

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO  
DOUTORADO ASSOCIADO EM QUÍMICA UEL/UEPG/UNICENTRO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DEQ**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLÍMERICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO**

**GRACIELA LEILA HEEP**

**GUARAPUAVA**

**2019**

GRACIELA LEILA HEEP

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLÍMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL – UEPG – UNICENTRO como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes

GUARAPUAVA

2019

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

H458d Heep, Graciela Leila  
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo ácido ferúlico / Graciela Leila Heep. -- Guarapuava, 2019. xvi, 98 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica, 2019.

Orientador: Najeh Maissar Khalil  
Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes  
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Yohandra Reyes Torres, Eryza Guimarães de Castro, Renata Mello Giona, Élvio Antônio de Campos

Bibliografia

1. Química. 2. Nanopartículas. 3. Proteínas. 4. Modelos celulares. 5. Citotoxicidade. 6. Ácido ferúlico. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

GRACIELA LEILA HEEP

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLÍMÉRICAS CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Associação Ampla UEL-UEPG-UNICENTRO para a obtenção do título de Doutora em Química Orgânica.

Aprovada em 28 de agosto de 2019.

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil – Orientador - UNICENTRO

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yohandra Reyes Torres – UNICENTRO

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eryza Guimarães de Castro - UNICENTRO

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Mello Giona – UTFPR

Prof. Dr. Élvio Antônio de Campos - UNIOESTE

A versão original desse termo assinado encontra-se na Secretaria do Curso de Pós-Graduação.

GUARAPUAVA-PR  
2019

A quem eu não tive a oportunidade de  
conhecer, mas pra sempre vou amar.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Ao criador do Universo!

À minha família!

Meus pais, Ataídes e Eunice, que sempre estiveram do meu lado, sempre acreditaram em mim. Pai, mãe... é difícil conseguir escrever neste momento o quanto sou grata a vocês, não só por este título, mas por toda minha vida! Vocês estiveram presente em todos os momentos! Muito, muito obrigada! Esse título também é de vocês!

À minha irmã Simoni, meu cunhado Alde e minhas amadas sobrinhas, Gabriela e Isabelli. Simoni, obrigada pelas conversas nos finais de tarde! E à vocês dois, Simoni e Alde, obrigada pelas coisinhas mais amadas que tenho! Gabi, obrigada pela sua presença e seu carinho singelo e tão importante todos os dias! Isa, meu coração transborda quando você diz que quer ser cientista! Muito obrigada por tornarem meus dias tão mais felizes!

À Taís, Felipe, Tetê e Ana. Taís, você sempre foi mais que uma prima, prima-irmã. Muito obrigada por todo apoio, pelas longas conversas durante estes quatro anos, por toda uma vida de aventuras! Felipe, você entrou e somou! Tetê e Ana, vocês sempre deixaram meus dias mais leves!

À Raquel, por tornar meus dias muito mais divertidos, pela parceria incondicional! Obrigada por estar presente, por compartilhar choros e risadas!

Ao professor Najeh Khalil, por me receber em seu laboratório, pela confiança e orientação durante esses 4 anos. Serei sempre grata pela sua confiança!

À professora Rubiana Mainardes, pela coorientação.

Ao professor Bruno Sarmiento, por me receber em Portugal e permitir um grande desafio pra mim, mas também um período de grande aprendizagem.

Ao Adelmo Pletsch, pelo incentivo e apoio no início desta jornada.

À professora Sueli Quinaia, por me apresentar o Programa, me receber, me reencontrar e me encaminhar ao professor Najeh.

Ao professor Élvio, fonte de inspiração, àquele que me ensinou os conceitos básicos da Química. Minha eterna gratidão e admiração.

À Kathia, ao André e ao Thiago. Mesmo distantes fisicamente vocês sempre estiveram presentes! Obrigada amiga, irmã, não só pelo apoio nestes quatro anos,

mas pelo apoio na minha vida! Você sim é daquelas que levo pra vida toda! André, compadre, amigo de longa data, obrigada, logo estaremos comemorando a sua! Thiago, tia Gra esteve meio longe nos últimos tempos, mas lembra sempre de você!

A Tati Medeiros, amiga, meu anjo da guarda aqui, àquela que sempre me cuida, me ouve, me aconselha, está sempre perto, mesmo longe! Muito obrigada por sempre estar presente, por ter sido tão importante nestes quatro anos, antes deles e sei que depois deles também! Por ter feito aquilo que sempre foi necessário! Você me fez mais forte!

À Taís, Gustavo, Nathalia e André. Taís, muito obrigada pela família que você foi pra mim em Portugal e por continuar presente sempre! Gustavo, eterno aluno e amigo pra sempre! Nath, obrigada por cada momento, das lágrimas até as maiores gargalhadas. André, pelas conversas e cafés, eles sempre fazem bem!

Ao Júlio e a Rossana. Rossana, obrigada pelo auxílio no trabalho, pela amizade e pela parceria ao longo de um ano! Júlio sem dúvida nenhuma levarei sua amizade e parceria para sempre! Obrigada pela grande ajuda, principalmente nos momentos que mais precisei. Tenho muito orgulho de você!

À Rafaela, colega, que se tornou uma amiga querida, aquelas coisas boas do doutorado!

À Samily, que ajudava a aliviar meu estresse nos dias mais cansativos, obrigada por todo aquele sofrimento físico que me fazia tão bem!

À Andreia Almeida, que me ensinou pacientemente durante o período que estive em Portugal e, sempre esteve disposta a me auxiliar quando precisei! Como sempre digo você foi meu anjo em Portugal.

À Ana Costa, que brevemente, mas em um momento de grande importância esteve ao meu lado em Portugal, no HPLC, nas células e brilhantemente me tirava dúvidas, me explicava, me orientava.

À dona Isabel, que sempre me deu os melhores abraços em Portugal. A senhora sempre animou meus dias lá!

À Juliane Bocardi, parceira desde o início dessa trajetória. Por compartilhar os melhores e piores momentos desses quatro anos!

Ao Ilton Baraldi, por sempre estar disponível para me auxiliar com a liofilização das amostras.

À UNICENTRO, em especial ao PPGQ – Unicentro, professores, técnicos, funcionários. Sem o trabalho de vocês nada disso seria possível.

A todos os colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica com os quais convivi ao longo destes quatro anos.

Ao C-labmu/UEPG, pela realização das análises de caracterização físico-química das nanopartículas, especialmente à Vanessa, técnica da Microscopia.

À UTFPR, pelo afastamento concedido durante estes quatro anos.

À Capes, pela bolsa concedida no PDSE, que viabilizou a realização de parte deste trabalho em Portugal.

Agradeço a todos que passaram na minha vida por este período tão intenso e de tanto aprendizado. Àqueles que pude compartilhar minhas angústias, compartilhar minha pesquisa, me divertir, chorar, aos que me deram suporte e até mesmo aqueles que me criticaram! Muito obrigada a todos vocês, foram vocês que todos os dias me tornaram mais forte e tornaram a realização deste sonho possível!

MUITO OBRIGADA!

*“O conhecimento nos faz responsáveis.”*

*Che Guevara*

*“...I've worked hard for a long time and it's not about winning, but what it's about is not giving up. If you have a dream, fight for it. If there's a discipline or a passion, it's not about how many times you get rejected or you fall down or get beaten up, it's about how many times you stand up and are brave and keep on going...”*

*Lady Gaga*

HEEP, G. L. Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas Contendo Ácido Ferúlico [tese]. Guarapuava: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2019.

## RESUMO

O ácido ferúlico (AF) é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos. Para administração via oral possui limitações na sua eficácia terapêutica. Apresenta baixa solubilidade em água, capacidade reduzida de penetrar membranas biológicas e baixa absorção celular. O uso de sistemas nanocarreadores pode ser uma alternativa para melhorar os aspectos físico-químicos e de biodisponibilidade. Foram desenvolvidos dois sistemas carreadores com AF, um com caseína e outro com zeína-caseína-lisina. As nanopartículas de caseína foram obtidas por meio do método de dessolvatação, enquanto as de zeína-caseína-lisina foram obtidas por meio do método de dispersão líquido-líquido. As formulações desenvolvidas tiveram seu diâmetro médio (DM), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta determinados por meio de medidas realizadas de Espalhamento Dinâmico de Luz. Para as nanopartículas de caseína obtiveram-se DM de 170 nm e IPD de 0,26 e potencial Zeta -23 mV, enquanto para o sistema zeína-caseína-lisina obteve-se DM de 200 nm e IPD de 0,17 e potencial Zeta -26 mV. A quantificação do AF foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodo (DAD) obtendo-se uma eficiência de encapsulação (EE) de 26% para as partículas de caseína e 23% para o sistema zeína-caseína-lisina. As partículas obtidas foram caracterizadas por meio de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), difratometria de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG). As fotomicrografias confirmaram o tamanho e a morfologia esférica das partículas. O FT-IR não indicou a formação de novos grupos funcionais, enquanto que nos difratogramas não houve picos de difração característicos de estrutura cristalina do AF, indicando que houve uma incorporação deste no sistema nanoestruturado, sugerindo a amorfização do composto. As nanopartículas de zeína-caseína-lisina foram avaliadas, também, quanto a sua citotoxicidade contra células Caco-2 e HT29-MTX, duas linhagens intestinais, para verificar sua biocompatibilidade e segurança. Além disso, ensaios de permeabilidade intestinal monocultura Caco-2 e co-cultura Caco-2/HT29-MTX demonstraram-se satisfatórios para esse sistema carreador de AF.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanopartículas, proteínas, modelos celulares, citotoxicidade, ácido ferúlico.

HEEP, G. L. Development and Characterization of Polymeric Nanoparticles Containing Ferulic Acid [thesis]. Guarapuava: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2019.

## ABSTRACT

Ferulic acid (FA) is a phenolic compound belonging to the class of hydroxycinnamic acids. For oral administration has limitations in its therapeutic efficacy. It has low water solubility, reduced ability to penetrate biological membranes and low cell absorption. The use of nanocarrier systems can be an alternative to improve the physicochemical and bioavailability aspects. Two carrier systems with PA were developed, one with casein and one with zein-casein-lysine. Casein nanoparticles were obtained by the desolvation method, while those of zein-casein-lysine were obtained by the liquid-liquid dispersion method. The formulations developed had their mean diameter (DM), polydispersion index (IPD) and Zeta potential determined by Dynamic Light Scattering measurements. For casein nanoparticles, 170 nm DM and 0.26 IPD and Zeta-23 mV potential were obtained, while for zein-casein-lysine system, 200 nm DM and 0.17 IPD and Zeta potential were obtained. -26 mV. The quantification of the FA was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD) obtaining an encapsulation efficiency (EE) of 26% for casein particles and 23% for zein-system. casein-lysine. The obtained particles were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD) and field emission scanning electron microscopy (SEM-FEG). Photomicrographs confirmed the size and spherical morphology of the particles. The FT-IR did not indicate the formation of new functional groups, while in the diffractograms there were no characteristic diffraction peaks of FA crystal structure, indicating that it was incorporated into the nanostructured system, suggesting the amorphization of the compound. Zein-casein-lysine nanoparticles were also evaluated for cytotoxicity against Caco-2 and HT29-MTX cells, two intestinal strains, to verify their biocompatibility and safety. In addition, Caco-2 monoculture intestinal permeability and Caco-2 / HT29-MTX co-culture assays proved satisfactory for this FA carrier system.

**KEYWORDS:** Nanoparticles, proteins, cellular models, cytotoxicity, ferulic acid.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estruturas moleculares para os aminoácidos Serina, Prolina e Cisteína. .	22
<b>Figura 2:</b> Representação de uma micela de caseína. ....	23
<b>Figura 3:</b> (a) Modelo de estrutura secundária da proteína zeína, aminoácidos apolares organizados em estrutura circular repetidos pela união dos segmentos polares (hélices). As nove hélices unidas em figura plana, sendo 'Up' a direção do término NH <sub>2</sub> para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto 'Dn' indica a direção oposta. (b) Arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina, parte polar estendidas nas extremidades da cadeia molecular. ....	25
<b>Figura 4:</b> Estrutura básica para um aminoácido. R <sup>1</sup> é a cadeia lateral que difere um aminoácido do outro. ....	26
<b>Figura 5:</b> Estrutura molecular para o aminoácido Lisina. ....	27
<b>Figura 6:</b> Representação da formação dos radicais livres a partir do oxigênio molecular. ....	28
<b>Figura 7:</b> Estrutura molecular para o AF. ....	30
<b>Figura 8:</b> Mecanismo de ressonância do radical fenoxila, derivado do AF. ....	34
<b>Figura 9:</b> Representação da distribuição eletrônica para o AF. Orbitais HOMO e LUMO. ....	35
<b>Figura 10:</b> Representação do processo de obtenção de nanopartículas pelo método de dessolvatação. ....	49
<b>Figura 11:</b> Distribuição de tamanho de uma amostra representativa de nanopartículas de caseína contendo AF. Diâmetro médio de 179 nm e índice de polidispersão 0,26. ....	58
<b>Figura 12:</b> Espectros de FT-IR: Mistura física dos componentes das Nps Cas-AF (A); Lisina (B); AF (C); Nanopartícula de caseína carregadas com AF (D); Nanopartícula de caseína (E); Caseína (F). ....	60
<b>Figura 13:</b> Difractogramas para o AF (A); caseína (B); lisina (C); mistura física dos componentes das Nps Cas-AF (D); nanopartículas de caseínas carregadas com AF (E) e nanopartículas de caseína (F). ....	63
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografias das nanopartículas de caseína carregadas com AF observadas por MEV-FEG, com aumento de 40000X (imagem da esquerda) e 53000X (imagem da direita). ....	64
<b>Figura 15:</b> Curva analítica de AF solubilizado em etanol e diluído em acetonitrila. Fase móvel: CH <sub>3</sub> COOH 0,5%:ACN (70:30, v/v), fluxo de 0,9 ml/min, detecção no comprimento de onda de 310 nm, volume de injeção de 10 µL. ....	65
<b>Figura 16:</b> Cromatogramas de nanopartículas de caseína (Nps Cas) e nanopartículas de caseína carregadas com AF (Nps Cas-AF) para demonstração da especificidade do método. ....	66
<b>Figura 17:</b> Representação do processo de obtenção de nanopartículas de zeína-caseína-lisina pelo método de dispersão líquido-líquido. ....	73

<b>Figura 18:</b> Distribuição de tamanho de uma amostra representativa de nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF. Diâmetro médio de 199 nm e índice de polidispersão 0,17.....	78
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografias de nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF, em agregados (A) e isoladas (B).....	79
<b>Figura 20:</b> Espectros de FT-IR: (A) Mistura física; (B) Lisina; (C) Ácido Ferúlico; (D) Nanopartícula de zeína-caseína-lisina carregadas com AF; (E) Zeína; (F) Caseína.....	81
<b>Figura 21:</b> Difratoogramas de DRX do AF livre (A); caseína (B); zeína (C); lisina (D); mistura física (E) e nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF (F). .....	83
<b>Figura 22:</b> Perfil de liberação do AF de nanopartículas de zeína-caseína-lisina em solução salina tamponada com fosfato (PBS; 50 mM, pH 7,4). Os valores são relatados como média $\pm$ DP (n = 3 $\pm$ DP).....	85
<b>Figura 23:</b> Viabilidade celular de nanopartículas de zeína-caseína-lisina (Nps Zein); nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zein-AF) e AF livre sobre linhagens celulares Caco-2 (A) e HT29-MTX (B) em concentrações de 0,01 a 1000 $\mu$ g/mL após 24 h de incubação. Valores foram relatados como média $\pm$ DP (n = 3). ANOVA de dois fatores com teste de Tukey (* p <0,05). .....	86
<b>Figura 24:</b> Viabilidade celular de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zei-FA) e AF livre contra linhagem celular Caco-2 (A) e HT29-MTX (B) nas concentrações de 100 e 300 $\mu$ g/mL após 4 h de incubação. Valores foram relatados como média $\pm$ DP (n = 3). ANOVA de dois fatores com teste de Tukey (* p <0,05). .....	87
<b>Figura 25:</b> Perfil de permeabilidade cumulativa <i>in vitro</i> e porcentagem de TEER de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zei-AF) e AF livre através do modelo de monocultura Caco-2 (A) e co-cultura Caco-2/HT29-MTX (B). Todos os experimentos foram realizados a partir do compartimento apical para basolateral em HBSS a 37 °C. Os valores foram relatados como média $\pm$ DP (n = 3). .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Níveis de AF total em grãos, frutas, vegetais e alimentos industrializados. .....	31
<b>Tabela 2:</b> Otimização de parâmetros para obtenção das nanopartículas a partir de caseína.....	50
<b>Tabela 3:</b> Resultados obtidos para a otimização das nanopartículas de caseína.....	54
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros para nanopartículas de caseína carregadas com AF (Nps Cas-AF), nanopartículas de caseína carregadas com AF liofilizadas (Nps Cas-AF*) e nanopartículas de caseína (Nps Cas-B07).....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido ferúlico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
CA	Califórnia
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
Caco-2 (clone C2BBE1)	Linhagem de células tumorais intestinais
CaHPO <sub>3</sub>	Fosfito de cálcio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Espalhamento Dinâmico da Luz
DL50	Dose letal mediana
DM	Diâmetro médio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
EE	Eficiência de encapsulação
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FT-IR	Espectroscopia na Região do Infra Vermelho com Transformada de Fourier
Glu	Glutaraldeído
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
HT29-MTX	Linhagem de células tumorais intestinais
IPD	Índice de Polidispersão
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
MCT's	Triglicerídeos de cadeia média
Min	Minutos
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio

NY	Nova York
Nps Cas-AF	Nanopartículas de caseína carregadas com ácido ferúlico
Nps Cas-AF*	Nanopartículas de caseína carregadas com ácido ferúlico e liofilizadas
Nps Cas-B-01	Nanopartículas de caseína 01
Nps Cas-B-02	Nanopartículas de caseína 02
Nps Cas-B-03	Nanopartículas de caseína 03
Nps Cas-B-04	Nanopartículas de caseína 04
Nps Cas-B-05	Nanopartículas de caseína 05
Nps Cas-B-06	Nanopartículas de caseína 06
Nps Cas-B-07	Nanopartículas de caseína 07
Nps Zei	Nanopartículas de zeína-caseína-lisina
Nps Zei-AF	Nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com ácido ferúlico
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PET	Polietileno
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de acidez
pK	Constante de dissociação
PLGA	Ácido láctico co-glicólico
Pro	Prolina
R	Cadeia lateral
TEER	Resistência elétrica transepitelial
UK	<i>United Kingdom</i> – Reino Unido
UV	Ultravioleta
ZS	Zeta Sizer

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
REFERÊNCIAS.....	18
<b>2 CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA .....	20
2.2 CASEÍNA.....	21
2.3 ZEÍNA.....	24
2.4 LISINA.....	26
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	28
2.6 ÁCIDO FERÚLICO.....	30
2.6.1 Fontes Naturais .....	30
2.6.2 Propriedades Físico-Químicas e Atividade Antioxidante .....	32
2.6.3 Propriedades Farmacocinéticas .....	35
2.6.4 Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Indicações Terapêuticas.....	38
REFERÊNCIAS.....	40
<b>3 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CASEÍNA CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO</b> .....	<b>48</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	48
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	49
3.2.1 Materiais.....	49
3.2.2 Desenvolvimento das Nanopartículas .....	49
3.2.3 Adaptação da validação da metodologia analítica para quantificação do AF por CLAE .....	50
3.2.4 Eficiência de Encapsulação.....	51
3.2.5 Caracterização Físico-Química .....	52
3.2.5.1 <i>Análise do Tamanho Médio, Índice de Polidispersão e Carga Superficial</i> .....	52
3.2.5.2 <i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i> .....	52
3.2.5.3 <i>Difratometria de Raios X</i> .....	53
3.2.5.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)</i> .....	53
3.2.5 <i>Análise estatística</i> .....	53
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.3.1 Obtenção das Nanopartículas .....	53
3.3.2 Caracterização físico-química .....	56
3.3.2.1 <i>Diâmetro médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta</i> .....	56
3.3.2.2 <i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i> .....	58
3.3.2.3 <i>Difratometria de Raios X</i> .....	62
3.3.2.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG)</i> .....	63
3.3.3 Adaptação da validação da metodologia analítica para quantificação do AF por CLAE .....	64
3.3.4 Eficiência de Encapsulação.....	66
3.4 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
<b>4 CAPÍTULO IV: SISTEMA MULTICOMPOSTO ZEÍNA-CASEÍNA-LISINA É EFICAZ</b>	

<b>NA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE ÁCIDO FERÚLICO .....</b>	<b>71</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	71
4.2 METODOLOGIA.....	72
4.2.1 Materiais.....	72
4.2.2 Preparação das Nanopartículas .....	73
4.2.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação .....	74
4.2.4 Propriedades Físico-Químicas das Nanopartículas .....	74
4.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) .....	75
4.2.6 Difratomia de Raios X .....	75
4.2.7 Ensaio de Liberação <i>in vitro</i> .....	75
4.2.8 Ensaio de Permeabilidade Intestinal <i>in vitro</i> .....	75
4.2.8.1 Ensaio de viabilidade celular .....	75
4.2.8.2 Ensaio de permeabilidade .....	76
4.2.9 Análise Estatística .....	77
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.3.1 Preparação das Nanopartículas e Caracterização .....	77
4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) .....	80
4.3.3 Difratomia de Raios X .....	82
4.3.4 Ensaio de Liberação <i>in vitro</i> .....	84
4.3.5 Permeabilidade Intestinal <i>in vitro</i> .....	85
4.3.5.1 Ensaio de viabilidade celular .....	85
4.3.5.2 Ensaio de permeabilidade intestinal <i>in vitro</i> .....	88
4.4 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
<b>5 CAPÍTULO V: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>96</b>
ARTIGO PUBLICADO NA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i> .....	96
ARTIGO SUBMETIDO NA QUÍMICA NOVA.....	97

## 1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

Nanotecnologia & Nanociência é um termo usado para referir-se ao estudo de manipulação da matéria numa escala atômica e molecular, ou seja, é a ciência e tecnologia que foca nas propriedades dos materiais de tamanho nanométrico. O principal objetivo é criar novos materiais, novos produtos e processos a partir da capacidade moderna de manipular átomos e moléculas (MATTOS, 2013).

O termo foi citado pela primeira vez por Richard Feynman em dezembro de 1959 e definido pela Universidade Científica de Tóquio, no ano de 1974. Mas foi somente a partir do ano de 2000 que a nanotecnologia começou a ser desenvolvida e testada em laboratórios (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

A área farmacêutica é uma das grandes beneficiadas com o uso da nanotecnologia, pois a técnica permite melhorar parâmetros como, distribuição, toxicidade e biodisponibilidade, no desempenho de fármacos. A associação de um fármaco a uma nanopartícula polimérica faz com que esse tenha suas características físico-químicas associadas ao nanocarreador (FREIBERG e ZHU, 2004).

Assim a nanotecnologia vem avançando constantemente na área farmacêutica buscando criar novos produtos e processos com melhores parâmetros no desempenho de compostos, já que a encapsulação de um composto por um polímero permite que este adquira as características físico-químicas do polímero, melhorando sua biodisponibilidade e diminuindo efeitos nocivos (FREIBERG e ZHU, 2004; DIMER et al., 2013).

A busca por polímeros alternativos, de baixo custo e que sejam biocompatíveis, é importante para o desenvolvimento contínuo desta área. A caseína e a zeína, são polímeros biocompatíveis (CHANG et al., 2017) e com custo baixo, quando comparados aos polímeros utilizados frequentemente. Além disso, suas estruturas anfifílicas permitem boa interação com compostos polares e apolares.

O ácido ferúlico (AF) possui atividade antioxidante comprovada (MANCUSO; SANTANGELO, 2014) e de grande importância, principalmente em uso tópico. Possui atividade antitumoral comprovada (SRINIVASAN; SUDHEER; MENON,

2007), mas sua biodisponibilidade é baixa. Assim, o processo de nanoencapsulação pode tornar este composto mais eficiente e específico em sua ação.

Deste modo, este trabalho objetivou o desenvolvimento de sistemas carreadores para o AF. Foram desenvolvidas duas nanopartículas, a partir de polímeros naturais, a caseína e a zeína. Essas tiveram sua eficiência de encapsulação (EE) determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e foram caracterizadas físico-quimicamente. Para a caracterização físico-química realizou-se a medida do diâmetro médio (DM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difratometria de raios X (DRX).

Como as partículas de zeína possuem resistência gastro-intestinal, essas ainda foram avaliadas frente a duas linhagens celulares intestinais quanto a citotoxicidade e também foi avaliado sua permeação intestinal em modelos de cultura e co-cultura celular.

Para melhor organização dos dados, esta tese foi dividida em capítulos. O Capítulo II traz uma revisão bibliográfica geral abordando nanotecnologia farmacêutica, bem como uma breve leitura sobre os componentes utilizados na formulação das nanopartículas, caseína, zeína e lisina; estresse oxidativo e atividade antioxidante e o ácido ferúlico (AF). O capítulo III aborda as nanopartículas de caseína, seu processo de obtenção e sua caracterização físico-química. O capítulo IV traz os resultados obtidos para as nanopartículas de zeína, obtenção, caracterização físico-química e os ensaios biológicos. Para finalizar, no capítulo V as considerações finais deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

CHANG, C.; WANG, T.; HU, Q.; LUO, Y. Zein/caseinate/pectin complex Nanoparticles: Formation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 117-124, 2017.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 118, 2004.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic Acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chemistry Toxicology*, v. 65, p. 185-195, 2014.

MATTOS, A, C. Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas contendo Resveratrol e Avaliação da ação Neuroprotetora sobre um modelo Experimental de Doença de Parkinson. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Associação Ampla Unicentro e UEPG, Guarapuava, 2014.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 561 – 5732, 2006.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 40, p. 92-100, 2007.

## 2 CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia & nanociência vem revolucionando o mundo da ciência, trazendo muita expectativa a este setor que tem como principal característica sua diversificação. As áreas de aplicação da nanotecnologia abrangem praticamente todos os setores industriais e de serviços. A multiplicidade de aplicações é imensa e demanda conhecimentos multidisciplinares, baseados na física, química, biologia, ciência e engenharia de materiais, computação, entre outras áreas (MOHANRAJ e CHEN, 2004).

A nanotecnologia farmacêutica surgiu a partir de meados de 1960, quando o grupo liderado por Gregoriadis (1974) e o grupo de Bangham (1983) iniciavam estudos a partir de lipossomas. Esses sistemas serviram de base para a explosão de um grande número de nanoestruturas adequadas à liberação de fármacos produzidos na sua grande maioria a partir de lipídios ou de compostos poliméricos (COUVRER e VAUTHIER, 2006).

Embora esta seja uma área relativamente nova, quando comparada a outras áreas da Ciência e Tecnologia, as vantagens ocasionadas pela nanoencapsulação de fármacos e compostos bioativos vem propiciando a comercialização de várias formulações com sucesso enquanto outras passam por ensaios clínicos (LINDNER, 2014).

As nanopartículas poliméricas têm atraído atenção dos pesquisadores devido as suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento. Dentre os polímeros existentes, os biodegradáveis são os candidatos preferidos para o desenvolvimento de nanopartículas, pois podem atuar controlando e sustentando a liberação de fármacos, além de serem facilmente eliminados do organismo (SCHAFFAZICK et al., 2003; RIEUX et al., 2006; FREIBERG e ZHU, 2004).

Os primeiros polímeros sintéticos que demonstraram sucesso em seu uso foram os derivados dos ácidos lático e glicólico, utilizados para suturas na década de 1960. Outra tendência é o uso de polímeros que apresentam degradação por hidrólise mais acentuada, pois possuem degradação mais previsível no organismo

do que os que possuem degradação enzimática mais acentuada, que dependendo do local de aplicação podem apresentar diferenças significativas no tempo de degradação. A natureza dos polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema. Os principais critérios na seleção de um polímero são a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a sua velocidade de degradação (RIEUX et al., 2006; NAIR e LAURENCIN, 2007; MIR; AHMED; REHMAN, 2017).

A classe dos poli( $\alpha$ -ésteres) é a mais antiga e mais investigada dentre os polímeros com aplicação para o nanoencapsulamento de moléculas e fármacos. É empregada pela característica de biodegradabilidade e por serem passíveis de hidrólise predominantemente. Os poliésteres são representados pela poli(caprolactona), poli(D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA) (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Apesar da grande eficiência dos polímeros sintéticos, o processo de nanoencapsulação a partir destes ainda tem um custo elevado. Assim, para um contínuo desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica, é necessário investigar a eficiência de polímeros de fácil acesso e baixo custo.

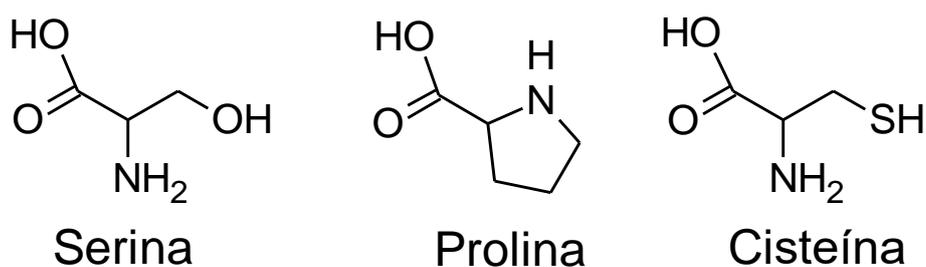
## 2.2 CASEÍNA

A caseína, um polímero natural, é a principal proteína do leite e faz parte da dieta diária em muitas partes do mundo. Ela é constituída por cerca de 94% de proteína e 6% de compostos de baixo peso molecular, designados coletivamente como fosfato de cálcio coloidal (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

As caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfato ligados à serina (P-Ser) (Figura1), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfipático) (SGARBIERI, 2005; ZINSLY et al, 2001). A proteína do leite, é constituída, principalmente, por quatro fosfoproteínas de caseína,  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  e  $\kappa$  caseína, que estão na proporção de 4 : 1 : 4 : 1 por peso. Seus pesos moleculares estão entre 19 e 25 kDa e seu ponto isoelétrico médio (pI) está entre 4,6 e 4,8. As quatro caseínas possuem caráter anfipático (GLAB e BORATYNSKI, 2017; ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

As caseínas  $\alpha$ S1 e  $\beta$ , que estão em maior proporção, apresentam alto teor de resíduos de prolina (Pro) (Figura 1) em suas estruturas, um aminoácido que tem como característica interromper a continuidade da estrutura secundária, principalmente as do tipo  $\alpha$ -hélice (SGARBIERI, 2005). Além disso, nenhuma das caseínas possui muitos resíduos de cisteína (Figura 1), que poderiam estabilizar a estrutura por meio da formação de pontes dissulfeto (GLAB e BORATYNSKI, 2017). Como consequência, a caseína tem uma estrutura bastante randomizada, flexível, com baixo grau de estrutura secundária e relativamente aberta (SGARBIERI, 2005; ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011). Assim, a caseína resiste a altas temperaturas, porém é facilmente desnaturada em pH's levemente ácidos e solventes orgânicos.

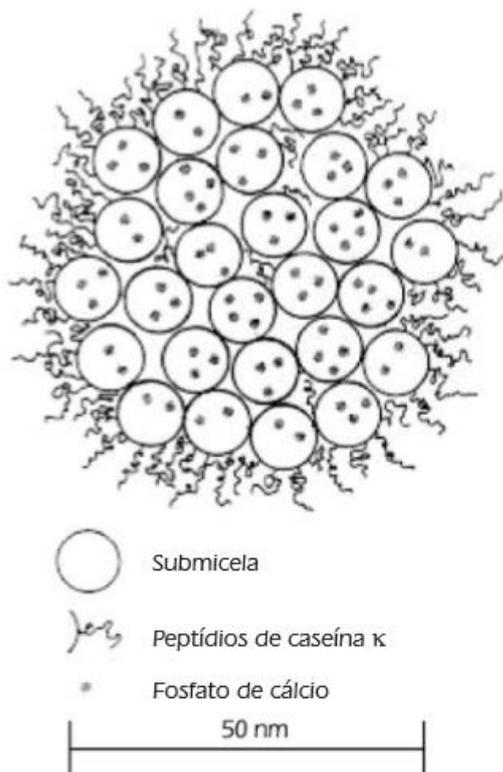
**Figura 1:** Estruturas moleculares para os aminoácidos Serina, Prolina e Cisteína.



**Fonte:** O autor.

Dentre as quatro caseínas, a mais ordenada e mais estável é a caseína  $\kappa$ . Suas regiões carboxiterminais são glicosiladas, permitindo a interação com o soro do leite por meio de interações hidrofílicas, e fazendo com que esta fique na parte externa da micela de caseína. Enquanto isso, as caseínas  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 e  $\beta$  se auto-ordenam em estruturas micelares estáveis por interações hidrofóbicas e através de *clusters* de fosfato de cálcio no interior da micela (HOLT et al., 2013). Estas micelas (Figura 2) estão estabilizadas como suspensão coloidal e são agregados, quase esféricos, com tamanho médio de 150 nm, variando de 50 a 500 nm (SGARBIERI, 2005; ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011). A micela de caseína esférica tem um interior hidrofóbico, cercado por uma camada hidrofílica que estabiliza a micela através de efeitos eletrostáticos (DE KRUIF et al., 2012; FARRELL et al., 2009) permitindo interação com compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

**Figura 2:** Representação de uma micela de caseína.



**Fonte:** SGARBIERI, 2005.

Devido à alta estabilidade das micelas de caseína, mesmo após o leite passar por processamentos para diversos produtos, a identidade estrutural básica da caseína é mantida (SEMO et al., 2007; DE KRUIF e GRINBERG, 2002). Essa característica, além do seu caráter anfipático, despertou o interesse por este polímero natural em vários campos como alimentos, cosméticos e medicamentos.

Semo e colaboradores (2007) demonstraram a possibilidade de encapsular vitamina D2, um composto fotossensível, em micelas de caseína. Foi demonstrado que o processo de nanoencapsulação poderia fornecer uma proteção parcial contra a degradação induzida pela luz UV para a vitamina D2 contida nelas. Além disso, o estudo demonstrou a alta afinidade da vitamina à caseína e sugeriu que as micelas de caseína podem ser úteis como nano-veículos para aprisionamento, proteção e entrega de nutracêuticos hidrofóbicos sensíveis.

Além do encapsulamento de nutracêuticos, a caseína é utilizada para o encapsulamento de uma série de fármacos e compostos bioativos (GLAB e

BORATYNSKI, 2017), dentre estes aqueles que combatem o estresse oxidativo no organismo provocado pelos radicais livres, em especial pelas espécies reativas de oxigênio, que estão associadas a diversas patologias, como câncer, problemas neurológicos e cardiovasculares (CHEN; HU; WANG, 2012).

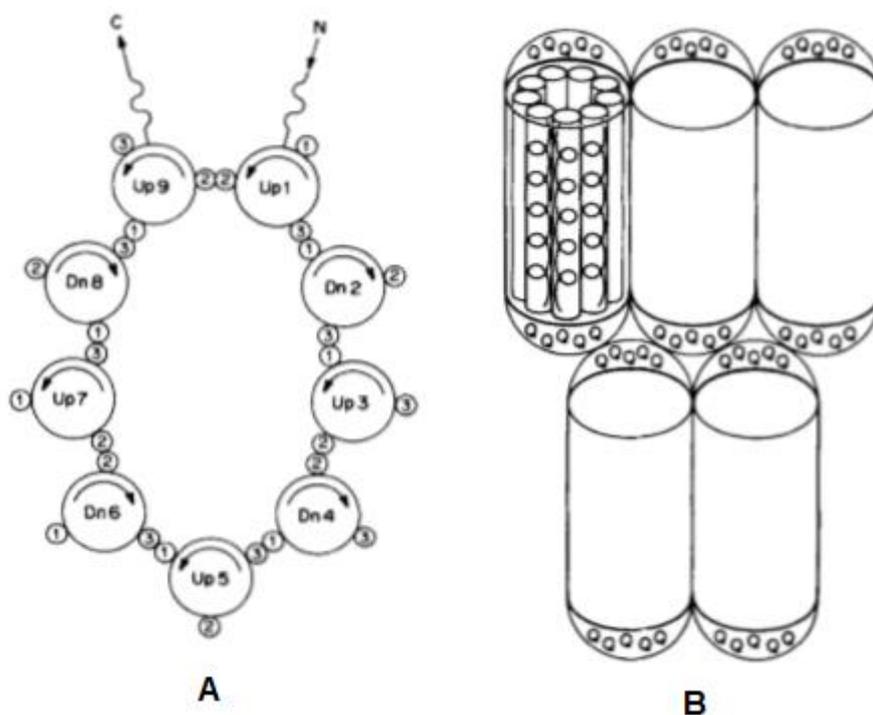
Assim, a caseína, um polímero natural de baixo custo possui propriedades que a tornam um bom candidato para desenvolvimento de sistemas nanoestruturados.

### 2.3 ZEÍNA

A zeína é uma proteína encontrada no milho, da classe das prolaminas. É insolúvel em água, sendo solúvel em soluções contendo no mínimo 70% de álcool, e quando precipita, tem a capacidade de formar filmes com a água. A interação intermolecular ocorre fazendo com que suas moléculas agreguem-se e formem filmes para o revestimento, sendo essa propriedade importante para o desenvolvimento de estudos na área farmacêutica, relacionados à formação de filmes gastrorresistentes (LAWTON, 2002).

A zeína é constituída de 17 aminoácidos, sendo a maioria apolares. Sua estrutura secundária (Figura 3) possui formato helicoidal (união dos aminoácidos polares e apolares). Os aminoácidos apolares estão organizados em estrutura circular, unidos através de três segmentos polares, repetidos em nove hélices sequenciais e antiparalelas em superfície plana molecular, formando um empilhamento dessas hélices por interações de resíduos de glutamina, parte polar nas extremidades da cadeia. As interações que estabilizam esta estrutura são as ligações hidrogênio e as Forças de Van der Waals (ARGOS et al., 1982).

**Figura 3:** (a) Modelo de estrutura secundária da proteína zeína, aminoácidos apolares organizados em estrutura circular repetidos pela união dos segmentos polares (hélices). As nove hélices unidas em figura plana, sendo 'Up' a direção do término NH<sub>2</sub> para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto 'Dn' indica a direção oposta. (b) Arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina, parte polar estendida nas extremidades da cadeia molecular.



**Fonte:** Adaptado de ARGOS et al., 1982.

Essa proteína é classificada por três diferentes frações, as quais se diferem por sua solubilidade e massa molar. Essas frações são chamadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -zeína. A  $\alpha$ -zeína corresponde a aproximadamente 80% do total da prolamina presente no milho, já as frações de  $\beta$ - e  $\gamma$ -zeína correspondem a 10-15% e 5-10%, respectivamente, dependendo do genótipo do grão (CORRADINI, 2014).

As nanopartículas a base de zeína demonstraram-se superiores quanto a repetibilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, quando comparadas a outras nanopartículas a base de proteínas, principalmente quando carregada com compostos lipofílicos. Suas nanopartículas são facilmente preparadas pelo método de dispersão líquido-líquido. No entanto, essas partículas tendem a se agregar quando armazenadas. Para contornar este problema, tem-se buscado agentes emulsionantes, como a caseína (CHANG et al., 2017).

A zeína vem sendo muito investigada também devido a sua resistência gastrointestinal, o que possibilita sua administração via oral. Lau e colaboradores

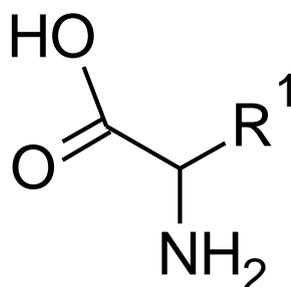
(2013) desenvolveram um sistema de micropartículas de zeína carregadas com hidroclotisona pelo método de coacervação. Esse sistema apresentou resistência ao processo digestivo no estômago e no intestino delgado, apresentando vantagens sobre os comprimidos disponíveis. Assim, como um dos objetivos é o desenvolvimento de nanopartículas gastrorresistentes, a zeína torna-se uma matriz polimérica viável.

## 2.4 LISINA

Os aminoácidos são um grupo de compostos aminados derivados de ácidos carboxílicos. Embora mais de 300 aminoácidos tenham sido descritos na natureza (CHAMPE; HARVEY; FERRIER. 2009) apenas 20 deles são encontrados como constituintes das proteínas de mamíferos (MORAN et al., 2013).

Nos 20 aminoácidos comuns, o grupo amino e carboxila estão ligados ao mesmo carbono, carbono- $\alpha$  (Figura 4). Assim, os aminoácidos encontrados em uma proteína são  $\alpha$ -aminoácidos. Além do grupo amino e da carboxila, ainda há dois outros substituintes ligados ao carbono- $\alpha$ , um hidrogênio e uma cadeia lateral (R), que é diferente em cada aminoácido. Com exceção da glicina, em que o grupo R é um átomo de hidrogênio, o aminoácido terá 4 ligantes diferentes, o que o torna uma molécula quiral (NELSON e COX, 2011; CHAMPE; HARVEY; FERRIER. 2009; MORAN et al., 2013).

**Figura 4:** Estrutura básica para um aminoácido. R<sup>1</sup> é a cadeia lateral que difere um aminoácido do outro.



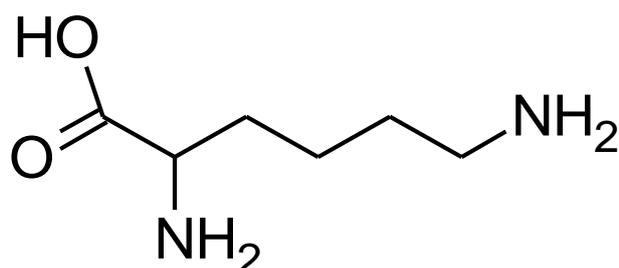
**Fonte:** O autor.

Em pH fisiológico (~7,4), o grupo carboxila e o grupo amino encontram-se ionizados. Nas proteínas, eles fazem a ligação peptídica, então o grupo R, que

confere as características ao aminoácido. Assim, eles são classificados em função da sua cadeia lateral (CAMPBELL e FARREL, 2007).

A lisina (Figura 5) é um aminoácido de cadeia lateral básica, altamente solúvel em água (MORAN et al., 2013), que foi descoberta em 1889 por Edmund Drechsel, que a isolou pela primeira vez a partir da caseína. Sua estrutura foi elucidada três anos depois. Em pH fisiológico, sua cadeia lateral apresenta-se carregada positivamente, assim, ela possui três valores de constante de dissociação (pKs). Estes diferentes valores são correspondentes à ionização do grupo carboxila da cadeia principal (pK=2,16), assim como a ionização do grupo amina da cadeia principal (pK=9,06) e grupo amina da cadeia lateral (pK=10,54) (VOET e VOET, 2013; CAMPBELL e FARREL, 2007; NELSON e COX, 2011; CHAMPE; HARVEY; FERRIER. 2009; MORAN et al., 2013).

**Figura 5:** Estrutura molecular para o aminoácido Lisina.



**Fonte:** O autor.

Em circunstâncias normais, um ser humano consome quantidade suficiente de lisina por meio da alimentação. A falta desse aminoácido pode ocasionar crescimento lento, fadiga, náusea, tontura, perda de apetite e distúrbios reprodutivos. É encontrada principalmente em alimentos ricos em proteínas como: carnes, frutos do mar, produtos à base de soja, leite e derivados (VOET e VOET, 2013; CAMPBELL e FARREL, 2007; NELSON e COX, 2011; CHAMPE; HARVEY; FERRIER. 2009; MORAN et al., 2013).

A L-lisina possui propriedades importantes para um crescimento normal e para manter uma boa saúde cerebral (HALLEN; JAMIE; COOPER, 2013). Estudos também demonstraram que ela auxilia no tratamento do herpes oral recorrente e acelera o processo de cicatrização (PEDRAZINI; ARAÚJO; MONTALLI, 2018). Além

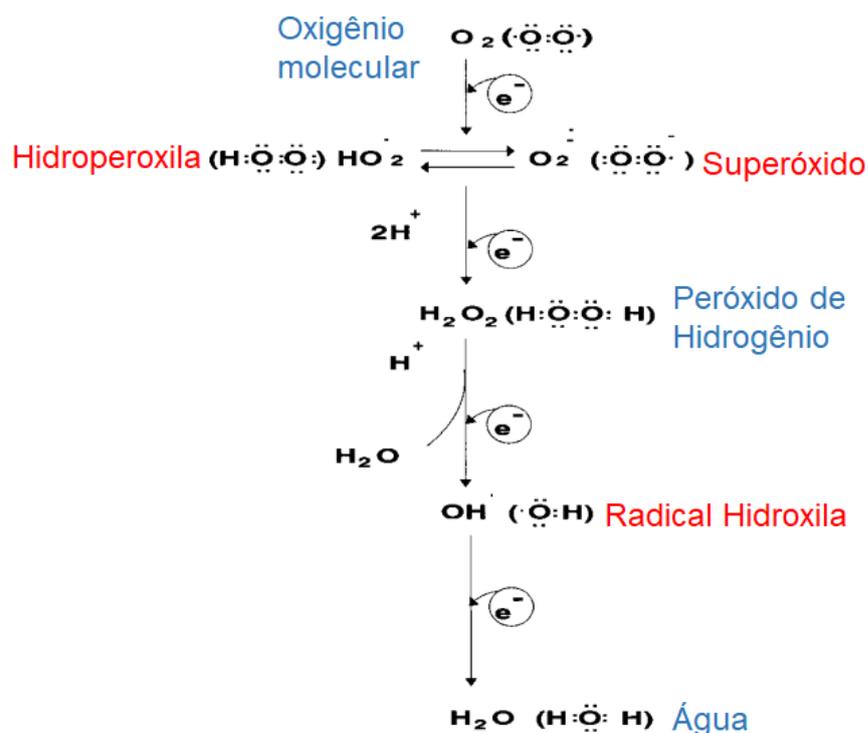
disso, ela já foi utilizada como agente estabilizante em nanopartículas poliméricas de caseína para encapsulamento de ácido fólico (PENALVA et al., 2015).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo é uma condição biológica que decorre da existência do desequilíbrio entre compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa antioxidante, levando ao aumento da produção de radicais livres. O simples ato de respirar pode levar a formação de radicais livres, que em pequenas quantidades, podem ser benéficas ao organismo (atuam como defesa). Mas, em grandes proporções, tem sérias consequências à saúde (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Os principais radicais livres são sintetizados a partir de oxigênio (Figura 6), capazes de oxidar compostos ou macromoléculas por meio da doação de elétrons. Caso estes radicais altamente energéticos não sejam neutralizados por substâncias antioxidantes, as reações de oxidação se propagam, afetando estruturas de proteínas, lipídeos e até mesmo de DNA celular (RAZZAGHI-ASL, et al., 2013).

**Figura 6:** Representação da formação dos radicais livres a partir do oxigênio molecular.



**Fonte:** Adaptado de FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

O estresse oxidativo provocado pelos radicais livres, em especial pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), está associado a diversas patologias, como câncer, problemas neurológicos e cardiovasculares (CHEN; HU; WANG, 2012).

O organismo humano apresenta defesas endógenas (enzimáticas e não enzimáticas) responsáveis em combater o estresse oxidativo gerado pelos radicais livres. Dentre as principais enzimas tem-se a glutatona peroxidase e a catalase, responsáveis pela eliminação de peróxido de hidrogênio; e a superóxido dismutase, responsável pela conversão do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio, para posterior degradação. As principais defesas não enzimáticas, produzidas pelo organismos, são a vitamina A e a coenzima Q10, responsáveis pela neutralização ou prevenção da formação de radicais livres (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Ainda que a eficiência do sistema antioxidante endógeno seja reconhecido, a complementação com antioxidantes de origem exógena, se torna de fundamental importância (CHEN; HU; WANG, 2012).

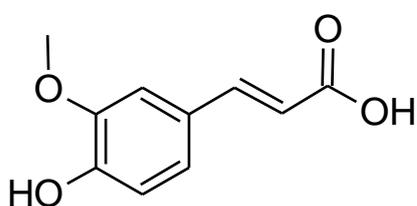
Antioxidantes podem ser definidos como “substâncias capazes de atrasar, prevenir ou remover danos oxidativos do organismo”. Os antioxidantes geralmente contém um grupo doador de elétrons, normalmente uma hidroxila ligada a um anel aromático, e podem desativar os radicais livres por meio de quatro mecanismos: transferência de átomo de hidrogênio, perda de próton seguida de transferência de elétron, transferência de elétron acoplada a transferência de próton (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013) ou por meio da complexação de metais de transição (LEOPOLDINI, RUSSO e TOSCANO, 2011).

Muitos compostos naturais bioativos têm se destacado em estudos relativos à atividades antioxidantes, como os polifenóis, classe que também contempla os flavonoides e outros subgrupos, como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008). Estudos comprovam a eficácia desses compostos naturais não apenas na prevenção do estresse oxidativo mas, também, na terapêutica do câncer, de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (ULLAH; KHAN, 2008).

## 2.6 ÁCIDO FERÚLICO

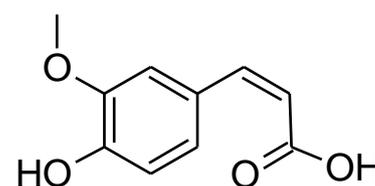
O AF (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos (WU et al., 2014). Foi extraído em 1866 a partir da planta *Ferula foetida*, que originou seu nome. Apenas em 1925 foi sintetizado quimicamente. Os isômeros *cis* e *trans* (Figura 7) foram separados em 1957 e em 1988 o AF teve sua estrutura confirmada por DRX (GRAF, 1992).

**Figura 7:** Estrutura molecular para o AF.



*Ácido trans-ferúlico*

**Fonte:** O autor.



*Ácido cis-ferúlico*

Nos últimos anos diversos estudos demonstraram que o AF atua como um potente antioxidante por sequestrar radicais livres, aumentando a resposta celular e inibindo a expressão ou atividade de enzimas citotóxicas e eliminando formas reativas derivadas do oxigênio (principalmente peróxidos e hidroxila) (MANCUSO e SANTANGELO, 2014; HARWANSH et al, 2015; KANSKI et al., 2001; KIM et al., 2013).

Esta revisão busca apresentar as fontes naturais do AF, assim como suas propriedades físico-químicas e atividade antioxidante, além disso, suas propriedades farmacocinéticas, formas farmacêuticas, vias de administração e indicações terapêuticas.

### 2.6.1 Fontes Naturais

O AF está presente em grãos, frutas, vegetais e alimentos industrializados (Tabela 1) (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). É encontrado nas folhas e sementes

de muitas plantas, especialmente farelo de milho e arroz, em todas as partes do trigo e aveia (WU et al., 2014). É abundante no café e pipoca (MANCUSO e SANTANGELO, 2014) e também pode ser encontrado em plantas como maçã, alcachofra, amendoim, laranja e abacaxi (WU et al., 2014; TROMBINO et al., 2013).

**Tabela 1:** Níveis de AF total em grãos, frutas, vegetais e alimentos industrializados.

	Conteúdo de AF (mg/100g)
<b>Grãos</b>	
Grãos de milho	174
Farelo de milho refinado	2610 – 3300
Farinha de milho	38
Grãos de trigo	64 – 127
Farelo de trigo fino	530 – 540
Farinha de trigo integral	89
Arroz integral	42
Aveia integral	25 – 35
Farelo de centeio	280
Farinha de centeio integral	86
<b>Frutas</b>	
Toranja	10,7 – 11,6
Laranja	9,2 – 9,9
Banana	5,4
Tomate	0,29 – 6
Maça	0,27 – 0,85
<b>Legumes</b>	
Brotos de bambu	243,6
Berinjela	7,3 – 35
Beterraba	7,3 – 19
Soja	13
Amendoim	8,7
Brócolis	4,1
Cenoura	1,2 – 2,8
<b>Alimentos e bebidas industrializados</b>	
Pipoca	313
Pão integral de centeio	54
Flocos de aveia integral	25 – 52
Café	9,1 – 14,3
Massas	12
Pão de trigo branco	8,2
Suco de laranja	3 – 4,4
Cerveja	0,24 – 0,9

Fonte: Adaptado de ZHAO e MOGHADASIAN, 2008.

O AF pode ser encontrado em tecidos vegetais na forma livre ou conjugada, e a soma destes dois representa o total de AF presente neste vegetal (CLIFFORD,

1999). Em alguns vegetais, como a berinjela, o AF livre representa de 50% a 90% do AF total (SAKAKIBARA et al., 2003). Por outro lado, em cereais, o AF livre representa apenas 0,1% a 0,5% do AF total (ADOM e LIU, 2002). A tabela 1 traz as principais fontes de AF.

Ainda não são relatados na literatura informações precisas sobre a ingestão dos ácidos fenólicos, mas estima-se que indivíduos que consumam diariamente frutas, verduras e bebidas ricas em polifenóis, tenham uma ingestão diárias de aproximadamente 1000 mg (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). No ocidente, a principal fonte dos ácidos fenólicos é o café e algumas bebidas de consumo regional, como o chimarrão, que leva no seu preparo a erva mate (*Ilex paraguariensis*) (OLIVEIRA E BASTOS, 2011).

Clifford (1999) relatou que pessoas com um hábito de consumir café, farelo de cereais, frutas cítricas e cerveja ingerem diariamente de 500 a 1000 mg de ácido cafeico e AF. O consumo de grãos integrais contribui significativamente para a ingestão diária de AF. Assim sendo, pode-se estimar que a soma do consumo de AF através do consumo de cereais, vegetais, frutas, café e sucos pode chegar a 150-250 mg/dia (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

### 2.6.2 Propriedades Físico-Químicas e Atividade Antioxidante

O AF possui fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_4$  e massa molecular de 194,18 g/mol. Em relação a sua estrutura molecular, o AF apresenta isomeria *cis-trans* (Figura 7), sendo a forma *trans* a mais comum na natureza. As duas formas encontram-se em estados físicos diferentes, a *cis* é um óleo amarelado, com absorção máxima ultravioleta de 316 nm, enquanto a forma *trans* é um sólido cristalino, esbranquiçado, com absorção máxima ultravioleta em 284 e 307 nm (GRAF, 1992).

Outra característica estrutural relevante são seus valores de pKa. O AF apresenta o grupamento carboxila, com um valor de pKa de 4,56 e o grupamento hidroxila ligado ao anel aromático com um pKa de 8,65 (MONTI et al., 2001). Assim, em pH fisiológico (7,4) o principal grupamento com atividade antioxidante, o grupo fenólico, ainda encontra-se protonado.

A solubilidade em água do AF é de ~0,4 mg/mL a 16 °C (ZHOU et al., 2015). As duas formas do AF apresentam resultados terapêuticos comprovados contra

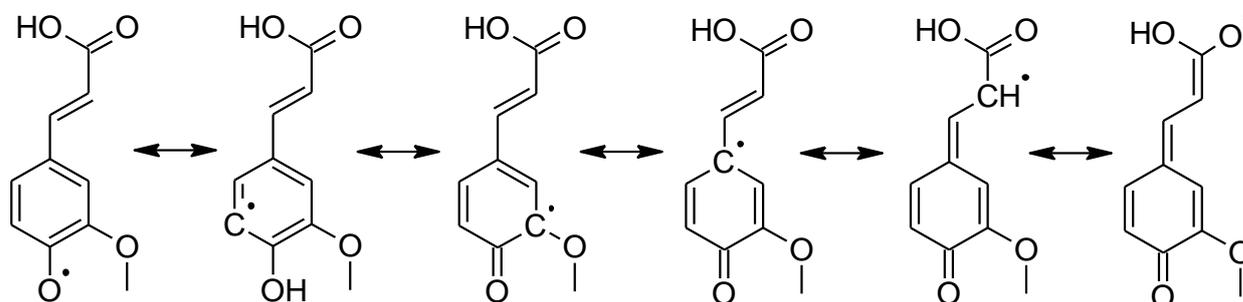
diversas patologias, dentre elas, câncer, diabetes, doenças cardíacas e neurodegenerativas, além de ações antimicrobiana, anti-inflamatória, e principalmente, a atividade antioxidante, responsável pelos seus principais benefícios e aplicações (SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

Os ácidos hidroxicinâmicos possuem atividade antioxidante relacionada a sua estrutura molecular. A ação antioxidante destes compostos se deve especialmente a sua capacidade de neutralizar três tipos de radicais livres: o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxila, reduzindo a degradação de proteínas e lipídeos. Além disso, o AF, também se mostrou efetivo na regulação e restauração de enzimas envolvidas no combate do estresse oxidativo (MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

O AF tem quatro características que respondem por sua ação antioxidante: (1) grupo hidroxila, ligado ao anel aromático, que se torna doador de elétrons e neutraliza as ERO's; (2) cadeia vinílica, que conecta a carbonila ao benzeno aumentando a estabilidade da molécula por ressonância, além de fornecer um local de ataque adicional aos radicais livres; (3) a metoxila, que estabiliza a molécula por meio de uma ligação de hidrogênio com a hidroxila e (4) a ancoragem do grupamento carboxílico às membranas celulares, protegendo contra a peroxidação lipídica (RAZZAGHI-ASL et al., 2013; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007; TEIXEIRA et al., 2013).

No momento da reação, o hidrogênio do grupo fenólico é transferido ao radical livre, estabilizando-o e formando um radical fenoxila, derivado da molécula de AF. Este radical formado é altamente estabilizado por ressonância, uma vez que o elétron desemparelhado deslocaliza-se por toda a molécula (Figura 8). Devido a esta ressonância, o radical fenoxila tem baixa reatividade, não sendo capaz de propagar reações em cadeia (GRAFF, 1992).

**Figura 8:** Mecanismo de ressonância do radical fenoxila, derivado do AF. (Adaptado de PAIVA et al., 2013).

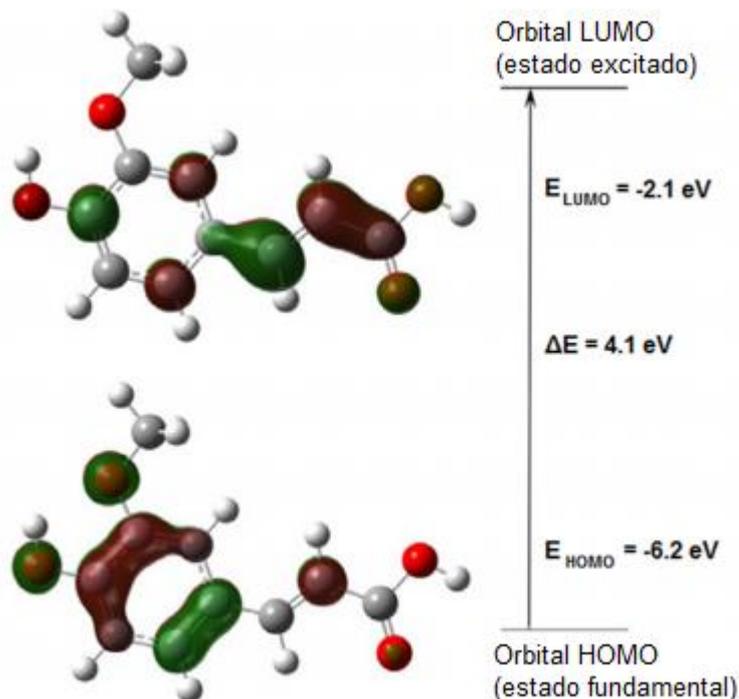


Fonte: O autor.

O mecanismo de ressonância foi comprovado por meio de estudo dos orbitais moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) do AF (RAZZAGHI-ASL et al., 2013).

A figura 9 representa a distribuição eletrônica para a molécula do AF. Percebe-se que a densidade eletrônica do orbital HOMO se encontra no anel aromático e nos oxigênios dos grupamentos doadores de elétrons (hidroxila e metoxila), regiões também com maior atividade antioxidante. Já para o orbital LUMO, a densidade se localizou no anel benzênico, na cadeia vinílica e no grupo carboxila, demonstrando a deslocalização eletrônica que estabiliza a molécula em seu estado excitado (fenoxila) (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013).

**Figura 9:** Representação da distribuição eletrônica para o AF. Orbitais HOMO e LUMO (.



**Fonte:** Adaptado de URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013.

Em razão da sua atividade antioxidante pronunciada, o AF é aprovado em diversos países, como o Japão, onde pode ser utilizado como aditivo em alimentos e ingrediente ativo em formulações cosméticas e farmacêuticas (NANKAR; PRABHAKAR; DOBLE, 2017).

### 2.6.3 Propriedades Farmacocinéticas

O AF possui uma solubilidade aquosa de 6,63 mg/mL em pH 7,2 e temperatura corpórea ( $\sim 36,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ), sugerindo uma boa permeação e absorção percutânea (SAIJA, 2000). A farmacocinética clínica do AF não é bem descrita na literatura, estudos limitados mostraram que a farmacocinética nos humanos pode ser semelhante aos animais, sendo em ambos o tempo de meia-vida inferior a 1 hora (CHANG et al., 1993; ZHAO et al., 2003; YANG et al., 2007).

Zhao e colaboradores (2004), com o objetivo de confirmar a hipótese de que o AF é absorvido no estômago, utilizaram em ratos o modelo de absorção de drogas descrito por Barr and Riegelman (1970), com algumas modificações. Verificaram

que mais de 50% do AF administrado foi absorvido pelo estômago após 25 min de ingestão.

Na literatura é descrito que o AF pode ser absorvido pelo estômago, devido apresentar pKa de 4, sugerindo que esse baixo valor o mantém na forma indissociável, ou seja, na forma protonada, facilitando assim seu transporte através da membrana gástrica, por meio de difusão passiva (ZHAO, EGASHIRA E SANADA, 2004; ANSON et al. 2009).

Adam e colaboradores (2002), objetivando investigar o metabolismo intestinal e hepático do AF em ratos, utilizando de um modelo de perfusão intestinal, enriqueceram a dieta dos animais com diferentes concentrações de AF: 10, 50 e 250 mol/d. Eles observaram que a absorção do AF foi diretamente proporcional à concentração perfundida. Esse achado corrobora com resultados de que o AF pode ser absorvido por difusão passiva, pois sugere que o composto não satura o meio mesmo com uma concentração alta.

Por outro lado, tais mecanismo de difusão passiva não foram observados em monocamadas de células Caco-2 (KONISHI e SHIMIZU, 2003). O estudo mostrou que o AF é transportado através das células epiteliais intestinais por transportadores de ácido monocarboxílico (MCTs). Porém Watanabe et al. (2006) afirmaram em seu estudo que o MCT1, um dos mais bem caracterizados subtipos de MCTs, não estava envolvido na absorção de ácidos fenólicos.

Em relação a metabolização do AF, são evidenciados na literatura diversos estudos que relatam que o AF pode ser metabolizado *in vivo* em uma gama de metabolitos, incluído AF-glucuronido, AF-sulfato, AF-diglicuronido, AF-sulfoglucuronido (AF-diconjugado com sulfato e glucuronido), ácido m-hidroxifenilpropiónico, feruloilglicina, ácido di-hidroferúlico, ácido vanílico e vanililglicina (ADAM et al., 2002; CHOUDHURY, et al., 1999; RONDINI, et al., 2002; ZHANG, ZHANG, ZHOU, 2005; ZHAO, EGASHIRA, SANADA, 2003 ; ZHAO et al., 2004).

O AF conjugado são os principais metabólitos presente no plasma e urina de ratos (RONDINI et al., 2002; ZHAO et al., 2003), sendo o fígado o principal órgão de metabolização desse composto (ZHAO et al., 2004). A mucosa intestinal (KERN et al., 2003; SPENCER et al., 1999) e o rim (CHANG et al., 1993; ZHAO et al., 2003), também contribuem para o processo de conjugação.

Zhao et al. (2003) objetivando verificar derivados metabólicos do AF no plasma de ratos, obtiveram êxito na recuperação do AF livre somente em doses elevadas, em doses baixas não foi possível sua detecção, sugerindo assim que a metabolização do AF é dose-dependente, em doses altas podem saturar as enzimas de conjugação, levando ao acúmulo de AF livre no plasma.

A principal proteína transportadora de AF no sangue é a albumina (CHANG et al., 1993; KANG et al., 2004), sendo distribuído principalmente no fígado e nos rins (ADAM et al. 2002; ZHAO et al., 2004). Shin e colaboradores (2016) também verificaram em seu estudo que, dentre os tecidos do corpo humano, o AF é distribuído principalmente para o fígado e rim.

O AF é excretado principalmente através da urina em ratos em formas conjugadas (ADAM et al., 2002; BOOTH et al., 1957; CHOUDHURY et al., 1999; RONDINI et al., 2002; ZHAO et al.2004). Rondini e colaboradores (2002) demonstraram em ensaios com ratos wistar que a concentração máxima de AF é atingida no plasma após 30 minutos da ingestão via oral do composto e que aproximadamente 40% do composto puro que foi ingerido foi eliminado na urina. Ou seja, sua biodisponibilidade é baixa, e o composto acaba não exercendo todo seu potencial antioxidante dentro do organismo.

Jung e colaboradores (2016) investigaram a farmacocinética do AF em ratos, e verificaram que o composto desapareceu rapidamente da circulação sanguínea, após administração parenteral, no intervalo de tempo de 15 min. O tempo médio de meia-vida de eliminação inicial quando administrada doses de 2 e 10 mg/kg de AF foram de 1,10 e 1,39 min, respectivamente. O valor médio para meia-vida terminal nas doses correspondentes aumentou 40%, sugerindo assim uma baixa toxicidade. Também foi verificado nesse estudo, que além da urina, o AF também pode ser eliminado na bÍlis.

Virgili et al (2000) avaliaram a excreção de AF livre e conjugado pela urina, em humanos, após administração oral de extrato da casca do pinheiro marÍtimo francÊs. AlÍquotas de urinas dos participantes foram coletadas ao longo de 24 h. O AF livre e conjugado foi avaliado por CLAE. Os resultados encontrados por eles indicaram que uma proporção considerável de AF é excretada como glucuronida ou sulfato, variando ao longo do intervalo de 2 a 20% entre os indivíduos. Ainda nesse mesmo estudo identificaram que a quantidade total de AF excretada, foi diretamente

proporcional à quantidade de extrato administrado, indicando assim, que como sua metabolização, a relação ingestão e excreção também é dose-dependente.

Em relação a sua biodisponibilidade, o AF apresenta uma baixa biodisponibilidade, que pode ser explicado devido ao seu processo de conjugação rápida no fígado (CHANG et al.,1993; ZHAO et al., 2004), bem como às suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, notadamente a baixa solubilidade aquosa (SAIJA et al., 2000), uma vez que o fármaco apresenta natureza hidrofóbica e é um composto oxidável (ANSELMINI et al., 2008). Nesse sentido, sua biodisponibilidade pode ser reduzida, levando a um efeito mínimo *in vivo* por administração oral (ZUO et al., 2011).

Apesar de não haver casos de intoxicação relatados na literatura em humanos por AF, um estudo para a determinação da DL50, foi realizado com ratos. Houve a redução da mobilidade, piloereção e lacrimação em ratos tratados com AF no caso de uma única administração do fármaco superior a 1929 mg/kg, e a morte dos ratos acontecem nas primeiras 24 horas. Deste modo, foi determinado que para ratos machos, a DL50 seria 2445 mg/kg, e para ratos fêmeas, 2113 mg/kg (INFINITY PHARMA, 2017).

#### 2.6.4 Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Indicações Terapêuticas

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, atualmente o mercado oferece medicamentos e suplementos vendidos com diferentes formas farmacêuticas, que podem ser classificadas como formas farmacêuticas sólidas (pó efervescente, pastilhas, gomas e cápsulas) formas farmacêuticas semissólidas (gel, loções, pastas, cremes, pomadas), formas farmacêuticas líquidas (xarope) e formas farmacêuticas gasosas (aerossóis). Após a escolha da forma farmacêutica, o medicamento precisa ser ingerido para gerar o efeito desejado, mas também é preciso escolher a via de administração. As vias mais comuns são via oral, via intravenosa (injetável) e via inalatória. A escolha da via está relacionada com vários fatores, como a duração do efeito do medicamento, posologia (frequência de consumo do medicamento) e duração do tratamento (ANVISA, 2011).

O AF pode ser administrado na forma tópica e oral. No uso tópico ele é utilizado na forma de cremes e pomadas, com concentrações variando de 0,5 a 1%

(INFINTY PHARMA, 2017), enquanto que para uso oral é administrado na forma de cápsulas com dosagem de até 250 mg (FAGRON, 2019).

A administração tópica de vitamina C é muito problemática e requer cuidados devido ao seu estado altamente oxidativo. Para que ela seja eficaz há diversos fatores que devem ser controlados, e um desses fatores é a estabilização, uma vez que ao ser exposta ao ar ou à umidade ela oxida rapidamente (MANELA-AZULAY et al., 2003). O AF, combinado a 0,8%, com a vitamina C funciona para estabilizá-la, impedindo sua oxidação. Esta é a fórmula do primeiro sérum criado com o uso de AF (WAIBEL et al., 2015). A vitamina C, combinada a vitamina E e ao AF tem um importante papel na regeneração da pele, auxiliando no processo de cicatrização. Além disso, o AF não só proporciona maior estabilidade a uma solução de vitaminas C e E, mas também adiciona uma fotoproteção sinérgica substancial, essencialmente duplicando sua eficácia. Ainda, oferece proteção adicional contra formação de dímero de timina, sendo assim útil para a prevenção do câncer de pele (LIN et al., 2005).

O uso oral do AF se dá muito mais por meio de suplementação, tendo em vista que ele é um composto bioativo (HEEP et al., 2019) mas com uma grande capacidade antioxidante, atuando principalmente nas ERO's (KIM et al., 2013). Alguns fabricantes recomendam a ingestão de 250 mg duas vezes ao dia, 1 cápsula 30 minutos antes e 1 cápsula após a prática de exercício físicos, e em dias sem treinos é indicado 1 cápsula no café da manhã (FAGRON, 2019), no entanto, como já foi descrito, ele possui uma baixa biodisponibilidade (ZHAO et al., 2004).

Apesar de sua baixa biodisponibilidade, o AF apresenta uma ampla gama de potenciais efeitos terapêuticos úteis no tratamento de diabetes (OHNISHI et al., 2004), hipertensão (SUZUKI et al., 2007), doença de Alzheimer (HAHN et al., 2016; PICONE et al., 2009; SGARBOSSA et al., 2015), câncer (CHANG et al., 2006; GAO et al., 2018) , bem como efeitos neuroprotetores (WU et al., 2014), fotoprotetores (HAHN et al., 2016), atividades antitrombóticas (CHOI et al., 2017) e anti-inflamatórias (MOLDOVAN et al., 2017). Assim, estudos que viabilizem sua biodisponibilidade tornam-se interessantes, tendo em vista sua ampla atuação anti oxidante.

## REFERÊNCIAS

ADAM, A., CRESPIY, V., LEVRAT-VERNY, M. A., LEENHARDT, F., LEUILLET, M., DEMIGNE, C., REMESY, C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition*, v. 132, p. 1962–1968, 2002.

ADOM, K. K., LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6182–6187, 2002.

ANSELMINI, C., CENTINI, M., MAGGIORE, M., GAGGELLI, N., ANDREASSI, M., BUONOCORE, A., FACINO, R. M. Non-covalent inclusion of ferulic acid with  $\alpha$ -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46(4), p. 645–652, 2008.

ANSON, N. M., SELINHEIMO, E., HAVENAAR, R., AURA, A.-M., MATTILA, I., LEHTINEN, P., HAENEN, G. R. M. M. Bioprocessing of Wheat Bran Improves in vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57(14), p. 6148–6155, 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011.  
<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos/informes?tagsName=formas%20farmac%C3%AAsAuticas>. Acessado em 15/05/2019.

ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M. D.; LARKINS, B. A. A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v.257, n.17, p.9984-9990, 1982.

BARR, W. H., RIEGELMAN, S. Intestinal Drug Absorption and Metabolism I: Comparison of Methods and Models to Study Physiological Factors of In Vitro and In Vivo Intestinal Absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 59(2), p. 154–163, 1970.

BOOTH, A. N., EMERSON, O. H., JONES, F. T., DEEDS, F. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 229, p. 51–59, 1957.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Bioquímica*. São Paulo: Thomson Learning, 5ª. Ed, p. 63-79, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review in antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chemistry Toxicology*, v.51, p. 15-25, 2013.

CHAMPE, P C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 4a. Ed., p. 1-24, 2009.

CHANG, C. J., CHIU, J. H., TSENG, L. M., CHANG, C. H., CHIEN, T. M., WU, C. W. Modulation of HER2 expression by ferulic acid on human breast cancer MCF7 cells. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 36, p. 588–596, 2006.

CHANG, C.; WANG, T.; HU, Q.; LUO, Y. Zein/caseinate/pectin complex Nanoparticles: Formation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 117-124, 2017.

CHANG, M. X., XU, L. Y., TAO, J. S., FENG, Y. Metabolism and pharmacokinetics of ferulic acid in rats (in Chinese). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v. 18, p. 300–312, 1993.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHOI, J.-H., PARK, J.-K., KIM, K.-M., LEE, H.-J., & KIM, S. In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 32, p. 1-9, 2017.

CHOUDHURY, R., SRAI, S. K., DEBNAM, E., RICE-EVANS, C. A. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, p. 278–286, 1999.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* v. 79, p. 362-372, 1999.

CORRADINI, E. Recent Advances in Food-Packaging, Pharmaceutical and Biomedical Applications of Zein and Zein Based Materials. *Molecular Sciences*, v. 15, p. 22438-22470, 2014.

COUVREY, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1417 – 1450, 2006.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of  $\beta$ -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 210, p. 183-190, 2002.

DE OLIVEIRA, D.M., BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. *Química Nova*, v. 34, p. 1051-1056, 2011.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 153, p. 206-216, 2011.

FAGRON. Material Técnico.

[https://br.fagron.com/sites/default/files/acido\\_ferulico\\_mt\\_set\\_18.pdf](https://br.fagron.com/sites/default/files/acido_ferulico_mt_set_18.pdf). Acessado em 17/05/2019.

FARRELL, J. R. H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 11, p. 135-147, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 43(1), p. 61-8, 1997.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 118, 2004.

GAO, J., YU, H., GUO, W., KONG, Y., GU, LINA, LI, Q., WANG, Y. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, v. 18, p. 1-9, 2018.

GŁĄB, T. K., & BORATYŃSKI, J. Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. *Topics in Current Chemistry*, v. 375(4), p. 1-20, 2017.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. *Clinical Dermatology*, v. 26, p. 614-626, 2008.

GRAF, E. A antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, v.13, p. 435-448, 1992.

HAHN, H. J., KIM, K. B., BAE, S., CHOI, B. G., AN, S., AHN, K. J., & KIM, S. Y. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. *Annals of Dermatology*, v. 28, p. 740-748, 2016.

HALLEN, A.; JAMIE, J. F.; COOPER, A. J. L. Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of recent discoveries. *Amino Acids*, v. 45(6), p. 1249–1272, 2013.

HARWANSH, R. K.; MUKHERJEE, P. K.; BAHADUR, S.; BISWAS, R. Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. *Life Sciences*, 141, 202–211, 2015.

HEEP, G.; ALMEIDA, A.; MARCANO, R.; VIEIRA, D.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; SARMENTO, B. Zein-casein-lysine multicomposite nanoparticles are effective in modulate the intestinal permeability of ferulic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 138, p. 244-251, 2019.

HOLT, C.; CARVER, J. A.; ECROYD, H.; THORN, D. C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, v. 10, p. 1-20, 2013.

INFINITY PHARMA. Material Técnico, 2017.

<https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/a/%C3%81cido%20Fer%C3%BAlico.pdf>. Acessado em 14/05/2019.

JUNG, J.-S., YAN, J.-J., LI, H.-M., SULTAN, M. T., YU, J., LEE, H.-S., SONG, D.-K. Protective effects of a dimeric derivative of ferulic acid in animal models of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 782, p. 30–34, 2016.

KANG, J., LIU, Y., XIE, M. X., LI, S., JIANG, M., WANG, Y. D. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects*, v. 1674, p. 205–214, 2004.

KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, A. D. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure–activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 273–281, 2001.

KERN, S. M., BENNETT, R. N., NEEDS, P. W., MELLON, F. A., KROON, P. A., GARCIA-CONESA, M. T. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7884–7891, 2003.

KIM, H.J.; RYU, K.; KANG, J.H.; CHOI, A.J.; T. KIM, IL; OH, J.M. Anticancer activity of ferulic acid-inorganic nanohybrids synthesized via two different hybridization routes, reconstruction and exfoliation-reassembly, *Scientific World Journal*. 2013.

KONISHI, Y., SHIMIZU, M. Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, p. 856–862, 2003.

LAU, E. et al. Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles. *Pharmaceutics*, v. 5, n. 2, p. 277-293, 2013.

LAWTON, J.W. Zein: A History of Processing and Use. *American Associate Cer. Chemistry*, v. 79, p. 1-18, 2002.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, v. 125, p.288–306, 2011.

LIN, F.-H.; LIN, J.-Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GRICHNIK, J. M.; ZIELINSKI, J.; PINNELL, S. R. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *Journal Invest Dermatology*, v. 125, p.826 –832, 2005.

LINDNER, G. R. Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas contendo Resveratrol e Avaliação da ação Neuroprotetora sobre um modelo Experimental de Doença de Parkinson. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Associação Ampla Unicentro e UEPG, Guarapuava, 2014.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic Acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chemistry Toxicology*, v. 65, p. 185-195, 2014.

MANELA-AZULAY, M.; LACERDA, C.; PEREZ, M.; FILGUEIRA, A.; CUZZI, T. Vitamina C. Anais brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 78(3), p. 265-274, 2003.

MATTOS, A, C. Desenvolvimento Tecnológico de Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-Fluorouracil, Avaliação da Citotoxicidade sobre Células Tumorais e Farmacocinética Pré-Clínica. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Associação Ampla Unicentro e UEPG, Guarapuava, 2013.

MIR, M., AHMED, N., REHMAN, A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 159, p. 217–231, 2017.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 5, n. 1, p. 561 – 5732, 2006.

MOLDOVAN, M., LAHMAR, A., BOGDAN, C., PĂRĂUAN, S., TOMUȚĂ, I., CRIȘAN, M. Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. Clujul Medical, 90, p. 212-219, 2017.

MONTI, D.; TAMPUCCI, S.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAINO, V.; CENTINI, M.; STALTARI, L.; ANSELMINI, C. Permeation and distribution of ferulic acid and its  $\alpha$ -cyclodextrin complex from diferente formulations in hairless rat skin. AAPS Pharmaceutical Science Technology, v.12, n. 2, p. 514-520, 2011.

MORAN, L. A.; HORTON, H. R.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M. D. Bioquímica. São Paulo: Pearson Education, 5a. Ed, p. 56-82, 2013.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. Progress in Polymer Science, v.32, n. 8-9, p.762-798, 2007.

NANKAR, R.; PRABHAKAR, P. K.; DOBLE, M. Hybrid drug combination: Combination of ferulic acid and metformin as anti-diabetic therapy. Phytomedicine. v. 37, p. 10–13, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 5a. Ed, p. 72-81, 2011.

OHNISHI, M.; MATUO, T.; TSUNO, T.; HOSODA, A.; NOMURA, E.; TANIGUCHI, H. Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice. Biofactors, v. 21, p. 315–319, 2004.

PAIVA, L. B.; GOLDBECK, R.; SANTOS, W. D.; SQUINA, F. M. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 49, p. 395-411, 2013.

PEDRAZINI, M.C.; ARAÚJO, V.C.; MONTALLI, V.A.M. The effect of l-lysine in recurrent herpes labialis - pilot study with a 8-year follow up. RGO, Revista Gaúcha de Odontologia. v. 66(3), p. 245-249, 2018.

PENALVA, R.; ESPARZA, I.; AGÜEROS, M.; GONZALEZ-NAVARRO, C. J.; GONZALEZ-FERRERO, C.; IRACHE, J. M. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, v. 44, p. 399-406, 2015.

PICONE P., BONDI M.L., MONTANA G., BRUNO A., PITARRESI G., GIAMMONA G., DI CARLO M. Ferulic acid inhibits oxidative stress and cell death induced by Ab oligomers: improved delivery by solid lipid nanoparticles. *Free Radicals Research*. V. 43, p. 1133-45, 2009.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 4436-4450, 2013.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships, *Current Medicinal Chemistry*. v. 20, p. 4436–4450, 2013.

RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, v. 116, n. 1, p. 1-27, 2006.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; BERSET, C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 50, p. 3037-3041, 2002.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, p. 39–47, 2000.

SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H., KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 571–581, 2003.

SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2073–2085, 2000.

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

SEMO, E.; KESSELMAN, E.; DANINO, D.; LIVNEY, Y. D. Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 936-942, 2007.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, p. 43-56, 2005.

SGARBOSSA, A., GIACOMAZZA, D. DI CARLO, M. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients*, v. 7, p. 5764–5782, 2015.

SPENCER, J. P., CHOWRIMOOTO, G., CHOUDHURY, R., DEBNAM, E. S., SRAI, S. K., RICE-EVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*, v. 458, p. 224–230, 1999.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal Clinical Biochemistry Nutrition*, v. 40, p. 92-100, 2007.

SUZUKI, A.; YAMAMOTO, M.; JOKURA, H.; FUJII, A.; TOKIMITSU, I.; HASE, T.; SAITO, I. Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 20, p. 508–513, 2007.

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E.M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview, *Biomedical Research International*. 2013.

TROMBINO, S., CASSANO, R., FERRARELLI, T., BARONE, E., PICCI, N., MANCUSO, C. Trans-ferulic acid-based solid lipid nanoparticles and their antioxidant effect in rat brain microsomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 109, p. 273–27, 2013.

ULLAH, M. F.; KHAN, M. W. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant-derived polyphenolic compounds. *Asian Pac Journal Cancer Preview*, v. 9, p. 187-196, 2008.

URBANIAK, A.; SZELAG, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Computational and Theoretical Chemistry*, v. 1012, p. 33-40. 2013.

VIRGILI, F., PAGANA, G., BOURNE, L., RIMBACH, G., NATELLA, F., RICE-EVANS, C. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, p. 1249–1256, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 4a. Ed, p. 72-81, 2013.

WAIBEL, J.S.; MI, Q.S.; OZOG, D.; QU, L.; ZHOU, L.; RUDNICK, A.; AL-NIAIMI, F.; WOODWARD, J.; CAMPOS, V.; MORDON, S. Laser-assisted delivery of vitamin C, vitamin E, and ferulic acid formula serum decreases fractional laser postoperative recovery by increased beta fibroblast growth factor expression. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 48(3), p. 238–244, 2015.

WATANABE, H., YASHIRO, T., TOHJO, Y., KONISHI, Y. Non-involvement of the human monocarboxylic acid transporter I (MCT1) in the transport of phenolic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, p. 1928–1933, 2006.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International Journal Medical Science*, v. 11, p. 1185-1200, 2014.

YANG, C., TIAN, Y., ZHANG, Z. J., XU, F. G., CHEN, Y. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry determination of sodium ferulate in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 945–950, 2007.

ZHANG, J. L., ZHANG, G. D., ZHOU, T. H. Metabolism of ferulic acid in rats. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 7, p. 49–58, 2005.

ZHAO, Z., MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, v. 109, p. 691–702, 2008.

ZHAO, Z., EGASHIRA, Y., SANADA, H. Digestion and absorption of ferulic acid sugar esters in rat gastrointestinal tract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 5534–5539, 2003.

ZHAO, Z., EGASHIRA, Y., SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *The Journal of Nutrition*, v. 134, p. 3083–3088, 2004.

ZHAO, Z., EGASHIRA, Y., SANADA, H. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *The Journal of Nutrition*, v. 133, p. 1355–1361, 2003.

ZHOU, Y., HUA, S., YU, J., DONG, P., LIU, F., HUA, D. A strategy for effective radioprotection by chitosan-based long-circulating nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, p. 2931–2934, 2015.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 4, p. 1-8, 2001.

ZUO, A., WANG, L., XIAO, H., LI, L., LIU, Y., YI, J. Identification of the absorbed components and metabolites in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong decoction by HPLC–ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56(5), p. 1046–1056, 2011.

### **3 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CASEÍNA CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Em função da alta estabilidade da caseína frente a altas temperaturas, mesmo após seu processamento, sua estrutura básica é mantida (SEMO et al., 2007; DE KRUIF e GRINBERG, 2002). Devido a esta estabilidade e a seu caráter anfipático, fizeram com que este polímero natural despertasse interesse em várias áreas de aplicação, como alimentos, cosméticos e medicamentos. Além disso, suas características também a tornam candidata como polímero para o nanoencapsulamento de fármacos e compostos bioativos.

Muitos compostos naturais bioativos têm sido destacados em estudos de atividades antioxidantes, incluindo os ácidos fenólicos (RAZZAGHI-ASL, et al., 2013). O AF (Figura 1) é um composto fenólico com potencial antioxidante comprovado (MANCUSO; SANTANGELO, 2014), no entanto, para administração oral, algumas limitações são encontradas em sua eficácia terapêutica. Possui baixa solubilidade em solução aquosa (ZHOU et al., 2015), capacidade reduzida de penetrar em membranas biológicas (YANG, SONG, 2015) e baixa absorção celular (KIM et al., 2013). O processo de nanoencapsulamento pode melhorar os aspectos físicos-químicas e de biodisponibilidade.

Os compostos bioativos e fármacos podem ser encapsulados por diferentes mecanismos (DIMER et al., 2013). A associação de um composto bioativo ou fármaco a uma nanopartícula polimérica, que atua como um sistema transportador altera a distribuição deste, uma vez que esse passa a depender das características físico-químicas do carreador e não de suas características (FREIBERG e ZHU, 2004; DIMER et al., 2013).

Assim, neste estudo, avaliou-se primeiramente as características da caseína como nanocarreador e em seguida desenvolveram-se as nanopartículas de caseína carregadas com AF. Avaliou-se o perfil físico-químico e morfológico das partículas, por meio do diâmetro médio, índice de polidispersão, espectroscopia de infravermelho, difratometria de raios X e fotomicrografias. Também se determinou a eficiência de encapsulação para as partículas.

## 3.2 PARTE EXPERIMENTAL

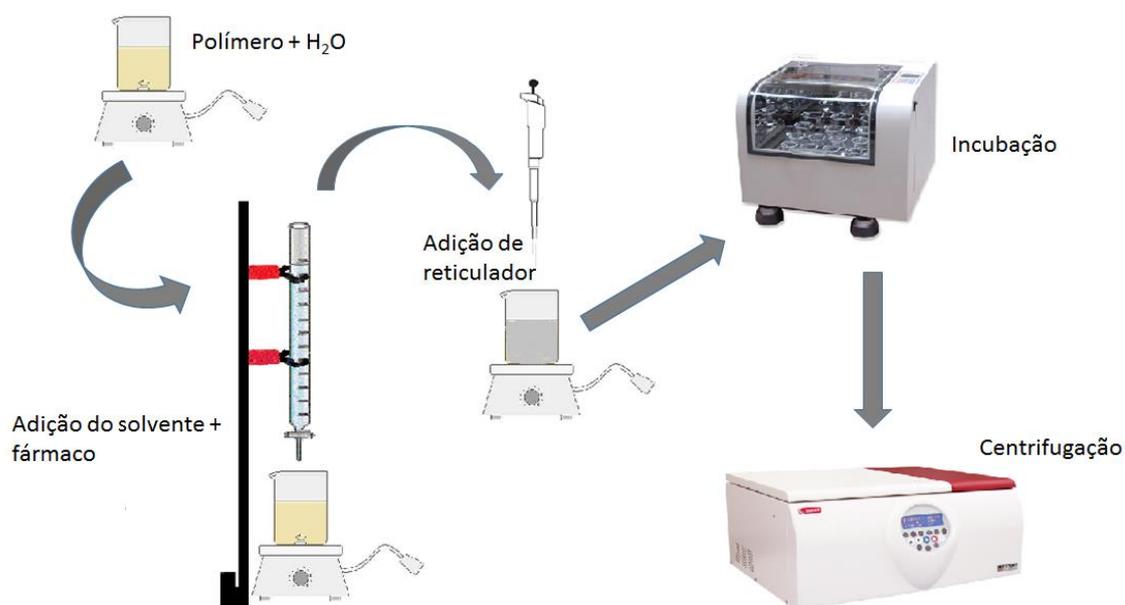
### 3.2.1 Materiais

Ácido ferúlico (AF; 99%), caseinato de sódio (99%) e lisina (99%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). O etanol (99%) foi adquirido da Fmaia (Cotia, Brasil). A acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi obtido da LiChrosolv-Merck (Darmstadt, Alemanha).

### 3.2.2 Desenvolvimento das Nanopartículas

As nanopartículas de caseína foram preparadas pelo método de dessolvatação (figura 10), em que o polímero é dissolvido em água, um solvente orgânico contendo o composto, é gotejado na solução do polímero. Ao término da adição da fase orgânica na fase aquosa se fez uso de um agente reticulante (XU et al., 2019).

**Figura 10:** Representação do processo de obtenção de nanopartículas pelo método de dessolvatação.



Fonte: O autor.

Inicialmente, foram realizados ensaios para avaliar o comportamento do caseinato de sódio como nanopartícula. A tabela 2 traz formulações de nanopartículas de caseína (Nps Cas-B). O solvente orgânico utilizado para todos os ensaios foi o etanol.

**Tabela 2:** Otimização de parâmetros para obtenção das nanopartículas a partir de caseína.

Formulação	Fase aquosa	Reticulante
Nps Cas-B01	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	25 µL Glu 8%
Nps Cas-B02	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	50 µL Glu 8%
Nps Cas-B03	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	75µL Glu 8%
Nps Cas-B04	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	50 µL CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M
Nps Cas-B05	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	100 µL CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M
Nps Cas-B06	100 mg Cas/2 mL H <sub>2</sub> O	200 µL CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M
Nps Cas-B07	50 mg Cas/5 mL Lis 8%	50 µL CaCl <sub>2</sub> 0,8%

**Fonte:** O autor.

Após os ensaios iniciais, para a encapsulação do AF, realizou-se uma adaptação do método utilizado por Penalva e colaboradores (2015). A solução aquosa foi composta por caseinato de sódio, 5% (m/v), em uma solução de lisina 8% (m/v). A fase orgânica, uma solução de AF em etanol e lisina (8%), 1,5% (m/v). Adicionou-se 2 mL da fase orgânica à fase aquosa sob constante agitação e, em seguida, adicionou-se o agente reticulante, cloreto de cálcio 0,8% (m/v). A emulsão permaneceu 4 horas incubando com temperatura de 18 °C. Após o período de incubação as nanopartículas foram ultracentrifugadas por 30 minutos a 17000 rotações por minuto (rpm) e 4 °C. Repetiu-se a ultracentrifugação para a lavagem das nanopartículas. Estas foram ressuspensas em solução crioprotetora (sacarose 10% (m/v)) ou água ultrapura e liofilizadas.

### 3.2.3 Adaptação da validação da metodologia analítica para quantificação do AF por CLAE

A quantificação do AF foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Lima, Khalil e Mainardes (2017). Os parâmetros avaliados foram a linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e especificidade.

O CLAE Merck-Hitachi 7000 com coluna Spherisorb® ODS2, 5 µm, 4.6mm x 250mm foi usado para a separação. A fase móvel foi composta por ácido acético 0,5%/acetonitrila (70:30 v/v), a vazão e temperatura da coluna foram fixados em 0,9 mL/min e 25 °C, respectivamente. A concentração do AF (tempo de retenção de ~6,1 min) foi monitorada medindo a absorbância em 310 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata a 25 °C.

A linearidade do método foi obtida a partir de 6 diferentes concentrações de AF (20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL), preparadas a partir de uma solução estoque de AF. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidos a partir das equações 1 e 2. Os dados para a obtenção destes foram provenientes da curva da linearidade.

$$LD = \frac{3,3.\sigma}{b} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10.\sigma}{b} \quad \text{Equação 2}$$

Em que,  $\sigma$  corresponde ao DP médio da interceptação com o eixo y e  $b$  a inclinação da curva analítica ou *slope*.

### 3.2.4 Eficiência de Encapsulação

A determinação da EE do AF nas nanopartículas foi realizada pelo método indireto. Este método quantifica o composto que não foi associado às nanopartículas, analisando-se o sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação e da lavagem.

O AF não encapsulado foi coletado e a concentração foi determinada pelo método CLAE-DAD. Os experimentos foram realizados em triplicata a 25 °C, e a área total do pico foi usada para quantificar o AF livre, permitindo a determinação de eficiência de encapsulação (EE) conforme equação 3.

$$EE\% = \frac{AF_{inicial} - AF_{livre}}{AF_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

### 3.2.5 Caracterização Físico-Química

#### 3.2.5.1 *Análise do Tamanho Médio, Índice de Polidispersão e Carga Superficial*

Todas as formulações desenvolvidas no período tiveram seu tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) determinados por meio de medidas realizadas com espalhamento dinâmico de luz (BIC 90 plus, *Brookhaven Instruments Corp.*, NY, EUA). Para se obter o perfil de distribuição de cada formulação produzida, uma alíquota das suspensões de nanopartículas foram diluídas (1:200, v/v) em água ultrapura e analisadas com ângulo de espalhamento de 90°, temperatura de 25°C e comprimento de onda 660 nm. As leituras foram realizadas em triplicata, utilizando corridas de 3 min cada uma. Os resultados foram expressos como a média do tamanho e do índice de polidispersão. A média final e o desvio padrão associados ao tamanho e índice de polidispersão foram calculados a partir da análise de 3 amostras diferentes (n=3).

A carga superficial das nanopartículas foi determinado a partir da mobilidade eletroforética destas em suspensão (*Zetasizer ZS*, Malvern, UK). As amostras foram diluídas (1:200 (v/v)) em solução de KCl 1 mM a fim de manter a força iônica do meio e colocadas em uma célula eletroforética a 25°C sob o potencial de  $\pm 150$  mV. As medidas foram realizadas em triplicata, calculando-se a média e o desvio padrão (n=3).

#### 3.2.5.2 *Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)*

Para esse ensaio as amostras liofilizadas sem crioprotetor, foram preparadas em pastilhas de KBr. A razão de escaneamento usada foi de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com 64 *scans* e a resolução foi de 4  $\text{cm}^{-1}$  (FTIR-7600, Lambda Scientific, Austrália). Os espectros de nanopartículas de caseína contendo AF foram analisados e comparados frente aos espectros obtidos do polímero, do composto, de uma mistura física entre polímero, composto e agente estabilizante (lisina) e das nanopartículas de caseína não carregadas com AF.

### 3.2.5.3 Difractometria de Raios X

As medições de DRX foram realizadas utilizando radiação Cu K $\alpha$  em comprimento de onda de 1,54 Å à temperatura ambiente (D2 Phaser, Bruker, Alemanha). A tensão e a corrente aplicada foram de 40 kV e 30 mA, respectivamente. As amostras foram acondicionadas em um suporte de amostras de vidro e digitalizados a partir de 5 a 70° em um ângulo de 2 $\theta$  com variação de 0,02°/min.

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

As características morfológicas da superfície das nanopartículas de caseína carregadas com AF foram avaliadas em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) com uma tensão de aceleração de 15 Kv (MEV-FEG, MIRA3 LM, Tescan, República Checa). Para esta análise, uma gota da dispersão das nanopartículas foi distribuída em um suporte metálico (*stub*). Após a secagem, a amostra foi metalizada com ouro coloidal sob vácuo. As micrografias foram realizadas com aumentos de 40 e 53 mil vezes.

### 3.2.5 Análise estatística

Todos os dados foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão (DP), e a diferença entre os grupos foi avaliada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida da análise de pós-teste de Tukey usando o software Graph Pad Prism 6.0. A significância estatística foi estabelecida em \* $p < 0,05$ .

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Obtenção das Nanopartículas

Para a obtenção das nanopartículas de caseína, utilizou-se o método de dessolvatação. Esse método envolve a separação do material polimérico da solução por meio de alterações das características do meio que causam a dessolvatação da macromolécula como, mudança de pH, aquecimento, adição de um não solvente, sal ou outro polímero incompatível ou alteração da carga do polímero envolvido (WATTS; DAVIES; MELIA, 1990). O etanol foi utilizado como agente dessolvatante, visto que a caseína não solubiliza neste. A adição do etanol na solução aquosa de caseína foi diminuindo a solubilidade, tornando a solução turva e formando agregados de caseína.

As primeiras formulações foram desenvolvidas sem a presença de AF (Tabela 3), para avaliar o comportamento da caseína e se o processo de dessolvatação era adequado para a formação de nanopartículas desse polímero. Além disso, foram avaliados diferentes agentes reticulantes em diferentes concentrações. Observa-se, por exemplo, que a variação no volume de glutaraldeído (Glu) 8% de 50 para 75  $\mu\text{L}$ , nas formulações Nps Cas-B02 e Nps Cas-B03, leva a um aumento no tamanho da partícula de 136 para 704 nm, respectivamente.

**Tabela 3:** Resultados obtidos para a otimização das nanopartículas de caseína.

Formulação	Fase aquosa	Reticulante	Diâmetro médio (nm)	IPD	Zeta (mV)
Nps Cas-B01	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	25 $\mu\text{L}$ Glu 8%	161	0,230	-31
Nps Cas-B02	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	50 $\mu\text{L}$ Glu 8%	136	0,164	-27
Nps Cas-B03	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	75 $\mu\text{L}$ Glu 8%	704	0,368	-28
Nps Cas-B04	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	50 $\mu\text{L}$ CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	264	0,462	-25
Nps Cas-B05	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{L}$ CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	287	0,478	-22
Nps Cas-B06	100 mg Cas/ 2 mL H <sub>2</sub> O	200 $\mu\text{L}$ CaHPO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> M	267	0,368	-18
Nps Cas-B07	50 mg Cas/ 5 mL Lis 8%	50 $\mu\text{L}$ CaCl <sub>2</sub> 0,8%	725	0,005	-23

Fonte: O autor.

Além do Glu, foram utilizados como agentes reticulantes fosfito de cálcio (CaHPO<sub>3</sub>) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>). O íon Ca<sup>2+</sup>, normalmente age por difusão no processo de reticulação e forma ligações com a proteína tornando-a mais estável e

resistente às variações de pH e temperatura (TURBIANI. e KIECKBUSCH, 2011). O  $\text{CaHPO}_3$  possui uma baixa solubilidade em água (THE MERCK INDEX, 2019), levando ao uso de soluções com baixas concentrações, conseqüentemente se tem pouca disponibilidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio para interação com o polímero.

As Nps Cas-B04, Nps Cas-B05 e Nps Cas-B06 reticuladas com o  $\text{CaHPO}_3$  diâmetro médio aceitável, no entanto, o índice de polidispersão (IPD) para as Nps teve uma média de 0,462. O IPD está associado com a distribuição do tamanho das nanopartículas (CHANG et al., 2017), ou seja, para as Nps analisadas, teve-se uma média de diâmetros bastante heterogênea. Assim, a baixa disponibilidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio, não possibilitou uma reticulação homogênea da proteína.

Ao utilizar o  $\text{CaCl}_2$ , um sal solúvel em água (THE MERCK INDEX, 2019), a disponibilidade dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  foi maior, conseqüentemente, o processo de reticulação ocorreu de maneira mais eficaz e homogênea. As Nps Cas-B07 obtiveram um IPD baixo (0,005) demonstrando homogeneidade, no entanto, o tamanho médio obtido para estas partículas (725 nm) foi relativamente alto quando se pensa em uma administração parenteral, tendo em vista que o vaso sanguíneo suporta partículas de até 250 nm (OBER e GUPTA; 2006).

Os ensaios realizados demonstraram que o caseinato de sódio respondeu bem a metodologia proposta e também aos reticulantes utilizados. Porém, a caseína é uma proteína com baixo índice de estrutura secundária, devido à grande quantidade de resíduos prolina (SGARBIERI, 2005), em consequência disso, ela sofre desnaturação com facilidade em valores de pH inferiores ao seu ponto isoelétrico (~ 4,6) (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

A medição do potencial zeta da superfície de partículas suspensas em um dado meio permite avaliar a estabilidade de tais suspensões como as forças eletrostáticas repulsivas que atuam entre espécies igualmente carregadas para estabilizar esses sistemas (HUO et al., 2011). Durante a realização de todos os ensaios, foi feita a leitura do potencial Zeta, para monitorar a carga superficial das nanopartículas formadas.

O potencial zeta das nanopartículas foi negativo (em torno de -20 mV) em pH 7,4, devido à carga superficial da caseína que é conferida pelo arranjo de aminoácidos (ELZOGHPBY; ABO EL-FOTOH; ELGINDY, 2011), Observa-se, porém, que nas partículas com a adição dos reticulantes a base de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nps Cas-B04, Nps Cas-B05, Nps Cas-B06 e Nps Cas-B07), um íon positivo, as nanopartículas de

caseína sofreram uma leve queda nesta carga. Isso pode ser devido a interação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  com a superfície negativa da proteína.

Ao iniciar as tentativas de encapsular o AF, como esse possui dois pKa's, 4,56 para seu grupamento carboxila e 8,65 para grupamento hidroxila ligado ao anel aromático (MONTI et al., 2001), deparou-se com a alta sensibilidade da caseína frente a valores de pH ácido. Foi necessário buscar agentes estabilizantes que viabilizassem o processo de nanoencapsulação do AF que também preservassem o grupamento fenólico, já que esse é o responsável pela atividade antioxidante do AF (ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). Assim, era necessário manter o pH do meio abaixo de 8.

Penalva e colaboradores (2015) desenvolveram um sistema nanoparticulado de caseína carregado com ácido fólico estabilizado com lisina e arginina. Assim, a partir de uma adaptação da metodologia de Penalva, foi possível desenvolver a formulação Nps Cas-AF (Tabela 4), a qual é reprodutível.

A lisina é um aminoácido com cadeia lateral iônica e básica que proporciona interações eletrostáticas com os grupos carboxila dos resíduos glutamato e aspartato, presentes na caseína (PENALVA et al., 2015). A caseína é rica em resíduos de ácido aspártico (cerca de 8%) e ácido glutâmico (22%) (SINDAYIKENGERA, 2006). Como consequência das interações eletrostáticas entre os resíduos com cadeia lateral ácida e a lisina, a superfície da nanopartículas seria mais hidrofílica, minimizando a possibilidade de agregação (PENALVA et al., 2015). Assim, a lisina possibilitou uma maior estabilização para a caseína, devido a sua falta de estruturas secundárias.

### 3.3.2 Caracterização físico-química

#### 3.3.2.1 Diâmetro médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

O tamanho de partícula, distribuição e carga superficial são parâmetros chave que determinam não só a estabilidade física das nanopartículas como seu destino após administração, interação com a membrana biológica, a penetração do composto através das barreiras fisiológicas e sua permanência na corrente sanguínea (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

A Tabela 4 apresenta o diâmetro médio, índice de polidispersão e carga superficial das nanopartículas. O diâmetro médio verificado obtido para as nanopartículas carregadas com AF foi 169 nm. Merlin e colaboradores (2012) obtiveram sistemas nanoestruturados de AF e PLGA com tamanho de 483 nm. O mesmo sistema foi obtido por Lima, Khalil e Mainardes (2017) com 234 nm. Outro sistema investigado com o AF foram as nanolipídicas, no qual o tamanho obtido foi 183 nm (THAKKAR et al., 2015). Entretanto, o polímero sintético e as nanolipídicas necessitam grandes quantidades de solventes orgânicos para resultar em sistemas nanoestruturados.

Em relação ao índice de polidispersão (IPD), que indica o grau relativo de espalhamento em relação aos diâmetros médios das partículas de uma dada amostra em suspensão (CHANG et al., 2012), observa-se que em todos os casos os valores obtidos foram menores do que 0,3 indicando sistemas bimodais, mas ainda assim homogêneos.

**Tabela 4:** Parâmetros para nanopartículas de caseína carregadas com AF (Nps Cas-AF), nanopartículas de caseína carregadas com AF liofilizadas (Nps Cas-AF\*) e nanopartículas de caseína (Nps Cas-B07).

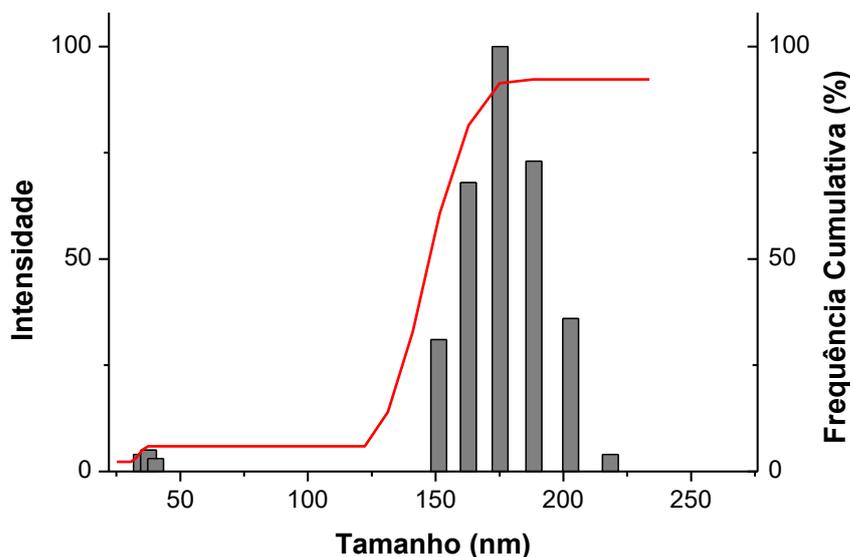
Formulação	DM (nm)	IPD	Zeta (mV)
Nps Cas-FA	169 ± 13 <sup>a</sup>	0,260 ± 0,020 <sup>a</sup>	-23 ± 1 <sup>a</sup>
Nps Cas-FA *	289 ± 43 <sup>b</sup>	0,210 ± 0,040 <sup>a</sup>	-20 ± 1 <sup>b</sup>
Nps Cas-B07	725 ± 5 <sup>c</sup>	0,005 ± 0,001 <sup>b</sup>	-23 ± 1 <sup>a</sup>

Nota: Letras diferentes (a, b, c) denotam diferença significativa entre cada amostra determinada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

A Figura 11 traz a distribuição de tamanho de uma amostra representativa para as nanopartículas de caseína. Observa-se que o sistema é bimodal, ou seja, duas famílias. As nanopartículas de caseína carregadas com AF apresentam uma família entre 35 e 40 nm (12%) e a maior parte entre 151 e 218 nm (88%).

**Figura 11:** Distribuição de tamanho de uma amostra representativa de nanopartículas de caseína contendo AF. Diâmetro médio de 179 nm e índice de polidispersão 0,26.



**Fonte:** O autor.

A medida do potencial zeta compreende técnica habitual, que caracteriza a força e a polaridade da dupla camada elétrica formada por conta do processo de nanoencapsulação. O potencial Zeta é um parâmetro usado em vários estudos para a avaliação da estabilidade eletrostática de sistemas nanoparticulados. O valor do potencial Zeta indica que as forças de atração e repulsão permitem que as nanopartículas se agreguem ou não. Valores de potencial Zeta próximos de  $\pm 30\text{mV}$  conferem ao sistema coloidal maior estabilidade (RAHIMNEJAD, NAJAFPOUR, BAKERI, 2012).

O valor de potencial Zeta encontrado após o processo de dessolvatação e obtenção das nanopartículas de caseína carregadas com AF (Tabela 4) foi de -23, sugerindo estabilidade física das partículas por estabilização eletrostática.

### 3.3.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

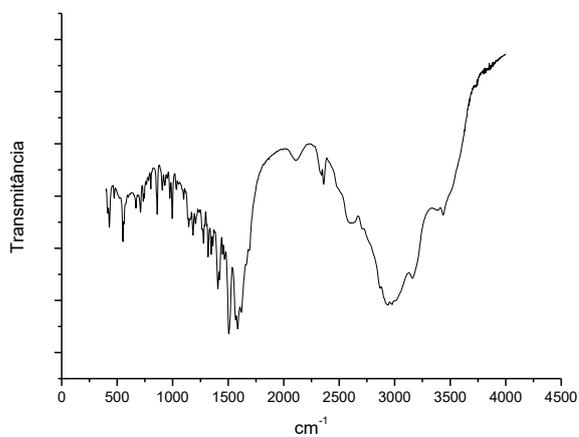
A FT-IR foi utilizada para monitorar qualquer mudança estrutural relacionada com os grupos funcionais característicos tanto nas nanopartículas quanto no AF

livre. Na Figura 12 são apresentados os espectros dos compostos livres, misturas físicas e nanopartículas de caseína, respectivamente.

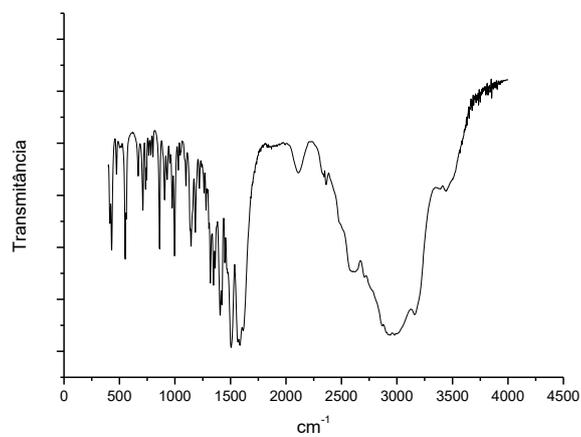
As bandas características para o AF livre são observadas na Figura 12 C. Observa-se a vibração da deformação axial da hidroxila livre entre  $3650 - 3584\text{cm}^{-1}$  banda que não se apresenta forte. A deformação axial dos fenóis absorvem em  $1390 - 1330\text{cm}^{-1}$  e em  $1260 - 1180\text{cm}^{-1}$  referentes à deformação angular de O-H e a deformação axial de C-O, as quais apresentam-se muito intensa quando a amostra é analisada em solução. A banda entre  $3300$  e  $2500\text{cm}^{-1}$  é característica de deformação axial de O-H dos dímeros de ácido carboxílico. O centro da banda normalmente encontra-se em  $3000\text{cm}^{-1}$  e as bandas de deformação axial de C-H da porção alquila mais fracas, acabam sendo superpostas a banda mais larga de O-H. No entanto, bandas de ácidos carboxílicos costumam ser bem mais intensas. Observa-se ainda no espectro, próximo de  $1601\text{cm}^{-1}$ , a banda referente à deformação axial de C=C das vibrações das duplas ligações carbono-carbono do anel aromático e alongamento da ligação C-O (SILVERSTEIN et al., 2015; HEEP et al., 2019).

A figura 12 B traz o espectro da lisina. Esse tem duas regiões bem definidas e características. A banda mais intensa na região de  $3000\text{cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de O-H dos dímeros de ácido carboxílico, neste espectro com maior intensidade. As vibrações de deformação angular de N-H dos grupos amins são observadas entre  $1650$  e  $1580\text{cm}^{-1}$ , possuindo intensidade forte. Em amins primárias, as vibrações de deformação axial de C-N são observadas entre  $1250$  e  $1020\text{cm}^{-1}$ , com fraca intensidade, como observa-se no espectro da lisina (SILVERSTEIN et al., 2015; HEEP et al., 2019).

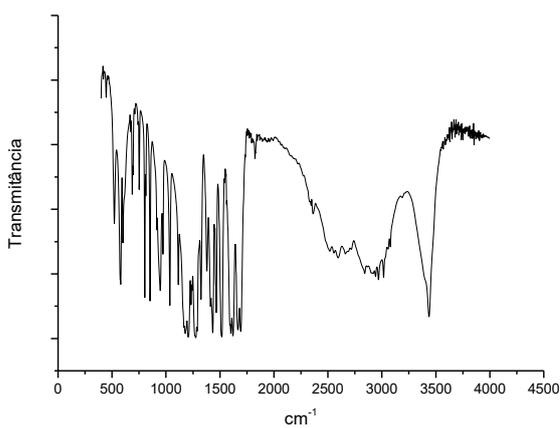
**Figura 12:** Espectros de FT-IR: Mistura física dos componentes das Nps Cas-AF (A); Lisina (B); AF (C); Nanopartícula de caseína carregadas com AF (D); Nanopartícula de caseína (E); Caseína (F).



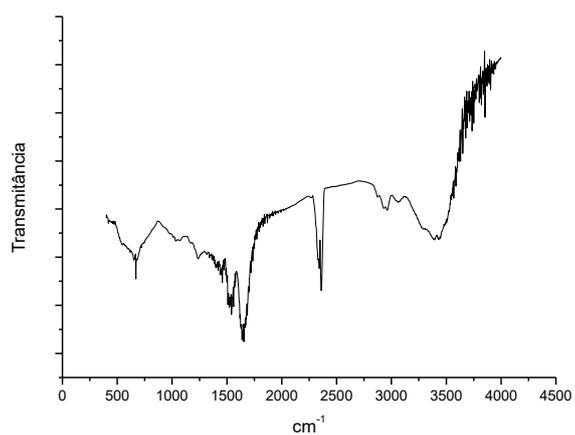
**(A) Mistura Física**



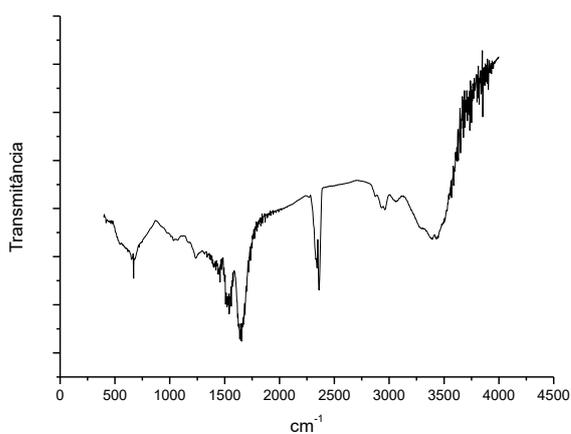
**(B) Lisina**



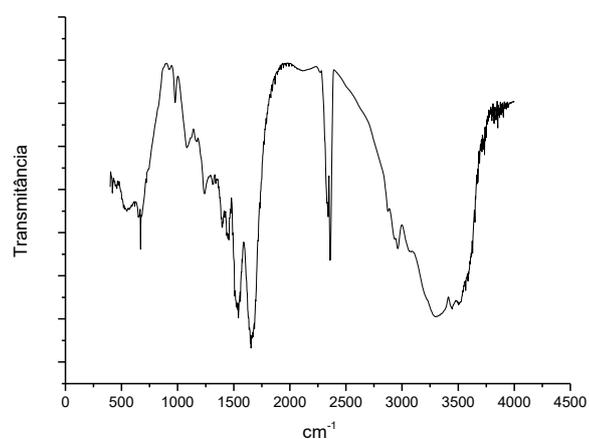
**(C) AF**



**(D) Nps Cas-AF**



**(E) Nps Cas**



**(F) Caseína**

Fonte: O autor.

O espectro na região do infravermelho da caseína (Figura 12 F) apresenta a absorção de deformação axial de O-H dos dímeros de ácidos carboxílicos não tão intensa próxima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de deformação axial de C=O dos ácidos carboxílicos, presentes na composição dos aminoácidos proteicos são consideravelmente mais intensas de que as bandas C=O das cetonas, absorvendo em aproximadamente  $1760\text{ cm}^{-1}$ . As amidas em estado sólido apresentam bandas próximas de  $3400\text{ cm}^{-1}$  que provêm das deformações axiais assimétricas e simétricas de N-H. A absorção de C=O das amidas ocorre em comprimentos de onda superiores ao observado para a carbonila de cetonas e aldeídos devido ao efeito de ressonância, apresentando-se a banda de amida I em estado sólido em  $1650\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN et al., 2015; HEEP et al., 2019).

O espectro proveniente da mistura física (Figura 12 A) apresenta bandas mais semelhantes ao espectro da lisina, porém com menor intensidade. Ainda, na região de  $1601\text{ cm}^{-1}$ , é possível observar uma banda de fraca intensidade, provavelmente, proveniente da deformação axial de C=C das vibrações das duplas ligações carbono-carbono do anel aromático e alongamento da ligação C-O presentes no AF, sugerindo, que o composto não está encapsulado (HEEP et al., 2019).

As figuras 12 D e E trazem os espectro das nanopartículas de caseína carregadas com AF e nanopartículas de caseína, respectivamente. No espectro proveniente das nanopartículas de caseína carregadas com AF não se observam mais algumas bandas características do AF, e outras estariam sobrepostas às bandas do polímero. Na verdade, se tem o padrão da caseína nestes dois espectros, o que sugere a formação do sistema nanoparticulado.

Com base nos resultados obtidos, e apesar da sobreposição das bandas do AF com os polímeros, pode-se sugerir que o método utilizado para obtenção das nanopartículas permitiu o nano-encapsulamento do composto e, não causou alterações ou mudanças nos grupos funcionais característicos dos componentes utilizados, já que não se observou presença de novas bandas que indicasse o contrário.

### 3.3.2.3 Difractometria de Raios X

As características de saturação, solubilidade e estabilidade são fortemente influenciadas pelas características de cristalinidade ou amorfização que as partículas sólidas apresentam (DHIRENDRA et al., 2009). A DRX identifica em materiais sólidos as fases cristalinas e amorfas, sendo que as substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos, pois têm uma estrutura altamente organizada, em contraposição aos compostos amorfos (DHIRENDRA et al., 2009; BEYERLEIN et al., 2010).

A Figura 13 traz os difratogramas do AF (13A), caseína (13B), lisina (13C), mistura física dos componentes das Nps Cas-AF (13D) e das nanopartículas de caseína carregadas com AF (13E) e nanopartículas de caseína (13F).

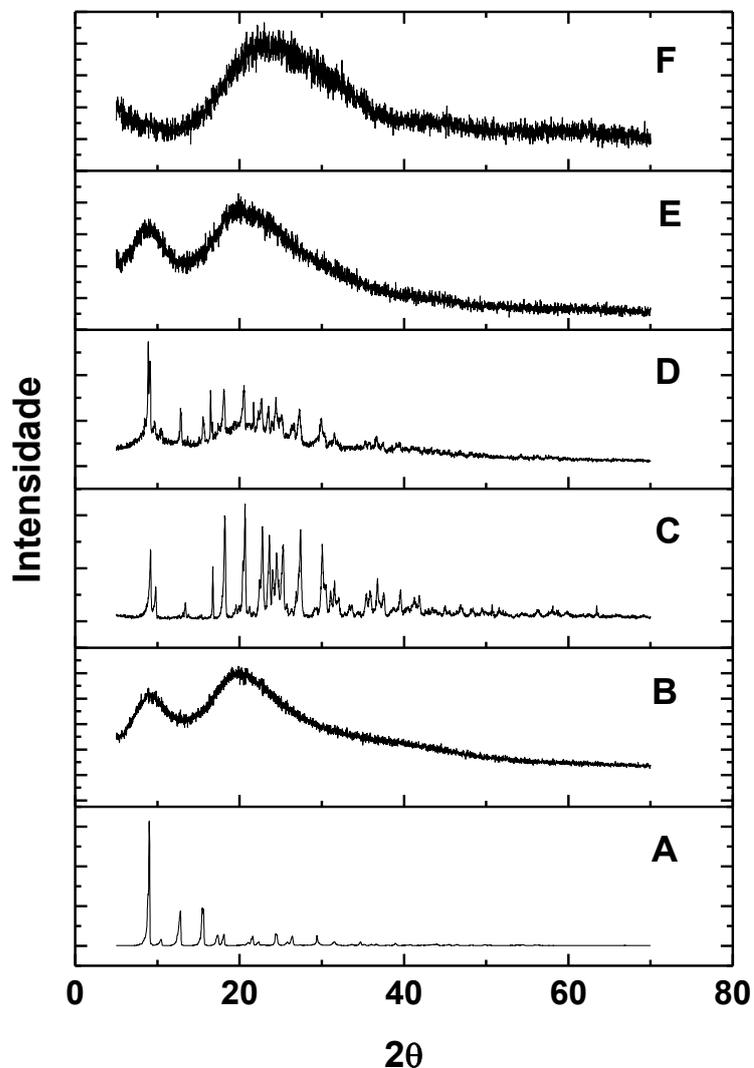
O AF (Figura 13A) apresenta um difratograma característico de um composto cristalino, com um pico principal em  $9,94^\circ$  (HEEP et al. 2019). A lisina (Figura 13C) também é um composto cristalino, porém, com uma variedade de picos entre  $15^\circ$  e  $30^\circ$  indicando sua cristalinidade (BATISTA, 2016). As proteínas são substâncias amorfas, não apresentando picos definidos, o que se confirma pelo difratograma da caseína (Figura 13B).

Analisando a mistura física (Figura 13D) ainda percebe-se um padrão de cristalinidade no sistema, ou seja, a simples mistura dos compostos, não é capaz e encapsular o composto e amorfizar o sistema.

No difratograma das nanopartículas de caseína carregadas com AF (Figura 13E) não se observou os picos de difração característicos da estrutura cristalina do AF, indicando que houve uma incorporação deste no sistema nanoestruturado, sugerindo a amorfização do composto.

A amorfização de fármacos e compostos bioativos pode ser usada para aumentar a solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade desses (KASTEN et al., 2017).

**Figura 13:** Difratogramas para o AF (A); caseína (B); lisina (C); mistura física dos componentes das Nps Cas-AF (D); nanopartículas de caseínas carregadas com AF (E) e nanopartículas de caseína (F).



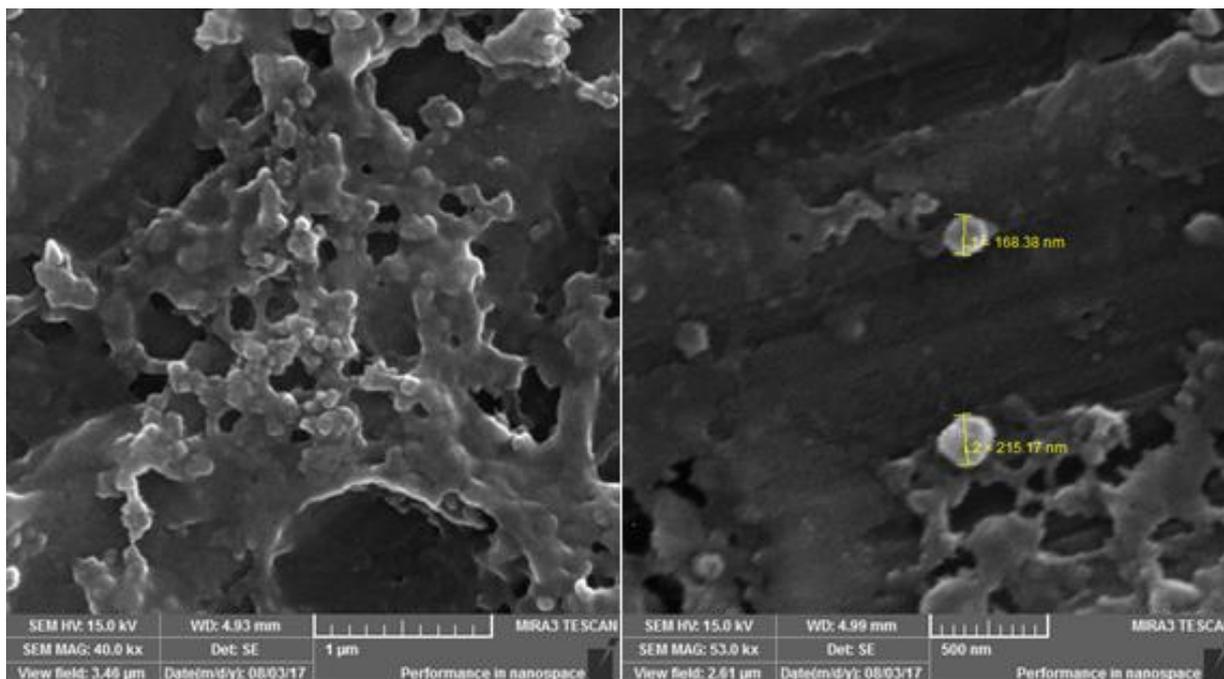
Fonte: O autor.

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

Os resultados anteriores demonstraram a obtenção de nanopartículas com média de diâmetro reduzido, e com índice de polidispersão abaixo de 0,3. No entanto, imagens são necessárias para a efetiva avaliação do diâmetro e a presença de morfologia regular e esférica.

A confirmação do diâmetro e esfericidade das nanopartículas é um resultado de grande importância e este foi obtido por meio de imagens obtidas por MEV-FEG. Os resultados obtidos mostram morfologia esférica, como pode ser observado nas fotomicrografias obtidas na figura 14.

**Figura 14:** Fotomicrografias das nanopartículas de caseína carregadas com AF observadas por MEV-FEG, com aumento de 40000X (imagem da esquerda) e 53000X (imagem da direita).



**Fonte:** O autor.

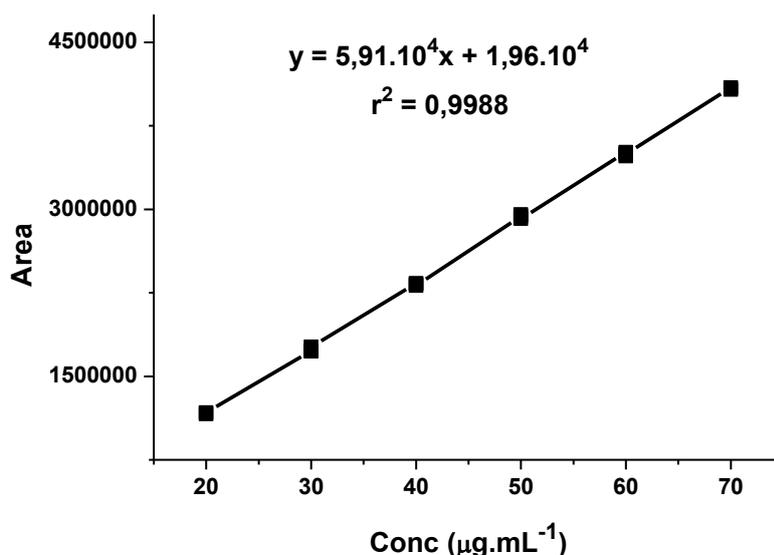
### 3.3.3 Adaptação da validação da metodologia analítica para quantificação do AF por CLAE

A quantificação do AF foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia desenvolvida e validada por Lima, Khalil e Mainardes (2017), conforme descrito na metodologia nos itens 3.3.3 e 3.3.4.

A curva analítica (Figura 15) obtida a partir de 6 diferentes concentrações de AF (20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL), demonstrou a linearidade do método, visto que o resultado obtido foi diretamente proporcional às concentrações avaliadas. Verificou-se ainda que o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) obtido (0,9988) também indica a

linearidade do método, uma vez que segundo a Anvisa este deve ser no mínimo 0,99 (ANVISA, 2003).

**Figura 15:** Curva analítica de AF solubilizado em etanol e diluído em acetonitrila. Fase móvel: CH<sub>3</sub>COOH 0,5%:ACN (70:30, v/v), fluxo de 0,9 ml/min, detecção no comprimento de onda de 310 nm, volume de injeção de 10 µL.



Fonte: O autor.

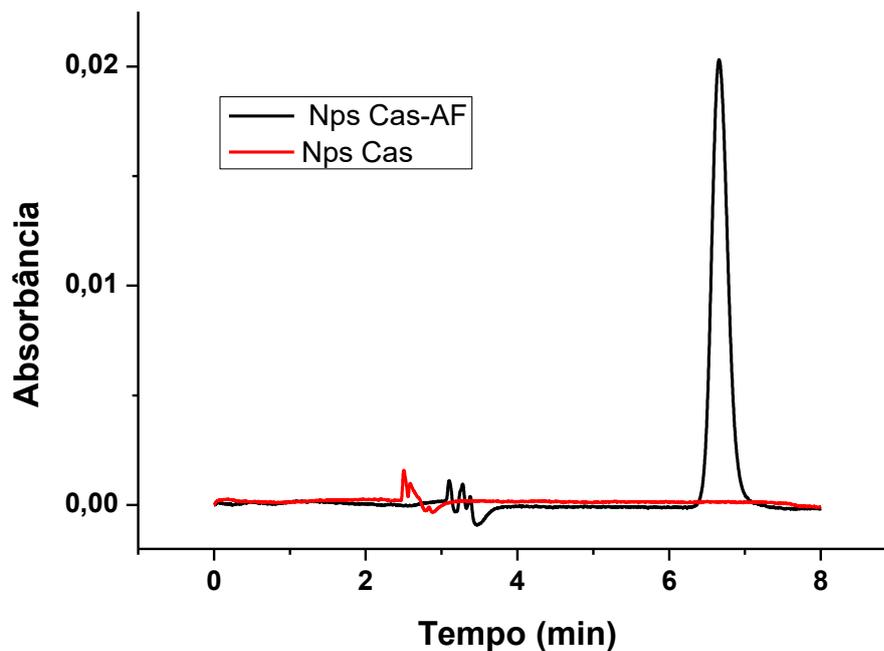
O limite de detecção e quantificação foram determinados a partir dos valores obtidos na curva analítica (Figura 15) e com auxílio das equações 1 e 2. O LD obtido foi 1,38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o LQ de 4,60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.

Para demonstrar a especificidade do método, compararam-se os cromatogramas do sobrenadante das nanopartículas com e sem AF (Figura 16), a fim de demonstrar a especificidade do método na quantificação do AF.

O cromatograma do sobrenadante de uma amostra de nanopartículas de caseína sem AF foi sobreposto com o sobrenadante de uma amostra de nanopartículas de caseína carregada com AF.

Observando a figura 16, ao comparar-se o sobrenadante das nanopartículas sem e com AF, pode-se afirmar que essa metodologia mostrou-se específica para a identificação e quantificação de AF, pois não houve nenhum outro componente com o mesmo tempo de retenção do AF que dificultasse sua quantificação.

**Figura 16:** Cromatogramas de nanopartículas de caseína (Nps Cas) e nanopartículas de caseína carregadas com AF (Nps Cas-AF) para demonstração da especificidade do método.



Fonte: O autor.

### 3.3.4 Eficiência de Encapsulação

A avaliação da eficiência de encapsulação pode ser obtida pelo método direto, onde se degrada a matriz polimérica e extrai-se o composto que foi encapsulado ou, pelo método indireto, onde quantifica-se o composto que não foi incorporado à matriz polimérica, sendo esse o método de escolha no presente estudo (LINDNER et al., 2015).

A quantidade de AF incorporado nas nanopartículas de caseína foi  $26 \pm 6\%$ , calculado através da equação 3. Esta eficiência foi determinada por CLAE pelo método indireto, ou seja, a partir da quantidade de AF não encapsulada presente no sobrenadante após ultracentrifugação das nanopartículas, como descrito na metodologia.

A EE obtida foi inferior a valores encontrados na literatura para polímeros sintéticos ou nanolipídicas. Em nanopartículas de PLGA carregadas com AF, foram encontradas EE de 60% (LIMA, KHALIL, MAINARDES, 2017) e 76% (MERLIN et al., 2012). Em nanolipídicas a EE foi em torno de 80% (THAKKAR et al., 2015). No entanto, os polímeros sintéticos agregam um alto custo ao processo de nanoencapsulação e, assim como nas nanolipídicas, utilizam solventes orgânicos mais tóxicos e em maior quantidade.

O uso da lisina como agente estabilizante para a caseína pode ter afetado a EE, já que esta, para gerar maior estabilidade a caseína, acaba interagindo com cadeias laterais do polímero (PENALVA et al., 2015). Assim, restariam menos locais de interação disponíveis para o AF, o que justificaria esta menor EE.

### 3.4 CONCLUSÃO

As nanopartículas de caseína foram obtidas com sucesso utilizando a metodologia de dessolvatação. Foram caracterizadas pela demonstração de tamanhos médios nanométricos, baixo índice de polidispersão, altos valores de potencial Zeta e morfologia esférica. Os difratogramas de raios X mostraram a mudança no estado cristalino do AF após nanoencapsulação, indicando a amorfização do sistema. Os espectros no infravermelho não demonstraram a alteração ou formação de novos grupos funcionais. A EE indica as nanopartículas de caseína como um sistema viável para o encapsulamento de AF, tendo em vista os baixos custos e atoxicidade do mesmo. Além disso, seu tamanho reduzido permite administração parenteral.

Apesar de bons resultados quanto aos parâmetros físicos-químicos, o sistema de caseína-lisina, não apresentou bons resultados frente a ensaios biológicos. Além disso, estas nanopartículas não poderiam ser administradas via oral devido a sensibilidade da caseína a baixos pH's. Sendo assim, foi proposto um novo sistema de nanoencapsulação para o AF, que pudesse melhorar seus aspectos físicos-químicos e também biológicos.

## REFERÊNCIAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 889 de 29 de maio de 2003. Brasília, 2003.

BATISTA, J. C. Estudo das Propriedades Vibracionais e Estruturais dos Cristais Monocloridrato de l-lisina dihidratada e monocloridrato de dl-lisina. 2016. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Física) – Universidade Federal do Ceará, 2016.

CHANG, C.; WANG, T.; HU, Q.; LUO, Y. Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization, *International Journal Biological Macromolecules*. v. 104, p. 117–124, 2017.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review, *Journal American Academic Dermatology*. v. 67, p. 1013–1024, 2012.

DE KRUIF, C., & GRINBERG, V. Micellisation of  $\beta$ -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 210(2-3), p. 183–190, 2002.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química Nova*, v. 36, p. 1520-1526, 2013.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions : a Review, *Pak. Journal Pharmaceutical Science*. v. 22, p. 234–246, 2009.

ELZOGHBY, A.O.; ABO EL-FOTOH, W.S.; ELGINDY, N.A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release*. v. 153, p. 206–216, 2011.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 118, 2004.

HEEP, G.; ALMEIDA, A.; MARCANO, R.; VIEIRA, D.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; SARMENTO, B. Zein-casein-lysine multicomposite nanoparticles are effective in modulate the intestinal permeability of ferulic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 138, p. 244-251, 2019.

HUO, M.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, J. Formation, microstructure, biodistribution and absence of toxicity of polymeric micelles formed by N-octyl-N,O-carboxymethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 83(4), p. 1959–1969, 2011.

KASTEN, G., NOURI, K., GROHGANZ, H., RADES, T., LÖBMANN, K. Performance comparison between crystalline and co-amorphous salts of indomethacin-lysine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 533(1), p. 138–144, 2017.

KIM, H.J.; RYU, K.; KANG, J.H.; CHOI, A.J.; T. KIM, IL; OH, J.M. Anticancer activity of ferulic acid-inorganic nanohybrids synthesized via two different hybridization routes, reconstruction and exfoliation-reassembly, *Science World Journal*, 2013.

LIMA, I. A. de; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. A stability-indicating HPLC-PDA method for the determination of ferulic acid in chitosan-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n° 2, p. 1-10. 2017.

LINDNER, G. R. Desenvolvimento Tecnológico de Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-Fluorouracil, Avaliação da Citotoxicidade sobre Células Tumorais e Farmacocinética Pré-Clínica. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Associação Ampla Unicentro e UEPG, Guarapuava, 2013.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects, *Food Chemistry Toxicology* v. 65, p. 185–195, 2014.

MERLIN, J.P.J.; RAJENDRA PRASAD, N.; SHIBLI, S.M.A.; SEBEELA, M. Ferulic acid loaded Poly-d,l-lactide-coglycolide nanoparticles: systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in nonsmall cell lung carcinoma cell line in vitro. *Biomedical Prevation Nutrition*, v.2, n.1, p.69-76, 2012.

MONTI, D.; TAMPUCCI, S.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAINO, V.; CENTINI, M.; STALTARI, L.; ANSELMINI, C. Permeation and distribution of ferulic acid and its  $\alpha$ -cyclodextrin complex from diferente formulations in hairless rat skin. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, v.12, n. 2, p. 514-520, 2011.

OBBER, C.A.; GUPTA, R.B. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. *Ideas Concyteg.*, v. 6, p. 714-726, 2011.

PENALVA, R.; ESPARZA, I.; AGÜEROS, M.; GONZALEZ-NAVARRO, C. J.; GONZALEZ-FERRERO, C.; IRACHE, J. M. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, v. 44, p. 399-406, 2015.

RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR, G.; BAKERI, G. Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein nanoparticles as colloidal carrier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 412, p. 96-100, 2012.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships, *Current Medical Chemistry*. v. 20, p. 4436–4450, 2013.

SEMO, E., KESSELMAN, E., DANINO, D., & LIVNEY, Y. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*, v. 21(5-6), p. 936–942, 2007.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, p. 43-56, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, 7a edição, p. 70-122, 2015.

SINDAYIKENGERA, S. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from protamex. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 7, n. 2, p. 90-98, 2006.

THAKKAR, A.; CHENREDDY, S.; WANG, J.; PRABHU, S. Ferulic acid combined with aspirin demonstrates chemopreventive potential towards pancreatic cancer when delivered using chitosan-coated solid-lipid nanoparticles. *Cellular Biosciencie*, v. 5:46, p. 1-14, 2015.

The Merck Index - OnLine, Royal Society of Chemistry 2019.  
<https://www.rsc.org/merck-index>. Acessado em 17/04/2019.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G. e GIMENES, M. L. Liberação de Benzoato de Cálcio de Filmes de Alginato de Sódio Reticulados com Íons Cálcio. *Polímeros*, v. 3, p. 175-181, 2011.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvente evaporation: An Overview of techniques and applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, Boca Raton, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Intertional Journal Medical Sciencie*. v. 11, p. 1185-1200, 2014.

YANG, M.-L.; SONG, Y.-M. Synthesis and investigation of water-soluble anticoagulant warfarin/ferulic acid grafted rare earth oxide nanoparticle materials, *RSC Advanced*. v. 5, p. 17824–17833, 2015.

ZHAO, Z., MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, v. 109, p. 691–702, 2008.

ZHOU, Y., HUA, S., YU, J., DONG, P., LIU, F., HUA, D. A strategy for effective radioprotection by chitosan-based long-circulating nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, p. 2931–2934, 2015.

ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 4, p. 1-8, 2001.

## 4 CAPÍTULO IV: SISTEMA MULTICOMPOSTO ZEÍNA-CASEÍNA-LISINA É EFICAZ NA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE ÁCIDO FERÚLICO

### 4.1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo ocorre quando radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs), são excessivamente produzidos nas células e, devido à sua reatividade, podem danificar moléculas biológicas, como lipídios, proteínas e DNA. Esses efeitos desempenham um papel importante no desenvolvimento de diversas patologias, como câncer, doenças neurológicas e cardiovasculares (CHEN; HU; WANG, 2012). O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é crucial para a função celular. O organismo humano apresenta defesas endógenas enzimáticas e não enzimáticas integradas, responsáveis por contrabalançar o estresse oxidativo gerado pelas EROs. Embora a eficiência do sistema antioxidante endógeno seja reconhecida, em algumas condições, esse sistema pode ser sobrecarregado, e a suplementação com antioxidantes exógenos é essencial (CAROCHO E FERREIRA, 2013; URBANIAK, SZELAG; MOLSKI, 2013).

Muitos compostos naturais bioativos têm se destacado devido às suas atividades antioxidantes, especialmente os ácidos fenólicos (RAZZAGHI-ASL et al., 2013). O ácido ferúlico (AF) é um composto fenólico derivado dos ácidos hidroxicinâmicos (DE PAIVA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013). O AF possui uma alta atividade antioxidante e esse potencial é devido à sua capacidade de neutralizar os radicais livres, reduzindo a degradação de proteínas e lipídios (MANCUSO E SANTANGELO, 2014). Embora estudos *in vitro* mostrem sua atividade antioxidante, os estudos *in vivo* não os refletiram, devido a desvantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas (RONDINI et al, 2002).

As nanopartículas biodegradáveis têm sido amplamente aplicadas para contornar as desvantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas de fármacos e compostos bioativos, permitindo as suas aplicações em várias vias, incluindo a administração oral. As nanopartículas à base de proteínas vêm ganhando grande interesse nos últimos anos devido à sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e capacidade de interação com compostos hidrofóbicos e hidrofílicos em sua superfície (TARHINI, 2017; FUCHS e COESTER, 2002).

A zeína é uma proteína da classe prolamina encontrada no milho (LAWTON, 2002). Consiste em 17 aminoácidos, a maioria dos quais são apolares (CORRADINI et al., 2014). Sua estrutura secundária tem uma forma helicoidal e as interações que estabilizam essa estrutura são as ligações de hidrogênio e as forças de *van der Walls* (ARGOS et al., 1982). As nanopartículas à base de zeína possuem grande repetibilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, em comparação a outras nanopartículas baseadas em proteínas. No entanto, essas partículas tendem a se agregar se o pH estiver próximo ao ponto isoelétrico da zeína (6,2). Agentes emulsificantes como caseína foram aplicados como estabilizantes para evitar a agregação (CHANG et al., 2017). Assim, a literatura lista várias nanopartículas desenvolvidas para resistência e maior estabilidade gastrointestinal, incluindo zeína/caseína/pectina (CHANG et al., 2017), zeína/caseína/quitosana (PAULUK et al., 2019), zeína/caseinato/alginato (ZHANG et al., 2019), zeína/ácido hialurônico (CHEN et al., 2019) e outras composições.

Neste trabalho, o AF foi encapsulado em nanopartículas à base de zeína-caseína-lisina visando melhorar seus efeitos biológicos quando administrado pela via oral. Essas nanopartículas desenvolvidas foram caracterizadas físico-quimicamente, e a permeabilidade intestinal *in vitro* foi avaliada por meio dos modelos monocultura Caco-2 e co-cultura Caco-2/HT29-MTX.

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Materiais

Ácido ferúlico (AF; 99%), zeína (99%), caseinato de sódio (99%) e lisina (99%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). O etanol (99%) foi adquirido da Fmaia (Cotia, Brasil). A acetonitrila de grau cromatográfico foi obtida da LiChrosolv-Merck (Darmstadt, Alemanha).

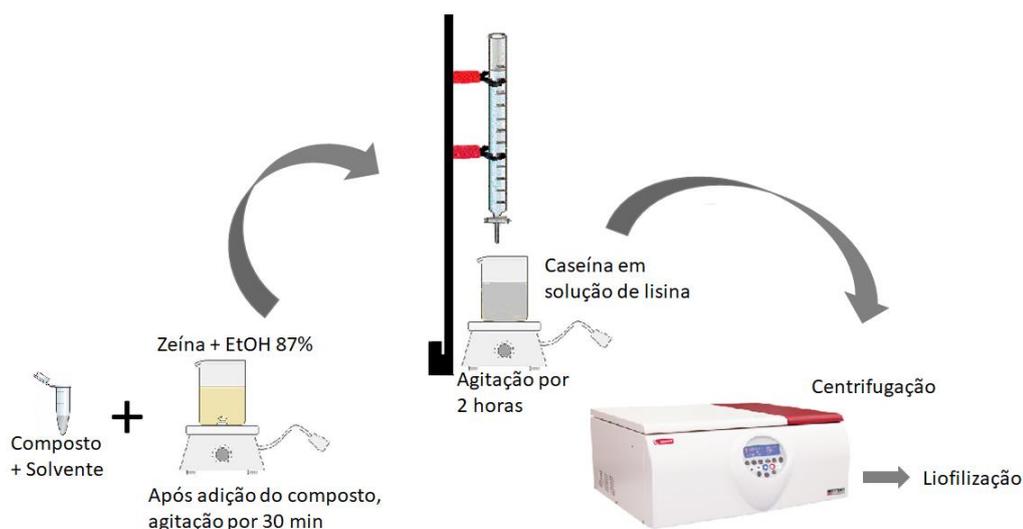
As células Caco-2 (clone C2BBE1) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA), e a linhagem celular HT29-MTX foi gentilmente cedida pelo Dr. T. Lesuffleur (INSERMU178, Villejuif, França) e utilizada nas passagens 56-81 e 48-67, respectivamente. As células foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle medium* (DMEM, Lonza) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS,

Merck Millipore), 1% (v/v) de penicilina (100 UI/mL, Merck Millipore) e estreptomicina (100 µg/mL, Merck Millipore). A *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) e a tripsina foram adquiridas da Gibco (Carlsbad, CA). Os reagentes químicos brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) e Triton X-100 foram adquiridos da Sigma Aldrich.

#### 4.2.2 Preparação das Nanopartículas

As nanopartículas de zeína foram preparadas pelo método de dispersão líquido-líquido (figura 17) (CHANG et al., 2017). Primeiro, foi preparado uma solução 10% de caseinato de sódio (m/v) em 16 mL de solução de lisina a 8% (m/v). A Zeína (60 mg) foi solubilizada em 3 mL de solução de etanol a 87% e mantida sob agitação magnética até completa solubilização. Depois, 0,5% de AF (m/v) em etanol foi adicionado à solução de zeína. Esta solução foi mantida sob agitação magnética durante 30 minutos e então adicionada gota a gota à solução de caseinato de sódio. A dispersão das nanopartículas formadas permaneceu sob agitação magnética por 2 horas e, posteriormente, foi centrifugada (15500 rpm, 8 °C, 20 min). Finalmente, as nanopartículas foram ressuspensas em solução crioprotetora (sacarose a 10% (m/v)) ou água ultrapura e liofilizadas.

**Figura 17:** Representação do processo de obtenção de nanopartículas de zeína-caseína-lisina pelo método de dispersão líquido-líquido.



Fonte: O autor.

#### 4.2.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação do AF (EE) foi realizada por método indireto. O sobrenadante contendo o AF não encapsulado foi recolhido e analisado por CLAE. Para a quantificação foi utilizado um cromatógrafo Merck-Hitachi 7000 com coluna Spherisorb® ODS2, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm. A fase móvel foi composta por ácido acético a 0,5%/acetonitrila (70:30 v/v), a vazão e a temperatura foram ajustadas em 0,9 mL/min e 25° C, respectivamente. A detecção do AF foi monitorada medindo a absorbância a 310 nm (tempo de retenção ~ 5,6 min). Os experimentos foram realizados em triplicata, e a área total do pico foi utilizada para quantificar o AF livre, permitindo a determinação da EE, de acordo com a equação 3.

#### 4.2.4 Propriedades Físico-Químicas das Nanopartículas

O diâmetro médio (DM) e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados por meio espalhamento dinâmico de luz (DLS) (BIC 90 plus, Brookhaven Instruments Corp., NY, EUA). Uma alíquota das suspensões de nanopartículas foi diluída (1:200, v/v) em água ultrapura e analisada com ângulo de espalhamento de 90°, temperatura de 25 °C e comprimento de onda de 660 nm.

O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética de nanopartículas em suspensão (Zetasizer ZS, Malvern, UK). As amostras foram diluídas (1:200 (v/v)) em solução de KCl 1 mM para manter a força iônica do meio e colocadas em uma célula eletroforética a 25 °C sob o potencial de  $\pm 150$  mV. A morfologia foi examinada por um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (MEV-FEG, MIRA3 LM, Tescan, República Checa), com uma voltagem de aceleração de 15 kV. Uma gota da dispersão das nanopartículas foi distribuída em suporte metálico (*stub*). Após a secagem, a amostra foi metalizada com ouro coloidal sob vácuo. As micrografias foram realizadas com aumentos de 17 e 45,8 mil vezes.

#### 4.2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR das amostras foram realizados em intervalos de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com 64 *scans* e a resolução foi de 4  $\text{cm}^{-1}$  (FTIR-7600, Lambda Scientific, Austrália).

#### 4.2.6 Difractometria de Raios X

As medições de DRX foram realizadas utilizando radiação  $\text{Cu K}\alpha$  a um comprimento de onda de 1,54 Å à temperatura ambiente (D2 Phaser, Bruker, Alemanha). A tensão e a corrente aplicadas foram 40 kV e 30 mA, respectivamente. As amostras foram acondicionadas em um porta-amostras de vidro e digitalizadas de 5 a 70° em um ângulo de  $2\theta$  com variação de 0,02°/min.

#### 4.2.7 Ensaio de Liberação *in vitro*

Nanopartículas contendo AF (300  $\mu\text{g/mL}$  de AF) foram suspensas em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 50 mM, pH 7,4) e mantidas sob agitação (150 rpm, 37 °C). Em tempos predeterminados (1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48h), a suspensão foi centrifugada (15500 rpm, 15 min, 37 °C) e o sobrenadante foi recolhido para quantificação de AF.

#### 4.2.8 Ensaio de Permeabilidade Intestinal *in vitro*

##### 4.2.8.1 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade das nanopartículas de zeínas-caseína-lisina, nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF e AF livre foi avaliada nas linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX pelo método colorimétrico quantitativo de MTT. As

células foram cultivadas em frascos de cultura com meio suplementado com DMEM como descrito anteriormente.

Para o ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços (200  $\mu\text{L}$ ) com densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço para linhagem celular HT29-MTX e  $2 \times 10^4$  células/poço para a linhagem Caco-2, e então incubadas em uma incubadora Binder® a 37 °C com atmosfera humidificada e 5% de  $\text{CO}_2$  para atingir crescimento exponencial antes de realizar o ensaio. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS (ARAÚJO e SARMENTO, 2013). Em seguida, as células foram incubadas com nanopartículas de zeína-caseína-lisina, nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF ou AF livre em uma faixa de concentrações de 0,1 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o ensaio de 24 h. Além disso, um ensaio de 4 h foi realizado, em que as células permaneceram incubadas com nanopartículas carregadas com AF ou AF livre para as concentrações selecionadas de 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Também foi incluído um controle positivo, que consistiu em DMEM suplementado e um controle negativo, 1% (m/v) de Triton X-100 no meio de cultura. As amostras foram então removidas e as células foram lavadas duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS pré-aquecido e, em seguida, 200  $\mu\text{L}$  do reagente MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e as placas foram incubadas por 4 h. Após a incubação, o MTT foi removido e 200  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para a dissolução dos cristais formados. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorbância foi lida a 570 nm e 630 nm em leitor de microplacas (Synergy 2, Biotek Instruments Ltda, EUA).

#### *4.2.8.2 Ensaio de permeabilidade*

O modelo de monocultura Caco-2 e o modelo de co-cultura Caco-2/HT29-MTX foram semeados em placas Transwell™ de 24 poços (membrana PET transparente, poro de 3  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 0,3  $\text{cm}^2$ ). As células foram semeadas no compartimento apical com uma densidade final de  $1 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$  em cada inserção e cultivadas para formar uma monocamada por 21 dias, com reposição de meio a cada dois dias. No caso do modelo de co-cultura, as células Caco-2 e HT29-MTX foram semeados na proporção de 90:10, respectivamente (ARAÚJO e SARMENTO, 2013).

Antes do ensaio de permeabilidade, o DMEM foi removido dos compartimentos apical e basolateral, os quais foram lavados com HBSS pré-aquecido. Todos os poços foram deixados equilibrar durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, o HBSS foi removido do compartimento apical e partículas carregadas com AF ou AF livre preparadas em HBSS na concentração de 300 µg/mL foram adicionadas. O teste de permeabilidade foi realizado a 37 °C e com agitação a 100 rpm durante 4 h. Em diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min), 200 µL de cada amostra foi coletada do lado basolateral do implante Transwell™ e o mesmo volume de HBSS pré-aquecido foi adicionado. No final do experimento, 200 µL do compartimento apical foi removido para posterior análise. O AF foi quantificado por análise de CLAE, como descrito anteriormente.

A integridade das monocamadas de células foi avaliada no decorrer dos 21 dias, antes do experimento e durante o experimento, usando um eletrodo de Chopstick (EVOM) (ARAÚJO e SARMENTO, 2013). Os resultados de permeabilidade e os valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) foram expressos em porcentagem. Os valores de TEER foram normalizados de acordo com o valor de TEER após o equilíbrio.

#### 4.2.9 Análise Estatística

Todos os dados foram reportados como média ± desvio padrão (DP), e a diferença entre os grupos foi avaliada usando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida da análise de pós-teste de Tukey usando o software Graph Pad Prism 6.0. A significância estatística foi estabelecida em \* p <0,05.

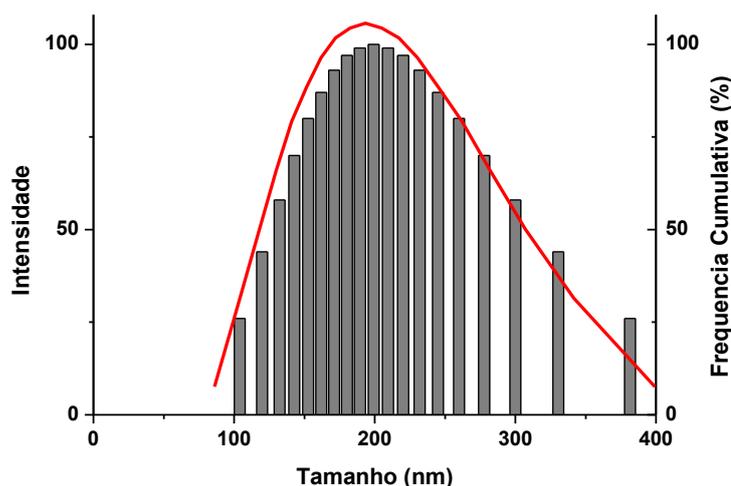
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Preparação das Nanopartículas e Caracterização

Neste estudo, nanopartículas de zeína contendo AF foram obtidas pelo método de dispersão líquido-líquido e estabilizadas por caseína e lisina. O diâmetro

médio das nanopartículas foi  $199 \pm 4$  nm e o IPD foi 0,17, indicando a homogeneidade da distribuição de tamanho. A Figura 18 representa a distribuição de tamanho das nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF, e um perfil monomodal é observado. Não foi observado nenhuma partícula com tamanho superior a 400 nm. O potencial zeta foi  $-25,6 \pm 1,8$  mV e a eficiência de encapsulação foi  $23 \pm 10\%$ . As nanopartículas apresentaram um aumento no tamanho médio após a liofilização ( $p < 0,05$ ), como avaliado por DLS, no entanto, o tamanho de partícula foi inferior a 350 nm.

**Figura 18:** Distribuição de tamanho de uma amostra representativa de nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF. Diâmetro médio de 199 nm e índice de polidispersão 0,17.



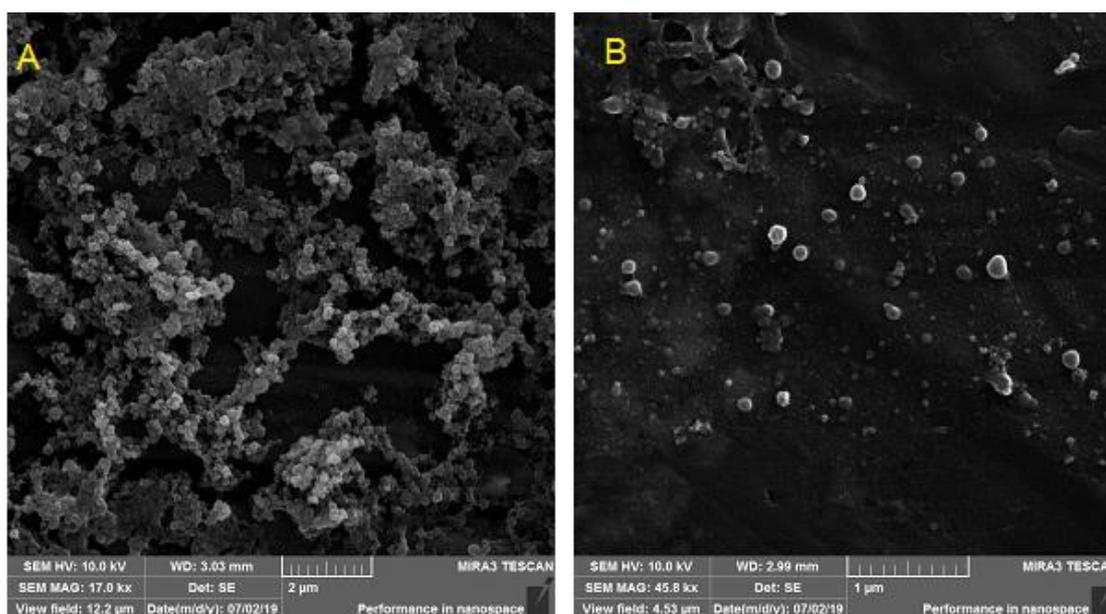
**Fonte:** O autor.

O tamanho da partícula, distribuição de tamanho e carga superficial são parâmetros chave que determinam não apenas a estabilidade física das nanopartículas mas seu destino após a administração, interação com a membrana biológica, permeabilidade através das barreiras fisiológicas, sua permanência na corrente sanguínea e sua subsequente liberação (WU; ZHANG; WATANABE, 2011). As nanopartículas multicomponentes obtidas neste estudo apresentam distribuição de tamanho viável para administração oral, uma vez que partículas de até 750 nm foram relatadas para administração oral (SARMENTO et al., 2007). Além disso, é relatado que a zeína apresenta resistência gastrointestinal, especialmente com

revestimento adequado (quitosana, pectina, hialuronato, etc), permitindo sua administração oral (ZHANG et al., 2019). O potencial zeta das nanopartículas foi negativo (-25 mV) em pH 7,4, devido à carga superficial da proteína que é conferida pelo arranjo de aminoácidos (ELZOGHPBY; ABO EL-FOTOH; ELGINDY, 2011; CORRADINI et al., 2014), sugerindo a estabilidade física das nanopartículas por estabilização eletrostática. Ainda, partículas negativas são capazes de formar interação eletrostática com muco (SARMENTO et al, 2007), um requisito importante para a administração oral.

Imagens MEV-FEG mostraram uma morfologia esférica para as nanopartículas de zeína-caseína-lisina (Fig. 19A e B). O tamanho observado confirma os obtidos na análise DLS.

**Figura 19:** Fotomicrografias de nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF, em agregados (A) e isoladas (B).



**Fonte:** O autor.

A EE obtida é possivelmente devido às interações entre AF e zeína. O AF possui baixa solubilidade em água (ZHOU et al., 2015), assim como a zeína, que é insolúvel em água e solúvel em soluções contendo pelo menos 70% de etanol (LAWTON, 2002). Além disso, a zeína consiste de 17 aminoácidos diferentes, a maioria dos quais são apolares e, as interações que estabilizam sua estrutura são as ligações de hidrogênio e as forças de *van der Waals* (ARGOS et al., 1982). As mesmas interações podem ocorrer entre AF e zeína. No entanto, como se tem um

sistema multicomposto, com a presença de caseína e lisina para estabilizar as nanopartículas, a EE pode ser reduzida, em função das interações promovidas, principalmente pela lisina com as cadeias laterais dos aminoácidos da zeína.

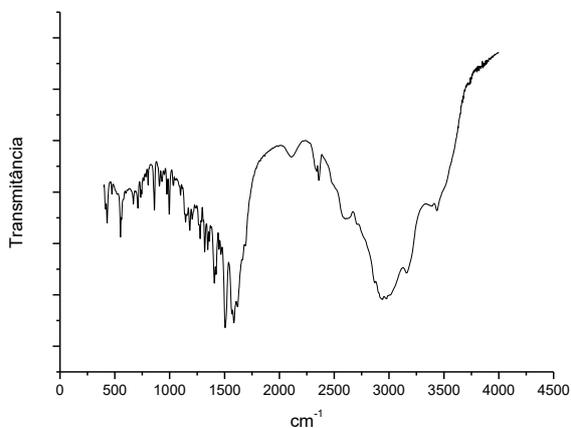
#### 4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise por FT-IR foi realizada para monitorar qualquer alteração estrutural relacionada aos grupos funcionais característicos de nanopartículas e AF livre. Os espectros de compostos livres, mistura física e nanopartículas de zeína-caseína-lisina são mostrados na Figura 20.

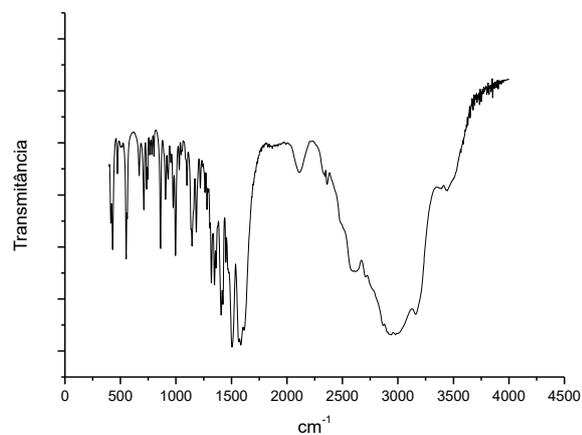
As bandas características de AF livre são observadas na figura 20C. Observa-se a vibração da deformação axial da hidroxila livre entre  $3650-3584\text{ cm}^{-1}$ . Essa não se apresenta forte devido ao estado da amostra, que foi analisada em pó. A deformação axial dos fenóis absorve  $1390-1330\text{ cm}^{-1}$  e  $1260-1180\text{ cm}^{-1}$  para a deformação angular de O-H e a deformação axial de C-O, que são muito intensas quando a amostra é analisada em solução. A faixa entre  $3300$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$  é característica da deformação axial de O-H dos dímeros de ácido carboxílico. O centro da banda situa-se geralmente a  $3000\text{ cm}^{-1}$  e as bandas de deformação axial C-H da porção alquila mais fraca sobrepõem-se à banda mais larga de O-H. No entanto, as bandas de ácidos carboxílicos tendem a ser mais intensas. Observa-se também no espectro próximo ao pico de  $1601\text{ cm}^{-1}$  para a deformação axial de C=C vibrações das duplas ligações carbono-carbono do anel aromático e alongamento da ligação C-O (SILVERSTEIN et al., 2015).

Os espectros de FT-IR da lisina (Figura 20B) têm duas regiões características bem definidas. A faixa mais intensa na região de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de O-H dos dímeros de ácidos carboxílicos, neste espectro com maior intensidade. As vibrações de deformação angular N-H dos grupos amina são observadas entre  $1650$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ , com forte intensidade. Em aminas primárias, as vibrações de deformação axial de C-N são encontradas entre  $1250$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$ , com baixa intensidade, como observado no espectro da lisina (SILVERSTEIN et al., 2015).

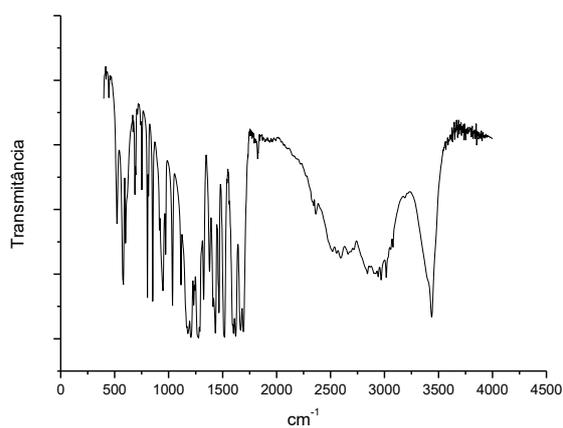
**Figura 20:** Espectros de FT-IR: (A) Mistura física; (B) Lisina; (C) Ácido Ferúlico; (D) Nanopartícula de zeína-caseína-lisina carregadas com AF; (E) Zeína; (F) Caseína.



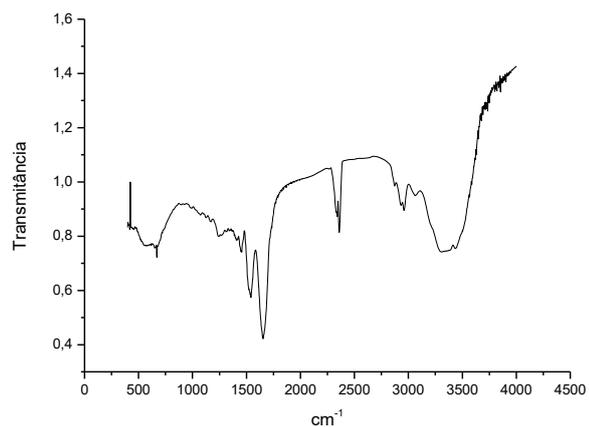
**(A) Mistura Física**



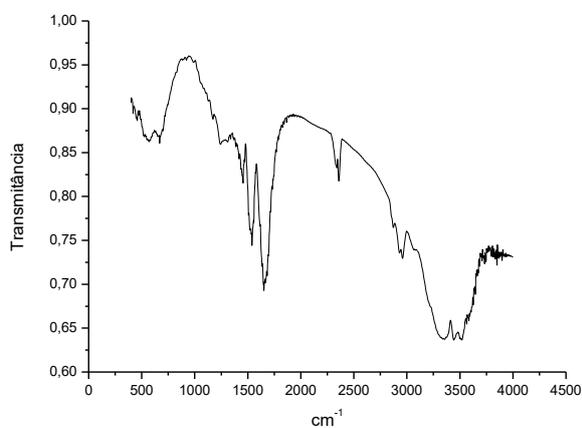
**(B) Lisina**



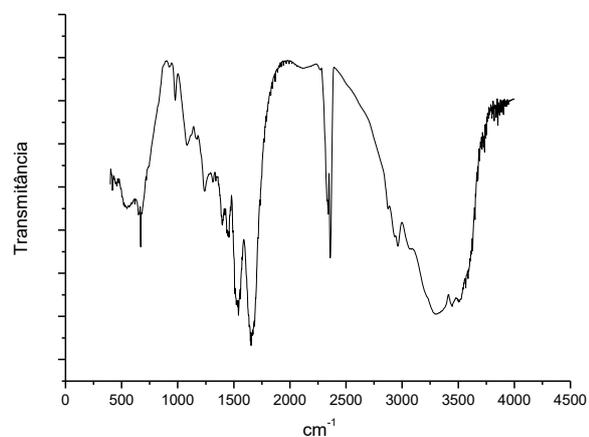
**(C) AF**



**(D) Nps Zei-AF**



**(E) Nps Cas**



**(F) Caseína**

Fonte: O autor.

O FT-IR para caseína e zeína (Figuras 20F e 20E) mostra a absorção da deformação axial de O-H de um dímero de ácidos carboxílicos perto de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de deformação axial C=O dos ácidos carboxílicos presentes na composição de aminoácidos da proteína são consideravelmente mais intensas do que as bandas C=O das cetonas, absorvendo a aproximadamente  $1760\text{ cm}^{-1}$ . As amidas de estado sólido possuem bandas próximas a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , provenientes de deformações axiais assimétricas e simétricas de N-H. A absorção de C=O das amidas ocorre em comprimentos de onda superiores aos observados para a carbonila normal devido ao efeito de ressonância, com a banda de amida sendo sólida a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN et al., 2015).

O FT-IR da mistura física (Figura 20A) apresenta bandas semelhantes ao espectro da lisina, mas menos intensas. Além disso, na região de  $1601\text{ cm}^{-1}$ , é possível observar uma banda de baixa intensidade, provavelmente advinda da deformação axial de C=C das vibrações das ligações duplas carbono-carbono do anel aromático e do alongamento da ligação de CO, presente no AF (SILVERSTEIN et al., 2015).

A Figura 20D mostra os espectros de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF. Nestes espectros, não são mais observadas algumas bandas características de AF, e outras bandas poderiam estar sobrepostas nas bandas do polímero.

Com base nos resultados e apesar da sobreposição das bandas do AF nas nanopartículas, não houve alterações nos grupos funcionais característicos dos componentes, uma vez que nenhuma nova banda foi encontrada para indicar o contrário.

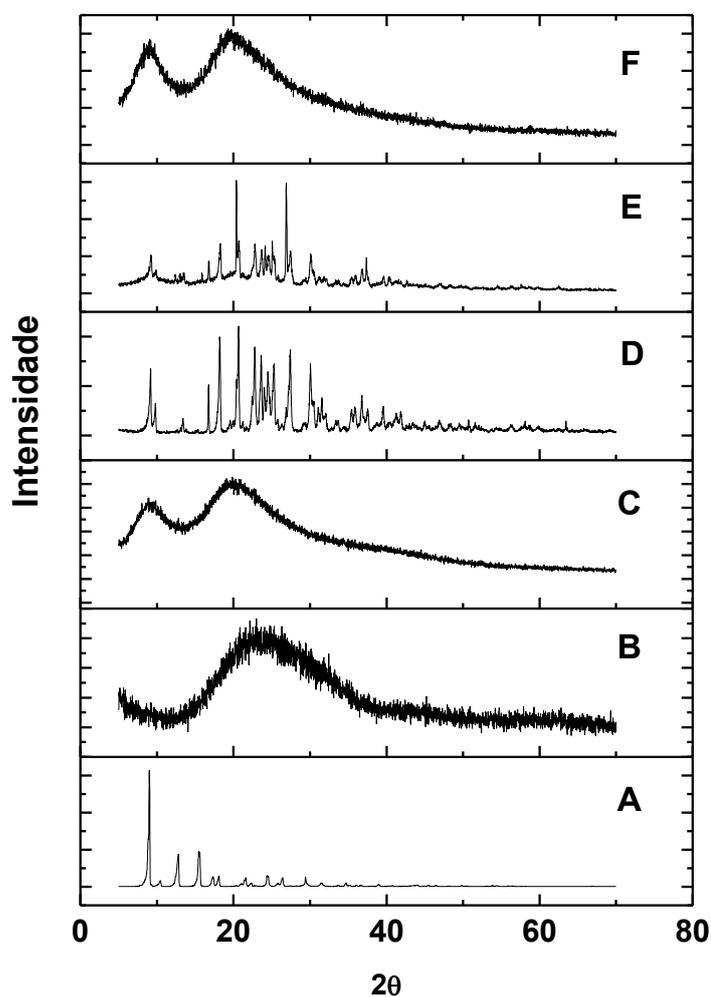
#### 4.3.3 Difractometria de Raios X

A Figura 21 mostra o difratograma de AF livre (21A), caseína (21B), zeína (21C), lisina (21D), mistura física (21E) e nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (21F).

O AF exibiu um difratograma característico (Figura 21A) de um composto cristalino, com um pico agudo a  $9,94^\circ$  (ANSELMINI et al., 2006). O padrão de DRX da Lisina (Figura 21D) também é característico de um composto cristalino, com uma

faixa de picos entre  $15^\circ$  e  $30^\circ$ . As proteínas são substâncias amorfas, sem picos definidos, como observado nos difratogramas de DRX da caseína (Figura 21B) e da zeína (Figura 21C).

**Figura 21:** Difratogramas de DRX do AF livre (A); caseína (B); zeína (C); lisina (D); mistura física (E) e nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo AF (F).



Fonte: O autor.

No difratograma da mistura física dos compostos (Figura 21E), é possível observar um padrão de cristalinidade, devido à simples mistura dos compostos, não apresentando interação física que permita a amorfização do AF. No difratograma

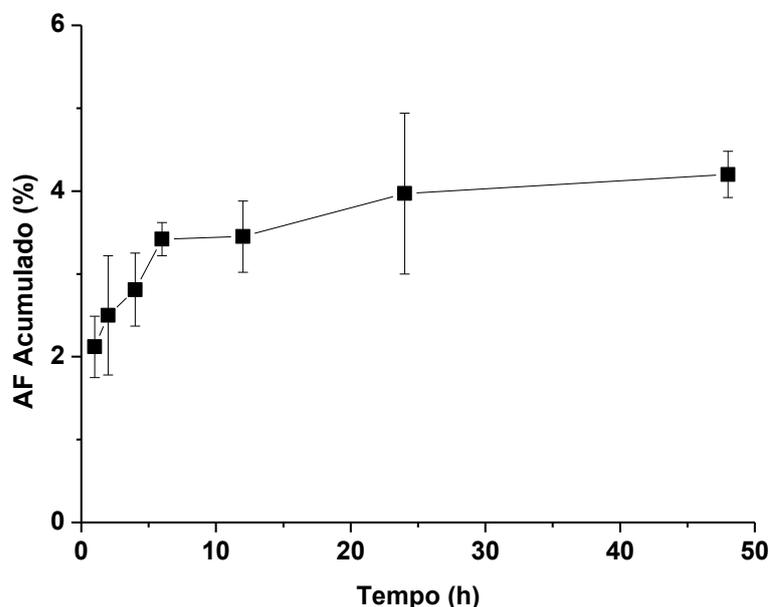
das nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Figura 21F) não há picos de difração característicos da estrutura cristalina de AF.

As características de saturação, solubilidade e estabilidade são fortemente influenciadas pelas características de cristalinidade ou amorfização das partículas sólidas (DHIRENDRA et al, 2009). Embora o estado amorfo seja termodinamicamente instável, proporciona um aumento na solubilidade dos compostos. A ausência dos cristais tridimensionais presentes na superfície do estado cristalino pode ser responsável pelo aumento significativo da interação entre a superfície dos compostos e o solvente, devido à expansão da área superficial (HANCOCK e ZOGRAFI, 1997; KANAUIA et al., 2015).

#### 4.3.4 Ensaio de Liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* realizado a pH fisiológico (Figura 22) exibiu uma liberação de AF muito lenta e prolongada a partir das nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF durante 48 h. Foi liberado cerca de 4% do conteúdo de AF em 48 h. As partículas não apresentaram uma liberação rápida nas primeiras horas (efeito *burst*), comum em nanopartículas poliméricas (KANAUIA et al., 2015; LIMA et al., 2018). O estudo de Li e colaboradores (LI et al., 2018) também demonstrou ausência de efeito *burst* na liberação do fármaco a partir de nanopartículas de zeína, e apenas uma liberação lenta e sustentada do fármaco por dias. A taxa de liberação do fármaco pode ser afetada por uma combinação de vários fatores, como tamanho, propriedades físico-químicas das nanopartículas, característica e concentração do fármaco e condições do meio de liberação (ROSA et al., 2015). Além disso, a interação da AF com a matriz zeína-caseína-lisina pode ser forte o suficiente para sustentar a liberação do composto.

**Figura 22:** Perfil de liberação do AF de nanopartículas de zeína-caseína-lisina em solução salina tamponada com fosfato (PBS; 50 mM, pH 7,4). Os valores são relatados como média  $\pm$  DP ( $n = 3 \pm$  DP).



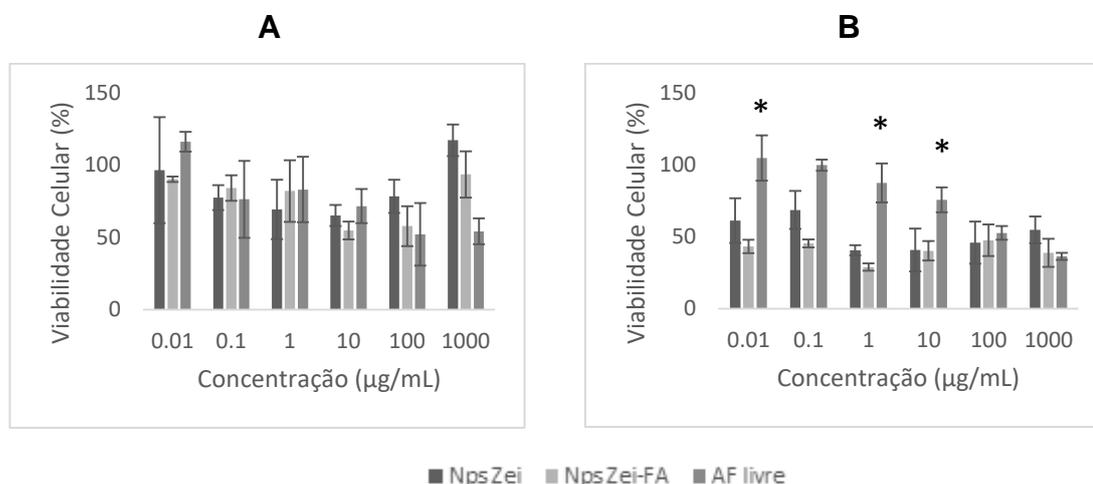
Fonte: O autor.

#### 4.3.5 Permeabilidade Intestinal *in vitro*

##### 4.3.5.1. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células Caco-2 e HT29-MTX foi avaliada após exposição a nanopartículas de zeína-caseína-lisina, nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF ou AF livre por 24h (Figura 23 A e B) com concentrações variando de 0,01 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Também avaliou-se a viabilidade destas duas linhagens celulares frente às nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF ou AF livre por 4h (Figura 24 A e B) com concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . A viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico de MTT.

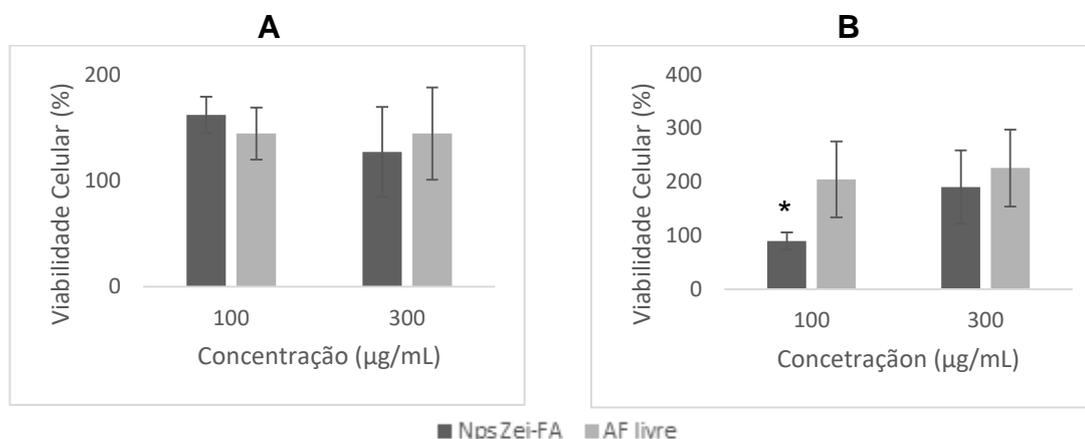
**Figura 23:** Viabilidade celular de nanopartículas de zeína-caseína-lisina (Nps Zein); nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zein-AF) e AF livre sobre linhagens celulares Caco-2 (A) e HT29-MTX (B) em concentrações de 0,01 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  após 24 h de incubação. Valores foram relatados como média  $\pm$  DP (n = 3). ANOVA de dois fatores com teste de Tukey (\* p < 0,05).



Fonte: O autor.

A Figura 23A mostra uma diminuição na viabilidade celular de acordo com o aumento na concentração de AF para todas as amostras testadas. No entanto, no caso de maior concentração, as nanopartículas de zeína carregadas com AF mostraram 94% de viabilidade celular, o que representa um aumento na viabilidade celular em comparação com 100  $\mu\text{g/mL}$ . Por outro lado, para AF livre, a viabilidade celular foi mantida em torno de 54% na concentração mais alta. Este resultado demonstra que ambas as nanopartículas carregadas e vazias apresentaram um perfil seguro *in vitro* para as concentrações testadas no caso da linhagem celular Caco-2 (Figura 23A). Em um estudo realizado com nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio, os autores demonstraram que, mesmo em 72 horas, em concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , não havia citotoxicidade na linhagem Caco-2 (LUO et al., 2013). O perfil de viabilidade do HT29-MTX (Figura 23B) foi diferente do observado na Caco-2. Mesmo nas concentrações mais baixas, tanto as nanopartículas vazias quanto as carregadas apresentaram viabilidade celular em torno de 50%, enquanto o AF livre apresentou valores de viabilidade superiores em 0,01, 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$  (p < 0,05). Na concentração mais alta, as nanopartículas de zeína carregadas com AF mostraram 39% de viabilidade celular, enquanto que para AF livre foi de 37% após 24 h de incubação (Figura 23B).

**Figura 24:** Viabilidade celular de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zei-FA) e AF livre contra linhagem celular Caco-2 (A) e HT29-MTX (B) nas concentrações de 100 e 300 µg/mL após 4 h de incubação. Valores foram relatados como média ± DP (n = 3). ANOVA de dois fatores com teste de Tukey (\* p <0,05).



Fonte: O autor.

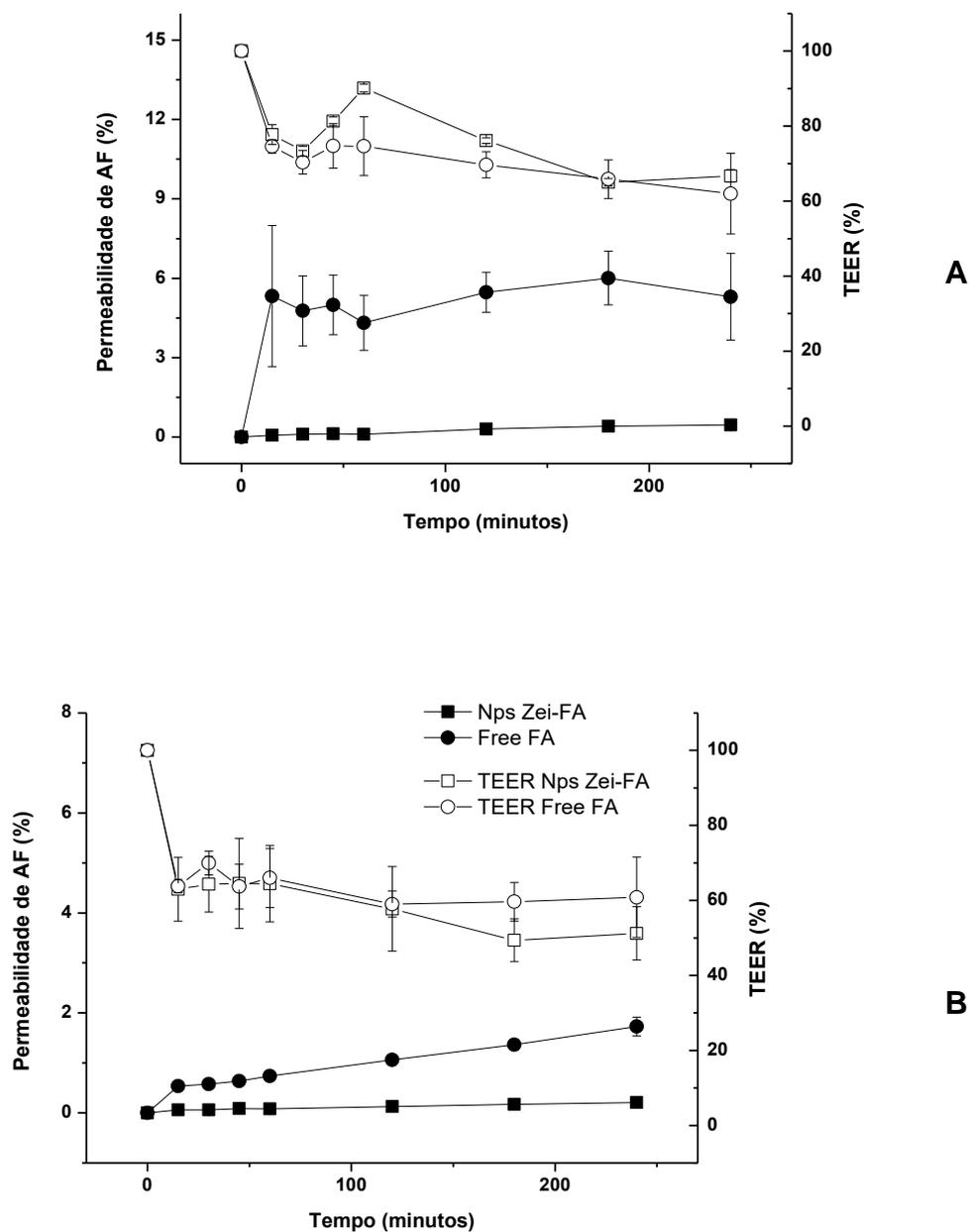
O ensaio com um tempo de incubação de 4 h (Figura 24A e 24B) foi realizado considerando o tempo de permanência dos compostos no epitélio intestinal, que é também o tempo que o ensaio de permeabilidade demora (ARAÚJO et al., 2014). Também foi realizado para avaliar a segurança e a biocompatibilidade de nanopartículas carregadas com AF na presença de células intestinais, para propor sua possível administração oral. Na Figura 24 A e B, as nanopartículas de zeína-caseína-lisina e o AF livre não apresentaram citotoxicidade sobre as linhagens celulares Caco-2 e HT29-MTX, nas duas concentrações testadas, 100 e 300 µg/mL. Considerando e seguindo os padrões ISO, a viabilidade celular acima de 70% é considerada segura (ISO, 2009). Os dados revelaram um aumento da atividade metabólica das células tratadas com AF, mais evidente na linhagem celular HT29-MTX (Figura 24 A e B). Curiosamente, resultados semelhantes em células neurais quando tratados apenas com AF também foram obtidos (MOGHADAM; MESBAH-ARDAKANI;NASR-ESFAHANI, 2018). Como não foi observado efeito citotóxico, a concentração de 300 µg/mL foi escolhida para ser utilizada no ensaio de permeabilidade.

#### 4.3.5.2 Ensaio de permeabilidade intestinal *in vitro*

A permeabilidade intestinal *in vitro* foi investigada através dos modelos de monocultura Caco-2 e de co-cultura Caco-2/HT29-MTX. O modelo de co-cultura, Caco-2/HT29-MTX foi semeado em razão fisiológica (90:10) (LECHANTEUR; DAS NEVES; SARMENTO, 2017). Devido à presença de células HT29-MTX no modelo co-cultura, foi possível avaliar a influência da camada de muco na permeabilidade das nanopartículas em comparação com o modelo de monocultura, que é o padrão dos ensaios de permeabilidade. Esses modelos *in vitro*, além de apresentarem custos mais baixos, também são menos complicados e são eticamente vantajosos para determinar a permeabilidade intestinal das drogas, comparados aos modelos *in vivo* (JAIN et al., 2016).

A Figura 25 mostra os resultados da percentagem de permeabilidade intestinal de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF e AF livre, bem como a evolução de TEER durante o ensaio. No modelo de monocultura, o AF livre apresentou uma permeação cumulativa de 5,3%, enquanto as nanopartículas carregadas com AF permearam 0,5% (Figura 25A). No modelo de co-cultura, com a presença de muco intestinal, a permeação cumulativa de AF livre diminuiu para 1,7% e a de nanopartículas carregadas com AF para 0,2% (Figura 25B). A presença de muco intestinal reduziu consideravelmente a permeação de AF livre e AF das nanopartículas de zeína-caseína-lisina. Esse efeito também foi observado em outro estudo, no qual as micelas de quitosana carregadas com paclitaxel apresentaram menor permeação após 3 h no modelo de co-cultura Caco-2/HT29-MTX (SILVA et al., 2017). Este efeito pode ser porque o AF livre interage com a camada de muco que fica presa, reduzindo sua passagem através da barreira biológica. Também, como pode ser visto na Figura 25A, a permeabilidade da AF iniciou-se 15 min após o início da experiência e a percentagem cumulativa de AF livre que atravessou a barreira foi semelhante durante 4 h do ensaio. No modelo de co-cultura (Figura 25B), a permeabilidade da AF ocorreu gradualmente, uma vez que a camada de muco pode aprisionar as moléculas, de modo que a permeação ocorreu lentamente. Isso pode indicar que o AF livre não tem uma biodisponibilidade tão elevada para ser administrada por via oral, uma vez que apenas uma pequena quantidade pode atravessar a barreira intestinal para apresentar um efeito clínico desejado.

**Figura 25:** Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* e porcentagem de TEER de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF (Nps Zei-AF) e AF livre através do modelo de monocultura Caco-2 (A) e co-cultura Caco-2/HT29-MTX (B). Todos os experimentos foram realizados a partir do compartimento apical para basolateral em HBSS a 37 °C. Os valores foram relatados como média  $\pm$  DP (n = 3).



Fonte: O autor.

Durante o teste de permeabilidade, medições de TEER também foram realizadas para monitorar a integridade das monocamadas de células. O modelo de co-cultura Caco-2/HT29-MTX apresenta menores valores de TEER em comparação

ao modelo de monocultura Caco-2, devido a junções mais frouxas entre as células, o que pode significar a presença de mais espaço intercelular para o transporte transepitelial de moléculas (ARAÚJO et al., 2013). A Figura 25B mostra valores de TEER mais baixos no modelo de co-cultura em comparação com o modelo de monocultura, no entanto, seria também esperado uma maior permeabilidade do composto, o que não foi observado.

A permeabilidade transepitelial de nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF e AF livre também foi verificada pelo balanço de massa. No modelo de monocultura Caco-2, as nanopartículas de zeína-caseína-lisina tiveram uma taxa de recuperação de 76% no lado apical, enquanto que para o AF livre foi de 53%. No modelo de co-cultura Caco-2/HT29-MTX, a recuperação para as nanopartículas de zeína-caseína-lisina foi de apenas 5% e para o AF livre foi de 53%. A baixa taxa de recuperação de nanopartículas de zeína-caseína-lisina no modelo de co-cultura Caco-2/HT29-MTX sugere que o transporte transcelular pode estar envolvido na sua captação celular (LUO et al., 2013).

Para os dois modelos de células de permeação intestinal, o AF livre exibiu uma maior permeabilidade do que as nanopartículas de zeína-caseína-lisina carregadas com AF. No entanto, é importante considerar que as nanopartículas mantêm a liberação de AF e, sob condições *in vivo*, podem mantê-lo mais tempo disponível para sofrer permeação. Além disso, o comportamento *in vivo* das nanopartículas tende a melhorar os parâmetros biofarmacêuticos e farmacocinéticos (MOHANRAJ e CHEN, 2006), e pode resultar em desempenho superior, comparado aos estudos *in vitro* (RONDINI et al., 2002).

#### 4.4 CONCLUSÃO

As nanopartículas de zeína-caseína-lisina foram obtidas pelo método de dispersão líquido-líquido e apresentaram baixo tamanho médio e IPD, valores negativos de potencial zeta e morfologia esférica. Os difratogramas de DRX mostraram a amorfização do AF após a nanoencapsulação. O FT-IR não apresentou alteração ou formação de novos grupos funcionais. O ensaio de liberação *in vitro* indica que as nanopartículas de zeína-caseína-lisina são portadores promissores para liberação sustentada de AF. O ensaio de citotoxicidade mostrou que as

nanopartículas não apresentaram citotoxicidade sobre as células Caco-2 e HT29-MTX por 4 h de incubação, porém em 24 h de incubação, um perfil mais seguro foi obtido com a linhagem celular Caco-2 do que a linhagem HT29-MTX. No ensaio de permeabilidade, o AF das nanopartículas de zeína-caseína-lisina apresentou perfil de permeabilidade de acordo com o ensaio de liberação. As nanopartículas de zeína-caseína-lisina podem associar AF à sua matriz, permitindo uma liberação sustentada de AF, que pode ser um potencial sistema de liberação oral de fármaco no tratamento de diversas doenças, onde o estresse oxidativo é apresentado.

## REFERÊNCIAS

ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; RICCI, M.; BUONOCORE, A.; GRANATA, P.; TSUNO, T.; FACINO, R.M. Analytical characterization of a ferulic acid/ $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complex, *Journal Pharmaceutical Biomedical Analytic*. v. 40, p. 875-881, 2006.

ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies, *International Journal of Pharmacy*. v. 458, p. 128–134, 2013.

ARAÚJO, F.; SHRESTHA, N.; SHAHBAZI, M.A.; FONTE, P.; MÄKILÄ, E.M.; SALONEN, J.J.; HIRVONEN, J.T.; GRANJA, P.L.; SANTOS, H.A.; SARMENTO, B. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium, *Biomaterials*. v. 35, p. 9199–9207, 2014.

ARGOS, P.; PEDERSEN, K.; MARKS, M.D.; LARKINS, B.A. A structural model for maize zein proteins, *Journal Biological Chemistry*. v. 257, p. 9984–9990, 1982.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food Chemistry Toxicology*. v. 51, p. 15–25, 2013.

CHANG, C.; WANG, T.; HU, Q.; LUO, Y. Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization, *International Journal of Biological Macromolecules* v. 104 p. 117–124, 2017.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review, *Journal American Academic Dermatology*. v. 67, p. 1013–1024, 2012.

CHEN, S.; HAN, Y.; WANG, Y.; YANG, X.; SUN, C.; MAO, L.; GAO, Y. Zein-hyaluronic acid binary complex as a delivery vehicle of quercetin: Fabrication, structural characterization, physicochemical stability and in vitro release property. *Food Chemistry*. v. 276, p. 322-332, 2019.

CORRADINI, E.; CURTI, P.S.; MENIQUETI, A.B.; MARTINS, A.F.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials, *International Journal Molecular Science*. v. 15, p. 22438–22470, 2014.

DA ROSA, C.G.; DE OLIVEIRA BRISOLA MACIEL, M.V.; DE CARVALHO, S.M.; DE MELO, A.P.Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T.; MARTELLI, S.M.; VILLETTI, M.A.; BERTOLDI, F.C.; BARRETO, P.L.M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes, *Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 481, p. 337–344, 2015.

DE PAIVA, L.B.; GOLDBECK, R.; DOS SANTOS, W.D.; SQUINA, F.M. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field, *Brazilian Journal of Pharmacology. Sci*. v. 49, p. 395–411, 2013.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions : a Review, *Pak. Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 22, p. 234–246, 2009.

ELZOGHBY, A.O.; ABO EL-FOTOH, W.S.; ELGINDY, N.A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems, *Journal Controlled Release*. v. 153, p. 206–216, 2011.

FUCHS, S.; COESTER, C. Protein-based nanoparticles as a drug delivery system : chances , risks , perspectives, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. v. 20, p. 331–342, 2010.

HANCOCK, B.C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 86, p. 1–12, 1997.

International Organization for Standardization, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, *Iso 10993–5*. p. 1–52, 2009.

JAIN, A.S.; DHAWAN, V.V.; SARMENTO, B.; NAGARSENKER, M.S. In Vitro and Ex Vivo Evaluations of Lipid Anti-Cancer Nanoformulations: Insights and Assessment of Bioavailability Enhancement, *AAPS PharmSciTech*. v. 17, p. 553–571, 2016.

KANAUJIA, P.; POOVIZHI, P.; NG, W.K.; TAN, R.B.H. Amorphous formulations for dissolution and bioavailability enhancement of poorly soluble APIs, *Powder Technology*. v. 285, p. 2–15, 2015.

KIM, H.J.; RYU, K.; KANG, J.H.; CHOI, A.J.; KIM, T. IL; OH, J.M. Anticancer activity of ferulic acid-inorganic nanohybrids synthesized via two different hybridization routes, reconstruction and exfoliation-reassembly, *Science World Journal*. 2013.

LAWTON, J.W. Zein: A history of processing and use, *Cereal Chemistry*. v. 79, p. 1–18, 2002.

LECHANTEUR, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 124, p. 50–63, 2017.

LI, M.F.; CHEN, L.; XU, M.Z.; ZHANG, J.L.; WANG, Q.; ZENG, Q.Z.; WEI, X.C.; YUAN, Y. The formation of zein-chitosan complex coacervated particles: Relationship to encapsulation and controlled release properties, *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 116, p. 1232–1239, 2018.

LIMA, I.A.; KHALIL, N.M.; OMINAGA, T.T.; LECHANTEUR, TA.; SARMENTO, B.; MAINARDES, R.M. Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. v. 1401, p. 1–10, 2018.

LUO, Y.C.; TENG, Z.; WANG, T.T.Y.; WANG, Q. Cellular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate, *J. Agriculture Food Chemistry*. v. 61, p. 7621–7629, 2013.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects, *Food Chemistry Toxicological*. v. 65, p. 185–195, 2014.

MOGHADAM, F.H.; MESBAH-ARDAKANI, M.; NASR-ESFAHANI, M.H. Ferulic Acid exerts concentration-dependent anti-apoptotic and neuronal differentiation-inducing effects in PC12 and mouse neural stem cells, *European Journal of Pharmacology*. v. 841, p. 104–112, 2018.

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

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

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships, *Current Medical Chemistry*. v. 20, p. 4436–4450, 2013.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; BERSET, C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats, *Journal of Agriculture Food Chemistry*. v. 50, p. 3037–3041, 2002.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery, *Pharmaceutical Research*. v. 24, p. 2198–2206, 2007.

SILVA, D. S.; ALMEIDA, A.; PREZOTTI, F.; CURYC, B.; CAMPANA-FILHO, S. P.; SARMENTO B. Synthesis and characterization of 3,6-O,O'- dimyristoyl chitosan

micelles for oral delivery of paclitaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 152, p. 220–228, 2017.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; BRYCE, D. L. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 2015.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules, *International Journal of Pharmaceutics*. v. 522, p. 172–197, 2017.

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E.M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview, *Biomedical Research International*. 2013.

URBANIAK, A.; SZELAG, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid, *Computational Theoretical Chemistry*. v. 1012, p. 33–40, 2013.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles, *Advanced Drug Delivery. Reviews*. v. 63, p. 456–469, 2011.

YANG, M.-L.; SONG, Y.-M. Synthesis and investigation of water-soluble anticoagulant warfarin/ferulic acid grafted rare earth oxide nanoparticle materials, *RSC Advanced*. v. 5, p. 17824–17833, 2015.

ZHANG, H.; FU, Y.; XU, Y.; NIU, F.; LI, Z.; BA, C.; JIN, B.; CHEN, G.; LI, X. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. *Food & Function*. v. 10, p. 635-645, 2019.

ZHOU, Y., HUA, S., YU, J., DONG, P., LIU, F., HUA, D. A strategy for effective radioprotection by chitosan-based long-circulating nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, p. 2931–2934, 2015.

## 5 CAPÍTULO V: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidos dois sistemas nanocarreadores para o AF. Estes dois sistemas, obtidos a partir de proteínas, tiveram seus DM, IPD e potencial Zeta determinados. Além disso, ambas partículas tiveram sua morfologia avaliada por meio de MEV-FEG e também foram avaliadas físico-quimicamente por meio de FT-IR e DRX. Os dois sistemas ainda tiveram suas EE avaliadas por meio do método indireto. Para as nanopartículas de caseína obteve-se uma EE de 26%, enquanto para as nanopartículas de zeína obteve-se uma eficiência de 23%. Com estes resultados, foram alcançados todos objetivos propostos inicialmente neste trabalho.

As nanopartículas de caseína foram submetidas a ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade frente a linhagens celulares tumorais intestinais Caco-2 e HT29-MTX, para posterior ensaio de permeabilidade intestinal. Mesmo demonstrando uma citotoxicidade superior às nanopartículas de zeína-caseína-lisina, estas foram submetidas ao ensaio de permeabilidade, que não resultou na permeação do AF através dos modelos monocultura Caco-2 e co-cultura Caco-2/HT29-MTX. Apesar de não apresentar resultados satisfatórios nos ensaios biológicos, o desenvolvimento das diferentes formulações de nanopartículas de caseína foi de grande importância para este trabalho, uma vez que proporcionou o estudo de diferentes estabilizantes, buscando contornar a sensibilidade da caseína em valores de pH ácidos e possibilitou chegar a uma formulação final estável e reprodutível. Além disso, a partir do sistema caseína-lisina foi possível chegar ao sistema multicomposto zeína-caseína-lisina.

O sistema multicomposto zeína-caseína-lisina apresenta-se como inovador para nanoencapsular fármacos ou compostos bioativos. O desenvolvimento deste sistema foi possível devido aos estudos prévios do sistema caseína-lisina. As nanopartículas zeína-caseína-lisina carregadas com AF demonstraram uma liberação sustentada em pH fisiológico, o que corrobora com sua liberação nos modelos de permeabilidade intestinal monocultura Caco-2 e co-cultura Caco-2/HT29-MTX. Estes resultados demonstram o sistema zeína-caseína-lisina como um sistema promissor para administração oral de compostos bioativos, como o AF, com uma liberação prolongada, possibilitando assim o combate de vários males causados em função do estresse oxidativo.

## APÊNDICE

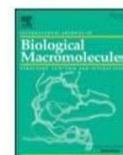
ARTIGO PUBLICADO NA *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*

International Journal of Biological Macromolecules 138 (2019) 244–251



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

## Zein-casein-lysine multicomposite nanoparticles are effective in modulate the intestinal permeability of ferulic acid

Graciela Heep<sup>a,b</sup>, Andreia Almeida<sup>c,d,e</sup>, Rossana Marcano<sup>a</sup>, Daniele Vieira<sup>a</sup>, Rubiana Mara Mainardes<sup>a</sup>, Najeh Maissar Khalil<sup>a</sup>, Bruno Sarmento<sup>d,e,f,\*</sup><sup>a</sup> Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brazil<sup>b</sup> Chemistry Department, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, PR, Brazil<sup>c</sup> ICBAS - Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal<sup>d</sup> INEB - National Institute of Biomedical Engineering, University of Porto, Porto, Portugal<sup>e</sup> i3S - Institute for Research and Innovation in Health, University of Porto, Porto, Portugal<sup>f</sup> CESPU - Institute for Research and Advanced Training in Health Sciences and Technologies, Gandra, Portugal

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 May 2019

Received in revised form 3 July 2019

Accepted 3 July 2019

Available online 04 July 2019

## Keywords:

Ferulic acid

Intestinal permeation

Zein nanoparticles

## ABSTRACT

The objective of this study was to develop zein-casein-lysine nanoparticles to modulate the intestinal permeability of ferulic acid (FA), a bioactive compound with proven antioxidant properties. The nanoparticles were obtained by a liquid-liquid dispersion method and were characterized in terms of mean size, polydispersity index, zeta potential, association efficiency (AE), *in vitro* drug release, x-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The *in vitro* intestinal permeability of nanoparticles was evaluated through Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX monoculture and co-culture models, respectively. Nanoparticles presented a mean size of 199 nm and zeta potential of  $-26$  mV. The AE of FA was 23% evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC). XRD showed amorphization of FA after association and FT-IR showed no changes in chemical structures of the compounds after nanoencapsulation. The cytotoxicity assays demonstrated that multicomposite nanoparticles presented a safe profile against Caco-2 and HT29-MTX cells. In the *in vitro* permeability assay, free FA exhibited higher permeability compared to FA-loaded nanoparticles, possibly due to prolonged FA release from nanoparticles. These new developed zein-casein-lysine nanoparticles may be used for FA sustained delivery by the oral route.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Oxidative stress occurs when free radicals, primarily reactive oxygen species (ROS), are excessively produced in cells, and due to their reactivity can damage biological molecules such as lipids, proteins and DNA. It is well known these effects play an important role in the development of several pathologies, such as cancer, neurological and cardiovascular diseases [1]. The balance between oxidants and antioxidants is crucial for cell function. The human organism presents integrated enzymatic and non-enzymatic endogenous defenses, responsible for counterbalance the oxidative stress generated by ROS. Although the efficiency of the endogenous antioxidant system is recognized, in some conditions, this system can be overwhelmed, and the supplementation with exogenous antioxidants is essential [2,3].

Many bioactive natural compounds have been highlighted due to their antioxidant activities, especially the phenolic acids [4]. Ferulic

acid (FA) is a phenolic compound member of the hydroxycinnamic acids. It is found in leaves and seeds, especially corn bran and rice, in all parts of wheat and oats, and can also be found in coffee, apple, artichoke, peanut, orange and pineapple [5,6]. FA is a potent free-radical scavenger and its antioxidant potential is due to its ability to neutralize free radicals reducing the breakdown of proteins and lipids [7]. Although *in vitro* studies show its potential antioxidant activity, *in vivo* studies did not reflect them, due to biopharmaceutical and pharmacokinetic drawbacks [8]. FA presents low aqueous solubility [9], reduced ability to penetrate biological membranes [10], and low cell absorption [11].

Biodegradable nanoparticles have been widely applied to circumvent biopharmaceutical and pharmacokinetic drawbacks of drugs, allowing their application for several routes, including the oral administration. Protein-based nanoparticles have been gaining pronounced interest in recent years due to their low toxicity, biodegradability, and ability to attachment of hydrophobic and hydrophilic drugs and ligands at their surface [12,13].

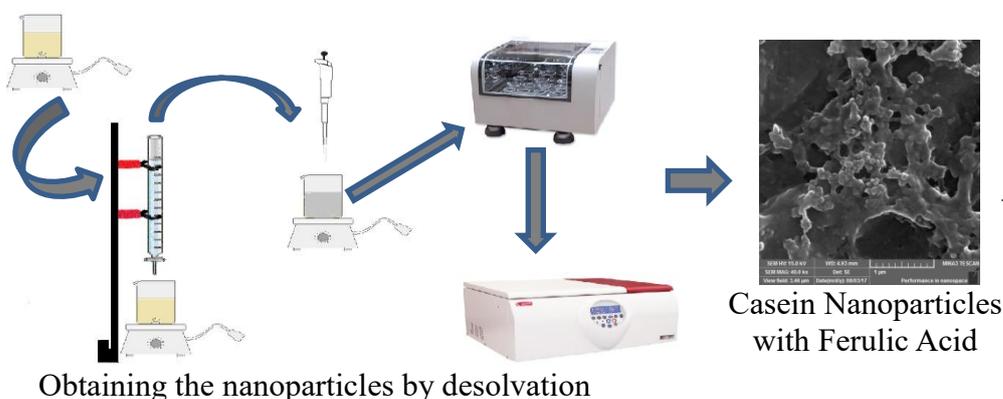
Zein is a protein of the prolamin class found in corn [14]. It consists of 17 amino acids, most of which are apolar [15]. Its secondary structure

\* Corresponding author at: i3S - Institute for Research and Innovation in Health, University of Porto, Porto, Portugal.

E-mail address: [bruno.sarmiento@ineb.up.pt](mailto:bruno.sarmiento@ineb.up.pt) (B. Sarmento).

ARTIGO SUBMETIDO NA QUÍMICA NOVA

### Graphical Abstract



#### Determination of physicochemical properties of nanoparticles

Mean size and polydispersity index

Zeta Potential

FE-SEM

FT-IR

X-ray

The casein nanoparticles loaded with ferulic acid were obtained by the desolvation method. After obtaining, these were characterized physicochemically and had their efficiency of encapsulation determined.

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CASEÍNA CONTENDO ÁCIDO FERÚLICO

Graciela L. Heep<sup>a,b,\*</sup> e Júlio C. Macena<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 85884-000 Medianeira – PR, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, 85040-167 Guarapuava – PR, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, 85040-167 Guarapuava – PR, Brasil

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

( ) Manuscrito com material suplementar

( X ) Manuscrito sem material suplementar

-----  
\*e-mail: graciela@utfpr.edu.br

## **DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CASEIN NANOPARTICLES CONTAINING FERULIC ACID**

The objective of this study was to develop a nanocarrier system for ferulic acid, a bioactive compound with proven antioxidant capacity. The nanoparticles were developed from a natural polymer, casein, leading to low amounts of solvents in the process of obtaining. The physico-chemical characterization verified average sizes of 170 nm for casein nanoparticles. In addition, they presented a Zeta potential of -23, which demonstrates stability for the system. The micrographs performed confirmed the sizes and the particles are spherical. The X-ray diffractograms showed the change in the crystalline state of the ferulic acid after nanoencapsulation, indicating the amorphization of the system. The spectra in the infra red did not demonstrate the alteration and/or formation of new functional groups. The encapsulation efficiency (EE) was determined by HPLC, resulting in 26% for casein nanoparticles.

Keywords: nanoparticle; casein; ferúlico acid; desolvation.