças repulsivas (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005).

Em geral, as partículas podem ser dispersas de forma estável quando considerado o valor do potencial zeta acima de ± 30 mV devido à repulsão eletrostática entre as partículas, porém, potenciais entre 5 mV e 15 mV tendem a resultar em um grau maior de floculação (NEVES *et al.*, 2013).

Para fins medicamentosos, a carga superficial pode ser utilizada para aumentar a proximidade das nanopartículas com o epitélio, aumentando assim, a sua absorção e determinando diferentes interações com o organismo. É demonstrado que nanopartículas carregadas positivamente possuem uma forte afinidade com epitélio saudável, enquanto que aquelas carregadas negativamente aderem-se preferencialmente à mucosa inflamada (VISCIDO *et al.*, 2014). Sendo assim, é desejável obter-se nanopartículas que sejam atraídas para o tecido doente, sem afetar as células saudáveis.

Como mostrado na Tabela 2, a formulação desenvolvida apresentou um elevado potencial zeta negativo em torno de -30 mV, esse resultado garante nanopartículas fisicamente estáveis devido à repulsão eletrostática conferida pela natureza química do polímero BSA utilizado.

Tabela 2. Potencial zeta das nanopartículas de BSA na ausência e presença de DPDS, n=3, expressos em média \pm DP.

Formulação	Potencial zeta (mV)
Nanopartícula Branca	- 28 \pm 4
Nanopartícula DPDS	- 34 \pm 3

Wilson *et al.*, (2012) obtiveram um valor de potencial zeta semelhante, de cerca de -30,3 mV, ao produzirem nanopartículas de BSA carregadas com 5-fluoracil.

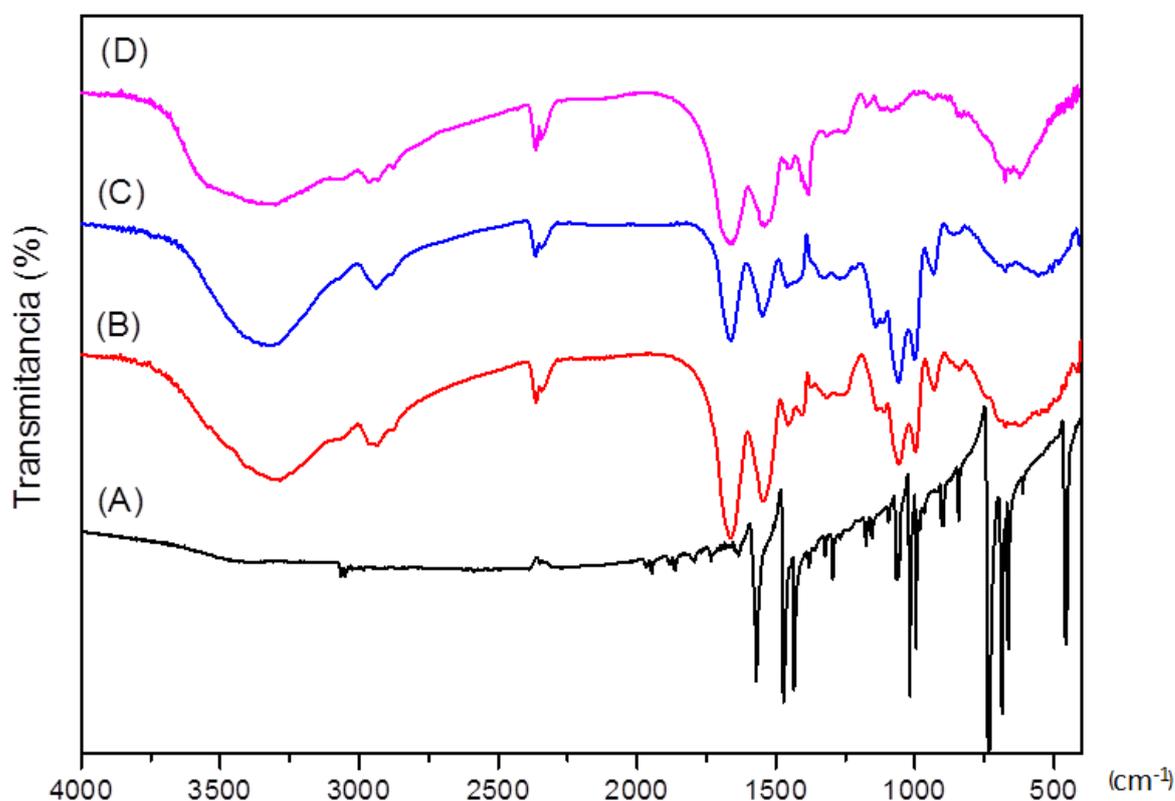
4.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 8 são apresentados os espectros de FTIR do DPDS e das nanopartículas de BSA. Analisando-se o espectro do DPDS, podem-se observar as bandas características dos compostos aromáticos, as bandas em 3065 e 3050 cm^{-1} são relativas ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^2 , as bandas fracas localizadas entre 1950 e 1650 cm^{-1} são denominadas bandas harmônicas ou de combinação presentes em anéis aromáticos monossustituídos, as bandas em 1572, 1475 e 1432 cm^{-1} correspondem às absorções de estiramento da ligação C=C do anel e as bandas entre 1000 e 690 cm^{-1} correspondem à deformação fora do plano da ligação =C-H (PAVIA, 2013).

Ao analisar o espectro da nanopartícula branca de BSA, podem-se observar as seguintes bandas principais: banda larga e intensa em torno de 3300 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação O-H e -NH, em 2900 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 , em 1670 cm^{-1} relativa ao grupamento C=O da ligação peptídica, 1550 cm^{-1} relativa à deformação da ligação N-H, em torno de 1450 cm^{-1}

relativa ao estiramento da ligação C-N, em 1050 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação C-O e em torno de 600 cm^{-1} relativa à deformação fora do plano da ligação N-H (GRDADOLNIK & MARECHAL 2001). O espectro relativo à nanopartícula de DPDS é muito similar ao da NP branca, visto que as bandas relativas às absorções das ligações peptídicas da proteína são mais largas, sobrepondo-se às bandas provenientes do DPDS. Através da análise de FTIR é possível apenas sugerir a incorporação do DPDS à nanopartícula de BSA. Cabe ressaltar ainda que esta técnica corrobora com os resultados de DRX, DSC e eficiência de encapsulação.

Figura 8. Espectros de FTIR: a) DPDS, b) Nanopartícula contendo DPDS, c) Nanopartícula branca e d) BSA.



4.2.6 Difração de Raios X (DRX)

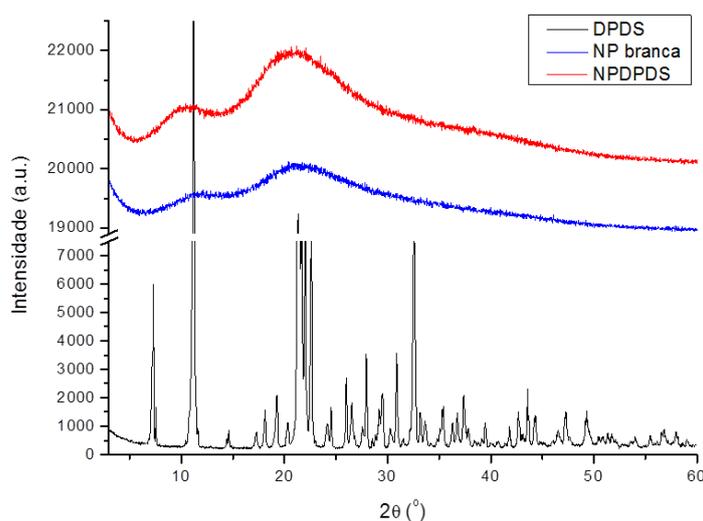
A difração de raios X é uma técnica versátil e não destrutiva utilizada para determinar a identidade de sólidos cristalinos com base na sua estrutura atômica,

gerando informações sobre a estrutura cristalina tanto de materiais naturais como sintéticos (BEDÊ, 2010; EZHILARASI *et al.*, 2013;).

A estrutura cristalina refere-se a uma distribuição regular tridimensional de átomos no espaço onde estão organizados de modo a formar uma série de planos paralelos separados entre si por uma distância, que varia conforme a natureza do material. Já os sólidos amorfos não apresentam essa característica de organização, uma vez que não apresentam as mesmas condições de ponto fusão e sua organização não necessita da mesma energia que os cristais para o desarranjo da estrutura (BEDÊ, 2010; VLACK, 1970).

Nos difratogramas obtidos por DRX (Figura 9) pode-se observar uma estrutura altamente cristalina bem definida do DPDS livre, uma estrutura amorfa para as nanopartículas brancas de BSA em azul e uma estrutura semelhantemente amorfa para as nanopartículas de BSA contendo DPDS em vermelho que indica que o fármaco está disperso nos alos amorfos da nanopartícula.

Figura 9. Difratogramas obtidos por DRX.



Drogas com estruturas altamente cristalinas tendem a ser pouco solúveis em meio aquoso, porém, quando se encontram em estado amorfo nota-se um aumento em sua solubilidade, o que irá refletir na absorção e na biodisponibilidade da droga.

Isso pode ser explicado por não ser necessária a mesma energia para quebrar a estrutura cristalina durante o processo de dissolução (DHIRENDRA *et al.*, 2009). Sendo assim, é vantajoso que as nanopartículas se apresentem em estado amorfo.

4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA)

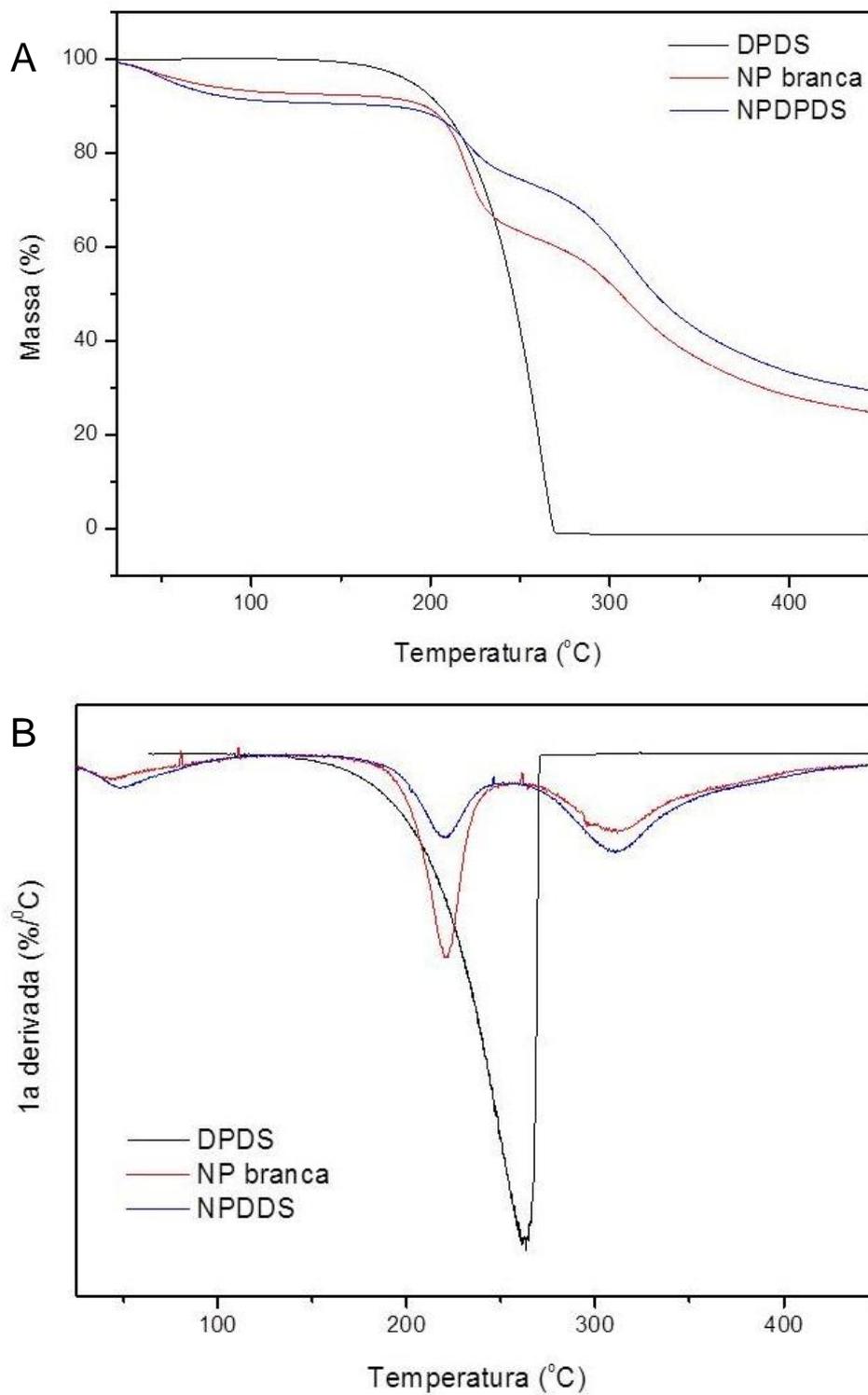
A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera específica. Uma classificação lógica dos métodos termoanalíticos baseia-se na propriedade física medida em função da temperatura, por exemplo, a termogravimetria (TG) mede a variação de perda de massa em função da temperatura. Na termogravimetria derivada (DTG) as curvas correspondem à derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt). Já o DSC mede a variação de entalpia em função da temperatura (CANEVAROLO JR, 2007).

Os eventos térmicos que geram modificações em curvas de DSC podem ser, basicamente, transições de primeira e segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variação de entalpia – endotérmica ou exotérmica- e dão origem a formação de picos. Como exemplo de eventos endotérmicos podem-se citar: fusão, perda de massa da amostra (vaporização de água, aditivos ou decomposição) e dessorção. Eventos exotérmicos podem ser devido a: cristalização, reações de polimerização, cura e adsorção. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia. Assim, essas transições não geram picos nas curvas de DSC, apresentando-se como um deslocamento de linha base, um exemplo característico é a temperatura de transição vítrea (CANEVAROLO JR, 2007).

Na Figura 10 são apresentadas as curvas de TG (Figura 10a) e da derivada da TG (Figura 10b) para o DPDS livre, nanopartículas de BSA e nanopartículas de BSA contendo DPDS. A perda de massa observada para o DPDS livre ocorre em um único estágio, iniciando-se em aproximadamente 180° C e chegando até 98% de perda de massa em 262°C. O que pode ser confirmado a partir da curva derivada

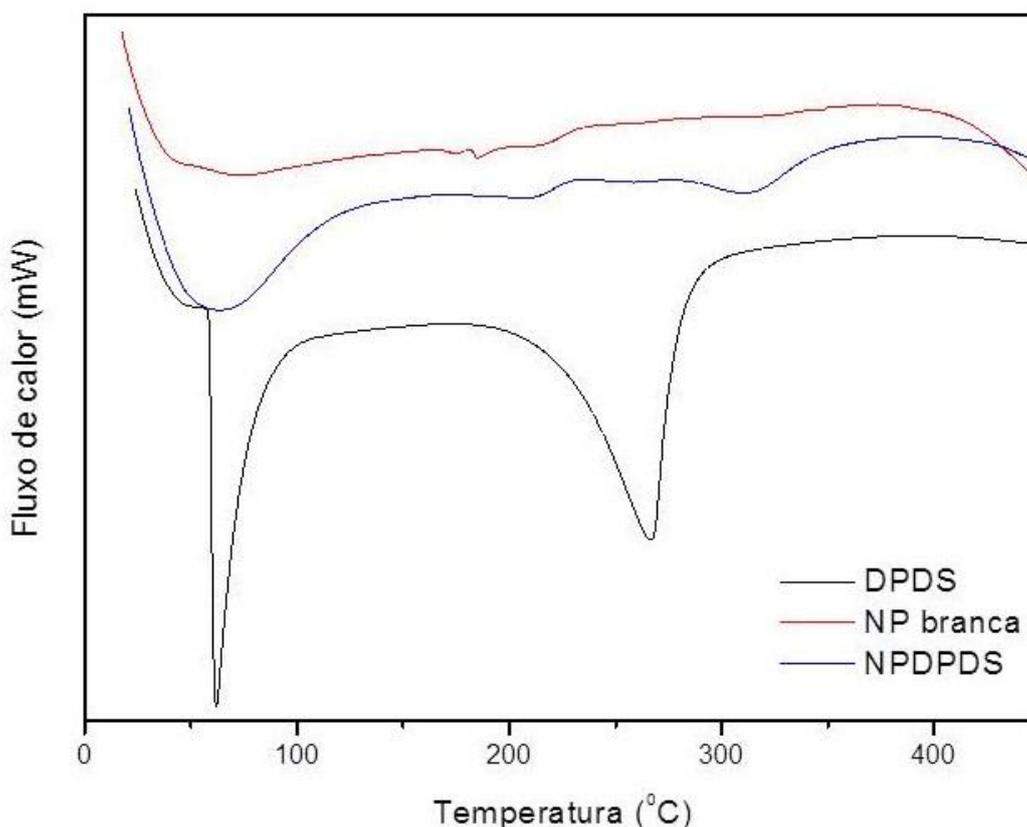
(figura 10b) que apresenta um pico nessa temperatura. No caso da nanopartícula branca de BSA, a perda de massa ocorre em três estágios, o primeiro deles a 43°C (5,9%) referente à perda de umidade da amostra, e os outros dois picos, 220°C (27,3%) e 311°C (38%) que são relativos à decomposição térmica da albumina, resultando em 71,3% de perda total de massa na faixa de temperatura analisada. Já para as nanopartículas de BSA contendo o DPDS, são igualmente observados três picos de perda de massa, nos quais o primeiro em 49°C (6,6%) relativo à perda de umidade, e os demais em 220° (16%) e 311°C (43%) relacionados à degradação da amostra, correspondendo a um total de 66% de perda de massa. Esses resultados sugerem um efeito de proteção térmica ocasionada pela encapsulação do fármaco na nanopartícula, visto que a temperatura de degradação do fármaco livre apresenta-se em 262°C, já no sistema nanoencapsulado esse evento térmico foi observado em 311°C.

Figura 10. A) Curva de termogravimetria para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS. **B)** Curva da derivada da TG para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS.



Na Figura 11 são apresentadas as curvas de DSC para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas de BSA contendo DPDS. Para o DPDS pode-se observar um pico endotérmico bem definido na curva de DSC em aproximadamente 62°C relativo ao ponto de fusão da droga livre, que é característico de substâncias cristalinas e em 262°C, outro pico endotérmico relativo à sua degradação térmica. Para as nanopartículas vazias de BSA, é observada principalmente a presença de um pico largo em aproximadamente 73°C, que se refere à desnaturação da proteína e um pico extremamente largo na faixa de 300 a 450°C que corresponde à sua decomposição térmica. Enquanto que, as nanopartículas de BSA contendo DPDS, observam-se dois picos endotérmicos principais, sendo um dele à 64°C correspondente a desnaturação da proteína e o segundo à 310°C relacionado a decomposição térmica da amostra. Esses resultados comprovam que o sistema nanoestruturado promoveu a amorfização do fármaco, tendo em vista a ausência do pico relativo ao ponto de fusão da droga.

Figura 11. Curva de Calorimetria exploratória diferencial para o DPDS livre, nanopartículas brancas e nanopartículas contendo DPDS.



4.2.8. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

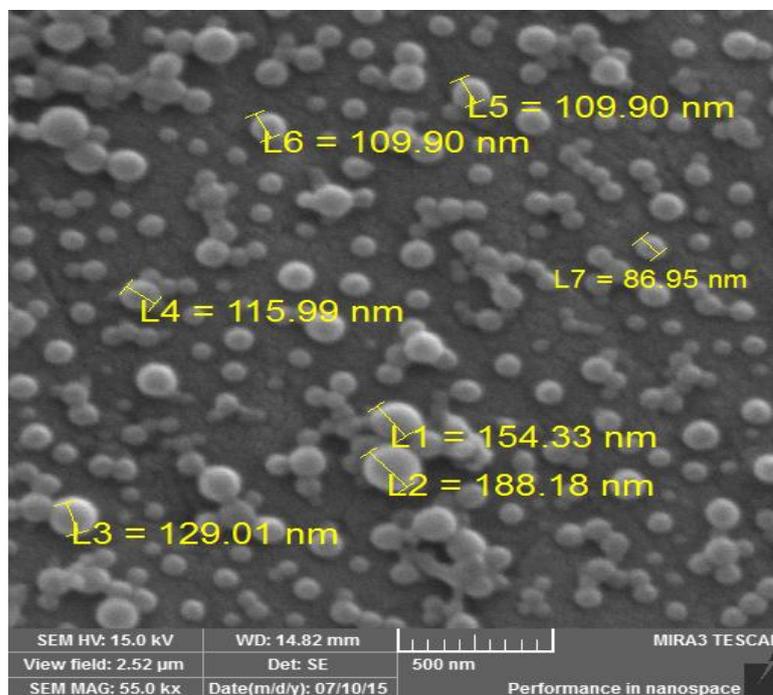
A microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo tem sido muito utilizada para obtenção de informações referentes ao formato e ao tamanho das nanopartículas produzidas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura pode-se obter imagens de superfícies polidas ou rugosas, com a vantagem de proporcionar grande profundidade de campo e alta resolução, e ainda a facilidade na interpretação das imagens, com aquisição de sinal digital, possibilitando o processamento dos sinais das imagens. A fonte de emissão por efeito de campo (FEG – Field Emission Gun) permite a ampliação da superfície em dezenas de milhares de vezes com uma pequena voltagem de aceleração de elétrons (FERNANDES, 2011).

A capacidade da nanopartícula em penetrar através de uma superfície biológica depende da sua área de contato e da curvatura da partícula no ponto de contato. Deste modo, a forma geométrica representa uma característica importante para o desempenho das nanopartículas (VISCIDO *et al.*, 2014).

Na Figura 12 está apresentada a micrografia relativa à análise das nanopartículas de BSA contendo DPDS, pode-se observar o formato esférico com morfologia de superfície lisa e o tamanho observado variou de 86 a 188 nm, um pouco abaixo do intervalo determinado usando espectroscopia de correlação de fótons (DLS). Entretanto, confirma o perfil bimodal já verificado anteriormente de duas famílias predominantes.

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de BSA contendo DPDS.



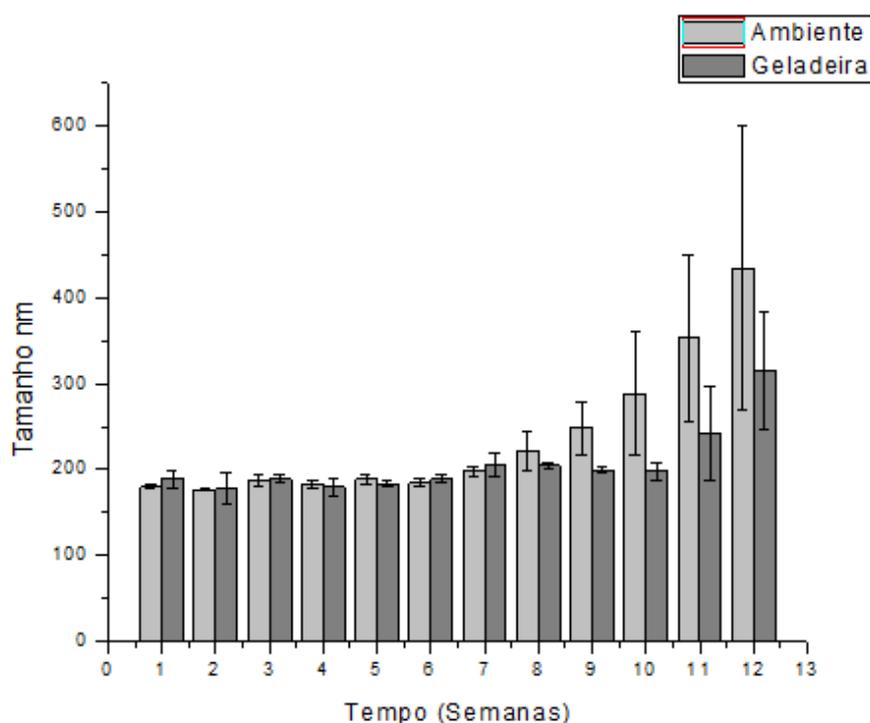
Essa diferença entre os valores encontrados nos tamanhos das nanopartículas nas duas técnicas já foi relatado anteriormente em outros estudos conforme Bootz *et al.*, (2004). Isso ocorre pelo fato de que as metodologias são diferentes, onde a microscopia utiliza as partículas secas, enquanto que a espectroscopia de correlação de fótons considera a camada de hidratação que envolve as partículas, determinando o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (HOFFMANN *et al.*, 1997; COUVREUR *et al.*, 2002).

4.3 Avaliação da estabilidade das nanopartículas contendo DPDS

As nanopartículas de BSA contendo DPDS ressuspensas em água, foram submetidas ao ensaio de estabilidade por um período de 12 semanas a temperatura ambiente e sob refrigeração a 4°C. Ao final do tempo pré-estabelecido, foram avaliadas as características macroscópicas e semanalmente foram medidos os valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.

As nanopartículas mantidas à temperatura ambiente e refrigeradas (4°C) mantiveram as mesmas características iniciais: coloração levemente amarelada, homogeneidade e aspecto leitoso. A avaliação do diâmetro médio (Figura 13) demonstrou que em relação ao diâmetro das nanopartículas inicial, as amostras armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeradas (4°C) não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle, entretanto, pode-se observar que as nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente iniciaram um processo de aumento no seu diâmetro médio a partir da 8ª semana, chegando a ter nanopartículas com 600 nm de diâmetro ao final do tempo de armazenamento. Enquanto que as nanopartículas mantidas sob condições refrigeradas se mantiveram dentro dos padrões aceitáveis de diâmetro médio para formulações farmacêuticas, de até 300 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003)

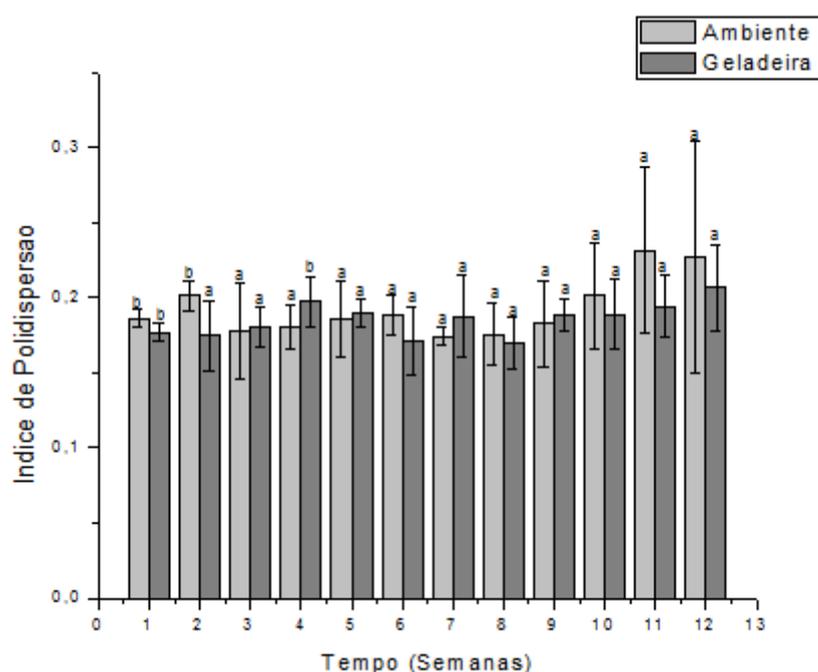
Figura 13. Diâmetro médio das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



Em relação ao índice de polidispersão, Figura 14, pode-se observar que o mesmo manteve-se entre 0,2 e 0,3 considerado apropriado para nanopartículas com

aplicação farmacêutica. Houve diferenças estatísticas significantes na primeira semana para as duas condições, na segunda semana apenas para nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente e na quarta semana para condição de geladeira, sendo que nas demais semanas, sob as duas condições, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao valor inicial.

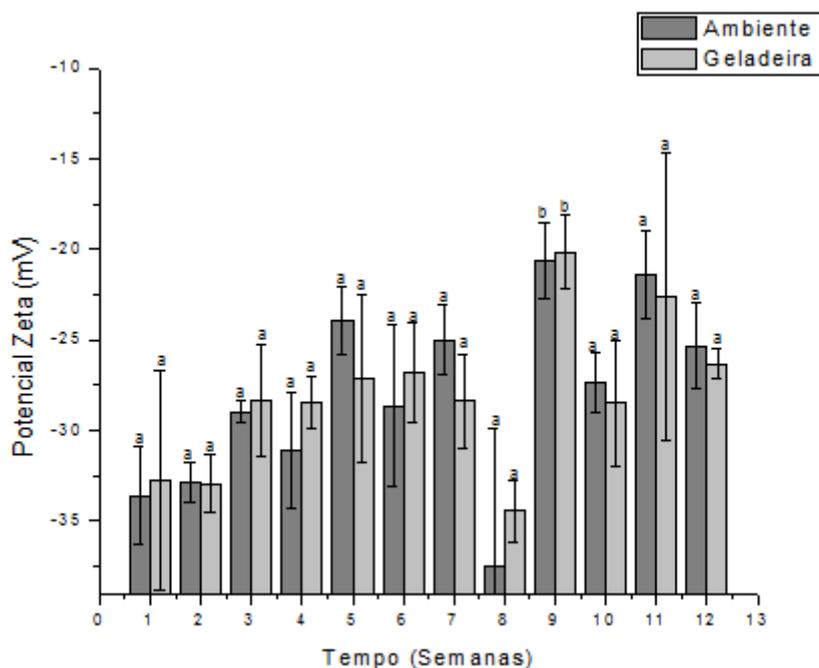
Figura 14. Índice de polidispersão das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



^{a, b}, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pos teste Tukey e α 0,05).

O potencial zeta também foi avaliado semanalmente e os resultados estão apresentados na Figura 15, sendo possível observar que em todas as temperaturas de armazenamento, as nanopartículas apresentaram variações quando comparado ao potencial zeta mensurado inicialmente, com diferenças estatísticas apenas na 9ª semana para ambas condições. Porém, pode-se observar que em todos os casos o potencial zeta negativo distante de |5| mV e |15| mV foi mantido, evitando assim a tendência de aumento do grau de floculação (NEVES *et al.*, 2013).

Figura 15. Potencial zeta das nanopartículas de BSA contendo DPDS em função do tempo, em diferentes condições de armazenamento, n=3.



^{a, b}, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pos teste Tukey e α 0,05).

A taxa de fármaco liberado das nanopartículas nestas condições não pode ser mensurado uma vez que, a quantificação do sobrenadante de cada uma das condições de temperatura em cada semana apresentou um valor inferior ao limite de quantificação, validado por CLAE, sugerindo-se assim uma perda mínima de fármaco durante o tempo de armazenamento para as duas condições.

Com os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão obtidos, do potencial zeta e das características macroscópicas das nanopartículas de BSA contendo DPDS, foi possível determinar que a melhor temperatura para armazenamento das nanopartículas em água foi a refrigerada (4°C), pois essa foi a condição que melhor manteve as nanopartículas estáveis em todos os parâmetros avaliados, garantindo estabilidade à formulação durante o período de 12 semanas em que foi avaliada.

4.4 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de BSA contendo DPDS sobre hemácias

As hemácias representam mais de 90% das células sanguíneas e devido às suas características estruturais e moleculares têm sido extensivamente usadas como modelos experimentais em estudos toxicológicos e farmacológicos (SANTOS, 2009).

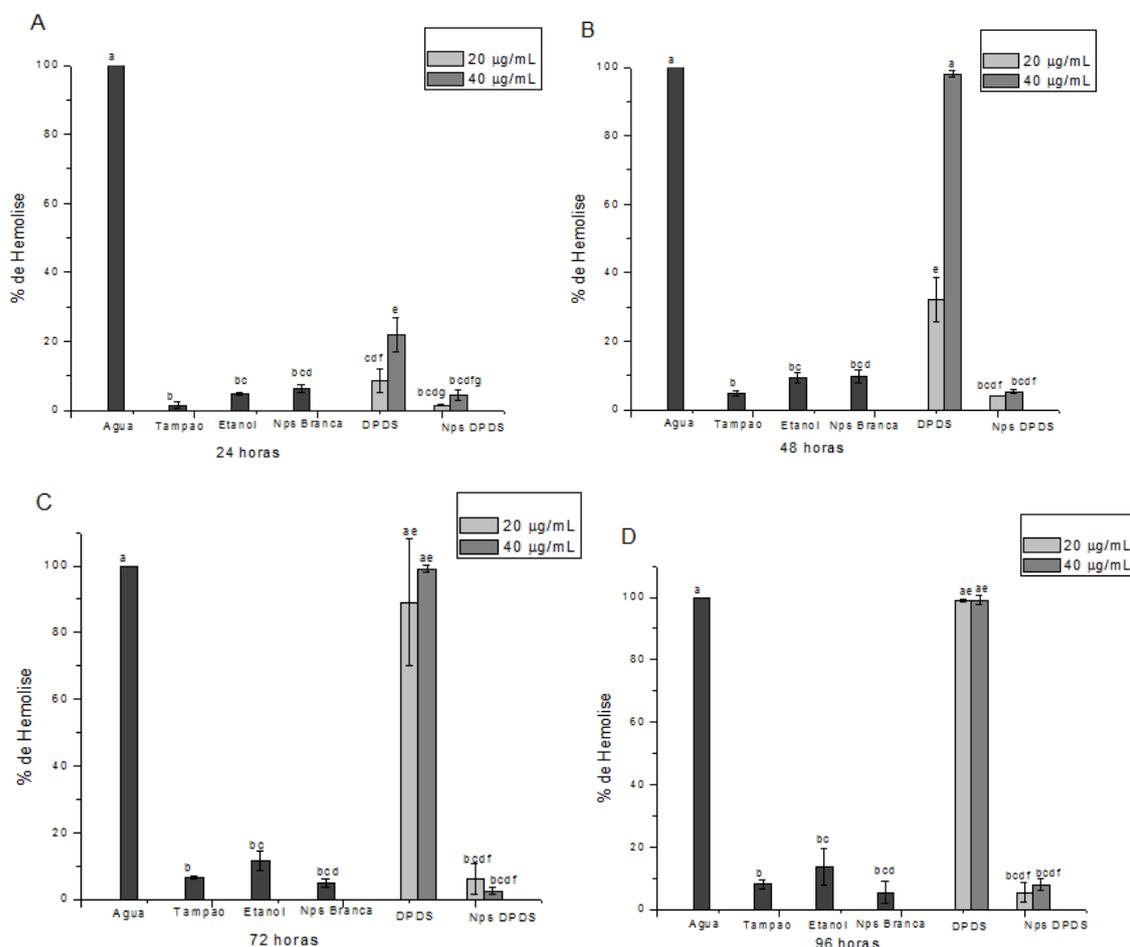
Estudos recentes têm investigado a ação de compostos de selênio sobre hemácias humanas a fim de se ampliar os conhecimentos sobre os efeitos biológicos e toxicológicos deste elemento. O efeito hemolítico causado por determinadas formas orgânicas e inorgânicas de Se já foi constatado e parece depender do tempo de exposição e da concentração do composto (Santos *et al.*, 2009^a ; SCHIAR *et al.*, 2007).

Santos *et al.*, (2009^a) relatou o efeito hemolítico do DPDS na concentração de 100 µM dentre outros compostos de selênio. Deste modo, foi realizado o ensaio sobre as hemácias com intuito de verificar se o sistema de nanopartículas contendo DPDS poderia diminuir efeito citotóxico apresentado na droga em sua forma livre.

Foram realizadas análises estatísticas por meio da ANOVA, com o pós-teste Tukey, com 95% de confiança, com $p < 0,05$. O ensaio procedeu-se em 24, 48, 72 e 96 h, utilizando água como controle positivo de 100% hemólise e o tampão PBS como controle negativo, foi verificada a influência do etanol, solvente utilizado para dissolver a droga e o comportamento das nanopartículas brancas, que não possuíam a droga encapsulada.

De acordo com a Figura 16 pode-se confirmar um perfil dose e tempo dependente do DPDS livre, onde em 24 h na concentração de 20 µg/mL aproximadamente 10% das hemácias foram hemolisadas, após 24 h aumentou para 30%, quando em 72 h já se encontrava com aproximadamente 90% e em 96 h atingiu 98% de hemólise. Na concentração de 40 µg/mL em 24 h já havia 20% das hemácias hemolisadas e em 48 h atingiu a máxima de 98% de hemólise. Já para as nanopartículas tanto na concentração de 20 µg/mL como 40 µg/mL ao final das 96 h não ultrapassaram os 10% de hemólise das hemácias, mostrando assim, que a droga encapsulada protege do efeito citotóxico da droga livre.

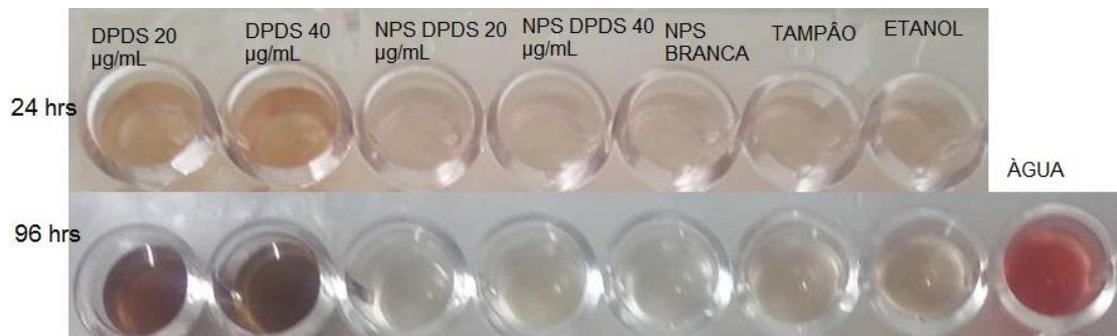
Figura 16. Porcentagem de hemólise para água, tampão PBS, etanol, nanopartículas brancas, concentrações de DPDS livre e nanopartículas de BSA contendo DPDS em A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h e em D) 96 h.



a, b, c, d, e, f, g letras diferentes representam desigualdades estatísticas com índice de significância <0,05 e letras iguais indicam igualdade estatística.

Na Figura 17 é possível visualizar no sobrenadante indícios de hemólise em 24 h para o DPDS livre na concentração de 40 µg/mL e ao final do ensaio em 96 h para ambas as concentrações da droga livre hemolisadas. Os sobrenadantes referentes às nanopartículas não apresentaram indicativos visuais de hemólise.

Figura 17. Poços de uma microplaca de Elisa utilizada para a leitura dos sobrenadantes resultantes da centrifugação da suspensão de hemácias.



Desta forma, as nanopartículas de albumina apresentam-se como uma alternativa estratégica para diminuir a citotoxicidade do composto.

5. CONCLUSÕES

- As nanopartículas de BSA contendo DPDS foram produzidas com sucesso por meio do método de dessolvatação;
- A eficiência de encapsulação de DPDS nas nanopartículas foi satisfatória, uma vez que foi superior a 60%; este resultado pode ser considerado inovador, visto que ainda não foram relatados resultados referentes à nanopartículas de BSA contendo DPDS.
- A formulação desenvolvida apresentou características físico-químicas como tamanho médio, índice de polidispersão, distribuição de tamanho, potencial de superfície negativo, estabilidade térmica, adequadas para um sistema de liberação de fármacos. Além disso, o fármaco encapsulado apresentou caráter amorfo que é favorável aos sistemas carreadores.
- Com o estudo de estabilidade no período de 12 semanas, foi possível determinar que a melhor temperatura de armazenamento das nanopartículas de BSA contendo DPDS foi a refrigerada (4°C), nas condições testadas;
- As nanopartículas de BSA contendo DPDS mostraram diminuir o efeito citotóxico causado pelo DPDS livre frente a hemácias;
- Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o sistema desenvolvido com as nanopartículas de BSA contendo DPDS apresentam características físico-químicas e estabilidade adequadas assim como o efeito citotóxico reduzido, podendo ser usadas para futuros testes de suas atividades biológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. P.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. A. Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. **Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, ano 9, p. 44-50, 2008.

ANDRADE, F.; RAFAEL, D.; VIDEIRA, M.; FERREIRA, D.; SOSNIK, A.; SARMENTO, B. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 65 p.1816–1827, 2013.

ANTUNES JUNIOR, O. R. ; ANTONIO, E. ; MAINARDES, R. M. ; KHALIL, N. M. Development and validation of HPLC PDA method for the quantitative determination of Diphenyl diselenide in (Poly)lactide Nanoparticles. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 11, p. xxx-xxx, 2015.

BARBOSA, N.B.; ROCHA, J.B.; ZENI, G. ; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C.; BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on deltaaminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats, **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.149 p. 243–253, 1998.

BEDÊ, P.M. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico magnéticas para aplicações biomédicas. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Materiais) Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BOISSEAU, P.; LOUBATONB, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**.v.12 p. 620–636, 2011.

BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 369 – 375, 2004.

CANEVAROLO JR, S.V. **Técnicas de carcterização de polímeros**, Artiber Editora Ltda, São Paulo, 2007.

CHENG, Z.; AI ZAKI, A.; HUI, J.Z.; MUZYKANTOV, V.R.; TSOURKAS, A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. **Science** v. 338, p. 903–10, 2012.

COUVREUR, P., BARRAT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, p. 99-134, 2002.

DENARDI, L. B., MARIO, D. A. N., DE LORETO, É. S., NOGUEIRA, C. W., SANTURIO, J. M., & ALVES, S. H. Antifungal Activities of Diphenyl Diselenide alone and in Combination with Fluconazole or Amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, p. 165-169, 2013.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, p. 234-246, 2009.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release** v. 157, p. 168–182, 2012.

EZHILARASI, P.N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.3, p. 628-647, 2013.

FERNANDES, T. J. Síntese de hidroxiapatita nanométrica com PVP: Sinterização e adsorção de albumina bovina. **Dissertação** (Mestrado em Ciências dos Materiais), Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2011.

FEYNMAN, R., Engineering & Science Magazine. California Institute of Technology, USA, 1960.

FONSECA, N. A.; GREGÓRIO, A. C., FERNANDES, A.V.; SIMÕES, S.; MOREIRA, J. N. Moreira Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches **Cancer Treatment Reviews** v. 40, p. 626–635, 2014.

GABRYEL, B.; MALECKI, A. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors, **Pharmacological Reports**. V. 58, p. 381–392, 2006.

GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, p. 1–9, 2008.

GHISLENI, G.; PORCIUNCULA, L.; CIMAROSTI, H.; ROCHA, J.B.T.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent, **Brain Research**. V. 986, p.196–199, 2003.

GIORDANI, C.F.A.; SOUZA, D.; DORNELLES, L.; NOGUEIRA, C.W.; ALVES, M.P.; PRIGOL, M.; RODRIGUES, O.E.D. Diphenyl Diselenide-Loaded Nanocapsules: Preparation and Biological Distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 172, p.755–766, 2014.

GRDADOLNIK, J. & MARECHAL, Y. Bovine Serum Albumin Observed by Infrared Spectrometry. I. Methodology, Structural Investigation, and Water Uptake Biopolymers **Biospectroscopy**, V. 62, p. 40–53, 2001.

HOFFMANN, F., CINATL JR. J., KABIC'KOVÁ, H., CINATL, J., KREUTER, J., STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 189 – 198, 1997.

JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTSA, D. J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. **Trends in Food Science & Technology** v. 40, p. 168 – 182, 2014.

JUNG, H; SEO, Y. Current issues of selenium in cancer chemoprevention. **Biofactors**, n. 36, p. 153-158, 2010.

JUN, J.; NGUYEN, H.; PAIK, S.; CHUN, H.; KANG, B. KO, S. Preparation of size controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method, **Food Chemistry**. v.127, p. 1892–1898, 2011.

- KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v. 132, p. 171–183, 2008.
- KUMAR, C. S. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Materials Today**, v. 12, p. 24-30, 2010.
- LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, SCHUBERT, H.D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, **International Journal of Pharmacy**. v. 257, p. 169–180, 2003.
- LEE, J. H., & YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical engineering science**, v.125, p. 75-84, 2015.
- LORETO E.S.; ALVES S.H.; SANTURIO J.M.; NOGUEIRA C.W.; ZENI G. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**.v. 156, p. 222–226, 2012.
- LORETO, E.S., NUNES MARIO, D. A., SANTURIO, J. M., ALVES, S. H., NOGUEIRA, C. W., & ZENI, G. In vitro antifungal evaluation and structure–activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v.54(5), p. 572 – 576, 2011.
- MACIEL, E.N.; BOLZAN, R.C.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect δ -Aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, p. 310-319, 2000.
- MAINARDES, R. M. & EVANGELISTA R. C. Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**. v. 22(1), p. 13–24, 2005.
- MAJOREKA, K.A.; POREBSKIA, P. J.; DAYALA, A.; ZIMMERMAN, M. D.; JABLONSKA, K.; STEWARD, A.J.; CHRUSZCZ, MINOR, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology** v. 52, p. 174– 182, 2012.
- MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**. v. 94, p. 276–282, 2004.
- MEOTTI, F.C.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice, **Toxicology Letters**. v. 143, p. 9–16, 2003.
- MORA HUERTAS, C.E., FESSI, H., ELAISSARI, A., Polymer based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**.v. 385, p. 113–142, 2010.
- 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. **Int Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.
- NISHIYAMA, N. Nanomedicine: nanocarriers shape up for long life. **Nature Nanotechnology**. v. 2, p. 203 – 204, 2007.

NOGUEIRA, C.W, ZENI, G., ROCHA, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology, **Chemical Reviews**. v. 104, p. 6255–6285, 2004.

NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.Q. ZENI, G.; ROCHA, J.B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide, **Inflammation Research**. v. 52, p. 56–63, 2003^a.

NOGUEIRA, C.W.; MEOTTI, F.C.; CURTE, E. PILISSÃO, C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats, **Toxicology**. v. 183, p. 29–37, 2003^b.

OFOKANSI, K., WINTER, G., FRICKER, G., COESTER, C. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as a new approach to improve drug loading and delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 76, p. 1–9, 2010.

OZGUR, A.; LAMBRECHTA, Y. F.; OCAKOGLUB, K.; GUNDUZC, C.; YUCEBAS, M. Synthesis and biological evaluation of radiolabeled photosensitizer linked bovine serum albumin nanoparticles as a tumor imaging agent. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 422, p. 472–478, 2012.

PAIK, S.Y.R.; NGUYEN, H.H.; RYU, J.; CHE, J.H.; KANG, T.S. LEE, J.K.; SONG, C.W.; KO, S. Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. **Food Chemistry**. v. 141, p. 695–701, 2013.

PATIL, G.V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery, **Drug Development Research**. v. 58, p. 219–247, 2003.

PEREYRA, R., SCHMIDT, K. A., & WICKER, L. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45(9), p. 3448–3451, 1997.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J. R **Introdução à Espectroscopia**, tradução da 4a edição norte-americana, Ed. Cengage Learning, São Paulo, 2013.

PETERS T. JR., Serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**. v. 37, p. 161–245, 1985.

POSSER, T., MORETTO, M.B., DAFRE, A.L., FARINA, M., ROCHA, J.B, NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., FERREIRA, S.J., LEAL, R.B., FRANCO, J.L. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation, **Chemico-Biological Interactions**. v. 164, p. 126–135, 2006.

PRIGOL, M., BRUNING, C. A., MARTINI, F., & NOGUEIRA, C. W. Comparative Excretion and Tissue Distribution of Selenium in Mice and Rats Following Treatment with Diphenyl Diselenide. **Biological Trace Element Research**. v.150(1–3), p. 272–277, 2012.

PRIGOL, M., NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., BRONZE, M. R., CONSTANTINO, L. Physicochemical and Biochemical Profiling of Diphenyl Diselenide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 169, p. 885–893, 2013.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 49–60, 2012.

RECOMENDAÇÕES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL PARA COLETA DE SANGUE VENOSO (2ª edição). **Minha Editora**. ISBN 978-85-98416-94-6. 2010.

ROHIWAL, S.S.; SATVEKAR, R.K; TIWARI, A.P. RAUT, A.V.; KUMBHAR, S.G.; PAWAR, S.H.. Investigating the influence of effective parameters on molecular characteristics of bovine serum albumin nanoparticles. **Applied Surface Science**. v. 334, p. 157–164, 2015.

ROHIWALA, S.S.; TIWARIA, A.P ; VERMAB,G.; PAWAR, S.H. Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanoparticles for ex vivo colloidal stability in biological media. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 480, p. 28–37, 2015.

RONEY, C., KULKARNI, P., ARORA, V., ANTICH, P., BONTE, F., WU, A., MALLIKARJUANA, N.N., MANOHAR, S., LIANG, H.-F., KULKARNI, A.R., SUNG, H.-W. Targeted nano-particles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer's disease. **J. Control. Release** v.108, p.193–214, 2005.

ROSA, R.M.; HOCH, N.C.; FURTADO, G.V.; SAFFI, J. HENRIQUES, J.A.P.; DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research**. v. 633, p. 35–45, 2007.^a

ROSA, R.M., MOURA, D.J., SILVA, A.C.R., SAFFI, J., HENRIQUE, J.A. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese Hamster V79 cells. **Mutation Research**. v. 631, p. 44–54, 2007.^b

ROSA, R.M.; FLORES, D.G.; APPELT, H.; BRAGA, J.A.P.; HENRIQUES, R.R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice, **Neuroscience Letters**. v. 341, p. 217–220, 2003.

ROSSETI, I. B., ROCHA, J. B. T., & COSTA, M. S. Diphenyl diselenide (PhSe) 2 inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 29, p. 289-295, 2015.

ROSSETI, I. B., WAGNER, C., FACHINETTO, R., TAUBE JUNIOR, P., & COSTA, M. S. *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe) 2, (MeOPhSe) 2, (p-Cl-PhSe) 2, (F3CPhSe) 2] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, v. 54(6), p. 506-513, 2011.

SAFARI, J. & ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 85-99, 2014.

SANTOS, D. B. Avaliação dos efeitos de compostos orgânicos de selênio e de telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de células sanguíneas humanas.

2009. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

SANTOS, D.B.; SCHIAR V.P.P.; PAIXÃO, M.W.; MEINERZ, D.F.; NOGUEIRA C.W.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T.; BARBOSA, N.B.V. Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells in vitro. **Toxicology in Vitro**. v. 23, p. 1195–1204, 2009.^a

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, vol. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIAR,V.P.P.; DOS SANTOS, D.B.; LÜDTKE, D.S.; VARGAS, F.; PAIXÃO,M.W.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI,G.; ROCHA, J.B.T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**. v. 21, p. 139-145, 2007.

SILVA, M. M. C.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 612-15, 2001.

SITTA, D.L.A.; GUILHERME, M.R.; SILVA, E.P.; VALENTE, A.J.M.; MUNIZA, E.C.; RUBIRA, A.F. Drug release mechanisms of chemically cross-linked albuminmicroparticles: Effect of the matrix erosion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 122, p. 404–413, 2014.

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

SOSNIK, A.; CARCABOSO, A. M. ;J. GLISONI, R.J. ; MORETTON M. A.; CHIAPPETTA, D. A. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 62, p. 547–559, 2010.

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, p. 107–116, 2009.

VLACK, V.H.L. Arranjos Atômicos. **In:Princípios de Ciência dos Materiais**. São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda, Cap.3, p.45-75, 1970.

VISCIDO, A.; CAPANNOLO, A.; LATELLA, G.; CAPRILLI, R.; FRIERI, G. Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**. v. 8, p. 903–918, 2014.

WANG, S., SU, R., NIE, S., SUN, M., ZHANG, J., WU, D., & MOUSTAID-MOUSSA, N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **The Journal of nutritional biochemistry**. v. 25(4), p. 363-376, 2014.

WEBER, C., KREUTER, J., LANGER, K., Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 196, p. 197–200, 2000.

WILLIAMS, D.F. The Williams Dictionary of Biomaterials Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

WILSON, B.; AMBIKA, T.V.; KUMAR, R.D.; JENITA, J.L.; PRIYADARSHINI, S.R.B.. Nanoparticles based on albumin: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 51, p. 874– 878, 2012.

WILSON, B., LAVANYA, Y., PRIYADARSHINI, S. R. B., RAMASAMY, M., & JENITA, J. L. Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: preparation, characterization and pharmacodynamic studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 473(1), p. 73-79, 2014.

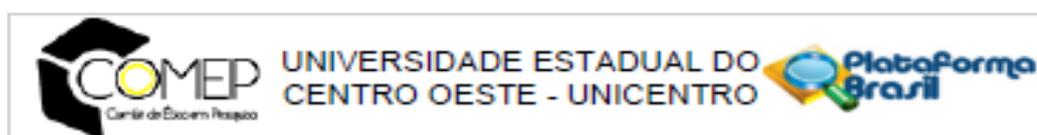
YADAV, R.; KUMAR, D.; KUMARI, A.; KUMAR, S. Encapsulation of catechin and epicatechin on bsa nps improved their stability and antioxidant potential. **EXCLI Journal**. v. 13, p. 331-346, 2014.

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**. v. 85, p. 398–405, 2013.

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 & Therapeutics**. v. 83, p. 761–9,2008.

7. ANEXOS

7.1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO DIFENIL DISSELENETO SOBRE ATIVIDADES ANTITUMORAL E CITOTÓXICA

Pesquisador: SUELEN DAIANE LADWIG

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47257215.0.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

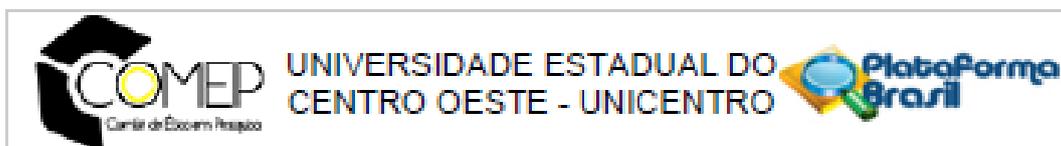
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.213.358

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO DIFENIL DISSELENETO SOBRE ATIVIDADES ANTITUMORAL E CITOTÓXICA, de interesse e responsabilidade do(a) proponente SUELEN DAIANE LADWIG. Nesta pesquisa será avaliada a citotoxicidade *in vitro* sobre hemácea. Serão coletado 5 mL de sangue total de três indivíduos voluntários, acima de 18 anos de idade, que estejam em perfeitas condições de saúde e que não estejam fazendo o uso de nenhum medicamento que possa interferir no ensaio. Esses pacientes voluntários serão convidados verbalmente para se dirigirem ao laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, onde farmacêuticos habilitados irão fazer a coleta do sangue com seringas e agulhas descartáveis, seguindo as boas práticas laboratoriais, em tubo de ensaio contendo 10L de heparina.. O sangue será centrifugado por 5 minutos a 4°C e 1200g e então será retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias será lavada com solução gelada de tampão fosfato 50 mM, 0,15mM de NaCl pH 7,4 por três vezes. As hemácias serão ressuspensas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, acertando-se o volume globular a 2,5%. Diferentes concentrações de nanopartículas de BSA contendo difenil disseleneto serão incubadas, com a solução de hemácias por 6 horas a 37°C, com constante homogeneização. Após, a solução será centrifugada a 1200g a 4°C por 5 minutos. O

Endereço: Rua Símeão Camargo Varela de Sá, 05 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3629-8177 Fax: (42)3629-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 1.213.268

conteúdo de hemoglobina será determinado no sobrenadante através da medida da absorbância em 540 nm (SILVA et al. 2001). Atividade citotóxica sobre leucócitos polimorfonucleares (LPMN): Serão coletados 5 mL de sangue total de três indivíduos adultos voluntários saudáveis, em tubo de ensaio contendo 10L de heparina que será misturado a uma solução de dextran 6%. Esta mistura

será deixada em repouso à temperatura ambiente por uma hora. Após, o plasma rico em LPMN será retirado e transferido para um tubo cônico que será centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante será descartado e o pellet de células lavado duas vezes com solução de NaCl 0,15 M que será novamente centrifugado por 10 minutos a 1500rpm. As células serão ressuspensas em aproximadamente 2 mL de solução de NaCl 0,15M

e contadas em câmara hematimétrica (CIZ & LOJEK, 1997). O efeito citotóxico das nanopartículas de BSA contendo difenil disseleneto sobre LPMN, será realizado através do teste de exclusão pelo Azul de Trypan, onde as células viáveis não incorporam o corante, apresentando-se brilhantes quando observadas em microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Os LPMN (1x10⁶ células/mL) serão incubados em PBS-Dulbecco na ausência

ou presença de várias concentrações dos antitumorais, por uma hora a 37°C. Após incubação, essa suspensão será misturada e homogeneizada por 5 minutos com uma solução de azul de Trypan 0,5%, na proporção 1:1. As células serão observadas em microscópio e contadas como coradas ou não coradas em câmara de Neubauer, e as células mortas serão calculadas em porcentagem (PHILLIPS, 1973). O controle será o mesmo número de células ressuspensas em PBS-Dulbecco.

Objetivo da Pesquisa:

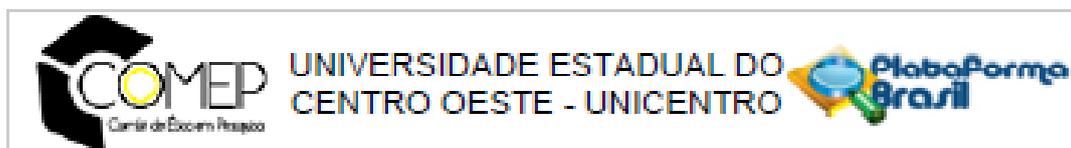
Desenvolver nanopartículas de BSA contendo difenil disseleneto com a finalidade de reduzir a toxicidade sobre hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para o paciente poderá ocorrer algum desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for inserida, visto que se trata de um procedimento invasivo, entretanto, logo desaparecerá. Poderá também surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa, que desaparecerá depois de algum tempo. O tipo de procedimento apresenta certo risco; que será reduzido pela permanência do braço esticado, sem dobrar, assim como compressas com gelo no local da coleta, que reduzirão o surgimento de manchas avermelhadas e roxas. Caso o paciente sinta-se lesado com as coletas, o pesquisador em questão prontifica-se em dar-lhe toda a assistência necessária. Para o coletor, os riscos que podem ocorrer são em relação à contaminação de possíveis doenças transmissíveis do sangue, porém, utilizando-se de maneira adequada as técnicas de

Endereço: Rua Símeão Camargo Versella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3829-8177 Fax: (42)3829-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 1.213.353

biossegurança, as chances de contaminação são mínimas.

Benefícios:

Contribuir com uma nova proposta farmacêutica, que reduza os efeitos colaterais que ocorrem durante a terapia utilizada no tratamento do câncer

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa apresenta relevância científica com método adequado para atingir aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- (1) Folha de rosto: adequada
- (2) Carta de anuência: anexada
- (3) TCLE: adequado
- (4) Cronograma: de acordo
- (5) Orçamento: de acordo
- (6) Projeto completo: anexado
- (7) Instrumento para coleta dos dados: não se aplica

Recomendações:

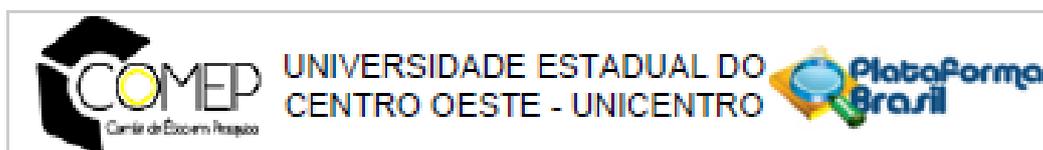
Resalta-se que segundo a Resolução 466/2012:

XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL - f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PARECER APROVADO: a presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012.

Endereço: Rua Simão Carneiro Varela de Sá, 53 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3620-8177 Fax: (42)3620-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 1.213.260

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO

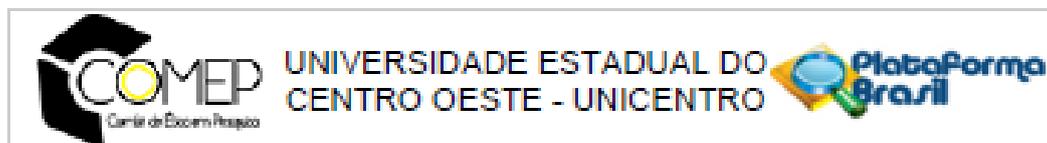
Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto-SUH.doc	15/06/2015 00:11:22		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	12021001.PDF	15/06/2015 15:16:14		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_537815.pdf	15/06/2015 15:19:36		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto NOVO.doc	30/06/2015 17:59:44		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE NOVO.doc	30/06/2015 18:00:12		Acelto
Outros	carta de aceite.pdf	30/06/2015 18:11:08		Acelto
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	30/06/2015 18:18:42		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_537815.pdf	30/06/2015 18:19:57		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MODELO-TCLE.doc	14/07/2015 14:05:37		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_537815.pdf	14/07/2015 14:33:54		Acelto
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	14/07/2015 14:34:00	SUELEN DAIANE LADWIG	Acelto
TCLE / Termos de	TCLE1.pdf	19/08/2015	SUELEN DAIANE	Acelto

Endereço: Rua Símeão Camargo Varela de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
 Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
 UF: PR Município: GUARAPUAVA
 Telefone: (42)3620-8177 Fax: (42)3620-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 1.213.358

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.pdf	10:22:14	LADWIG	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/08/2015 10:23:08	SUELEN DAIANE LADWIG	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_537615.pdf	19/08/2015 10:30:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GUARAPUAVA, 03 de Setembro de 2015

Assinado por:
Tatiane Barabieri
(Coordenador)

Endereço: Rua Simão Camargo Varela de Sá, 63 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carlí CEP: 85.040-080
UF: PR Município: GUARAPUAVA
Telefone: (42)3829-8177 Fax: (42)3829-8100 E-mail: comep_unicentro@yahoo.com.br