

JESSICA BITENCOURT EMILIO MENDES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO RESVERATROL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientadora: Profª. Drª. Rubiana Mara Mainardes

PONTA GROSSA

2011

JESSICA BITENCOURT EMILIO MENDES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO RESVERATROL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Sônia Faria Zawadzki
Universidade Federal do Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João Amilton Mendes e Marjorie Bitencourt Emilio Mendes, por terem sido meus professores mais importantes, grandes incentivadores e por toda a compreensão e a preocupação neste momento da vida. Esta conquista é a melhor forma de expressar a minha gratidão.

À minha irmã Yasmine Mendes Pupo, pela disposição em sempre colaborar e trocar experiências sobre pesquisa, dividindo comigo todos os momentos dessa empreitada e me ensinando que é preciso muita dedicação para poder ir mais longe.

Ao meu irmão Erick Emilio Mendes, à Sirlei Proença e ao Fabrício Pupo, pela amizade, carinho e por serem sempre tão especiais.

Ao meu noivo Thiago Nadal pelo apoio e amor incondicional, pela compreensão em todos os momentos e simplesmente por estar sempre ao meu lado e poder contar com as suas orações.

A Deus, em quem deposito toda a minha confiança, por permitir que eu tivesse saúde e por iluminar os meus passos, colocando as pessoas certas no meu caminho.

Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e se orgulharem de mim!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por ser um grande mestre, amigo e um exemplo pessoal e profissional a seguir. Obrigada pela oportunidade que me foi dada em realizar este trabalho; por toda a sabedoria transmitida, confiança, paciência, dedicação incansável, e por ter tornado meu sonho realidade. Seu constante entusiasmo e grande competência como professor e pesquisador me servem de exemplo e estímulo, desde a minha graduação, para perseverar na caminhada acadêmica.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento da validação do método analítico para a quantificação das micropartículas.

Agradeço, em especial, à Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula, pela sua sincera amizade, sempre com palavras de incentivo. Agradeço pela valiosa contribuição dada diariamente e quando participou como banca de qualificação e de defesa desta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Aparecida Campesatto Mella pelas considerações durante a qualificação. À Prof^a. Dr^a. Sônia Faria Zawadzki pela leitura crítica do manuscrito e pelas inúmeras contribuições durante a defesa de dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas.

À Prof^a. Dr^a. Hellen Karine Stulzer e a mestrandona Manoela Klüppel Riekes da Universidade Federal de Santa Catarina, pela colaboração nas análises térmicas.

Ao Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil e a mestrandona Viviane Matoso de Oliveira da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela contribuição nos ensaios do potencial antioxidante e no estudo da citotoxicidade.

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho, em especial, à Elizabete Munhoz, à Júlia Folmer, à Luzia Chaves Simão, ao Nilson Biagini Sabino, ao Valdir Antônio Gorchiski e à Marly Santos.

Ao Dr. Milton Domingos Michél, pela realização das análises em microscopia eletrônica de varredura e ao Douglas Wellington Migliorini, pelo auxílio nos ensaios por espectrometria de difração a laser e difratometria de raio-X.

Especialmente, a todos os meus familiares e amigos que sempre torceram por mim. Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	10
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	19
3.1.1 Poli(hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)	22
3.1.2 Poli(ϵ-caprolactona).....	23
3.2 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO RESVERATROL.....	24
3.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO O RESVERATROL.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 EQUIPAMENTOS.....	31
4.2 REAGENTES E SOLVENTES.....	32
4.2.1 Fármaco.....	32
4.2.2 Polímeros.....	32
4.2.3 Água purificada.....	32
4.2.4 Outros reagentes e solventes.....	32
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
4.4.1 Obtenção das micropartículas poliméricas.....	35
4.4.1.1 Misturas físicas.....	37
4.4.2 Rendimento.....	37
4.4.3 Determinação do teor de umidade.....	37
4.4.4 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas.....	37
4.4.4.1 Validação do método analítico para a quantificação do resveratrol presente nas micropartículas.....	38
4.4.4.2 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas dos Sistemas M1 e M2.....	40
4.4.4.3 Eficiência de encapsulação.....	40
4.4.5 Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados.....	40
4.4.5.1 Análises morfológicas e de superfície.....	40
4.4.5.2 Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica	41
4.4.5.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho.....	41

4.4.5.4 Análise térmica.....	42
4.4.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i>.....	42
4.4.6.1 Avaliação dos perfis de liberação.....	43
4.4.7 Estudo do potencial antioxidante.....	45
4.4.7.1 Inibição do ácido hipocloroso (HOCl).....	45
4.4.7.2 Ensaio de descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).....	45
4.4.8 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre hemácias.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1.1 Rendimento.....	48
5.1.2 Determinação do teor de umidade.....	49
5.1.3 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação.....	50
5.1.3.1 Validação do método analítico para a quantificação do resveratrol presente nas micropartículas dos sistemas M1 e M2.....	50
5.1.3.2 Recuperação do resveratrol presente nas micropartículas.....	51
5.1.4 Análises morfológicas e de superfície.....	53
5.1.5 Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica.....	59
5.1.6 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho.....	61
5.1.7 Análise térmica.....	63
5.1.8 Estudo de liberação <i>in vitro</i>.....	65
5.1.9 Estudo do potencial antioxidante.....	69
5.1.10 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre hemácias.....	72
6 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa.....	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelos de estrutura das micropartículas.....	20
Figura 2 – Estruturas químicas do PHB e do PHBV.....	23
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da PCL...	24
Figura 4 – Estrutura química do resveratrol.....	25
Figura 5 – Fluxograma das etapas da pesquisa.....	34
Figura 6 – Esquema de formação das micropartículas poliméricas contendo resveratrol pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente.....	36
Figura 7 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do resveratrol obtida por CLAE.....	50
Figura 8 – Aspectos morfológicos do resveratrol puro, do PHBV e da PCL por MEV.....	53
Figura 9 – Fotomicrografias das micropartículas do sistema M1 obtidas por MEV, M1R0, M1R5, M1R10 e M1R20.....	54
Figura 10 – Fotomicrografias das micropartículas do sistema M2 obtidas por MEV, M2R0, M2R5, M2R10 e M2R20.....	56
Figura 11 – Difratogramas do resveratrol puro, do PHBV, da mistura física PHBV:resveratrol e das micropartículas do sistema M1.....	57
Figura 12 – Difratogramas do resveratrol puro, da PCL, da mistura física PCL:resveratrol e das micropartículas do sistema M2.....	58
Figura 13 – Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas do sistema M1, M1R0, M1R5, M1R10, M1R20.....	60
Figura 14 – Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas do sistema M2, M2R0, M2R5, M2R10, M2R20.....	60

Figura 15 – Espectros IVTF do resveratrol, do PHBV, da mistura física e das micropartículas M1R0, M1R5, M1R10 e M1R20.....	62
Figura 16 – Espectros IVTF do resveratrol, da PCL, da mistura física e das micropartículas M2R0, M2R5, M2R10 e M2R20.....	62
Figura 17 – Curvas de ATG e DTG do resveratrol.....	63
Figura 18 – Curvas de ATG do resveratrol, do PHBV, da PCL, da mistura física PHBV:resveratrol, da mistura física PCL:resveratrol, das micropartículas do sistema M1 e das micropartículas do sistema M2.....	64
Figura 19 – Termogramas obtidos por CED do resveratrol, do PHBV, da PCL, da mistura física PHBV:resveratrol, da mistura física PCL:resveratrol, das micropartículas do sistema M1 e das micropartículas do sistema M2.....	65
Figura 20 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco puro e das micropartículas do sistema M1.....	66
Figura 21 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do fármaco puro e das micropartículas do sistema M2.....	67
Figura 22 – Efeito antioxidante do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL pela inibição do HOCl.....	70
Figura 23 – Efeito antioxidante do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL pela descoloração do radical catiônico ABTS ^{•+}	71
Figura 24 – Valores de absorvância resultante da hemoglobina liberada no ensaio de hemólise para o branco, para o resveratrol puro e para as micropartículas de PHBV e de PCL.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo resveratrol.....	35
Tabela 2 – Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do resveratrol por CLAE.....	38
Tabela 3 – Rendimento obtido para as formulações dos sistemas M1 e M2, a partir do método de emulsão simples/evaporação do solvente.....	48
Tabela 4 – Teor de água obtido para o resveratrol, para o PHBV, para a PCL e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2.....	49
Tabela 5 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.....	51
Tabela 6 – Teor de resveratrol incorporado nas micropartículas de PHBV e de PCL e eficiência de encapsulação.....	52
Tabela 7 – Diâmetro médio e <i>span</i> (dispersão granulométrica) para as micropartículas, indicando o teor de resveratrol incorporado em cada material	59
Tabela 8 – Resultados da modelagem matemática pela equação biexponencial para o resveratrol puro e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
<i>a</i> e <i>b</i>	constantes que incorporam as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica
<i>A</i> e <i>B</i>	concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução na equação biexponencial
<i>α</i> e <i>β</i>	constante cinética de dissolução para a equação biexponencial
Akt	proteína quinase B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O/A	emulsão múltipla água em óleo em água
<i>A_t</i>	área total
ATG	análise termogravimétrica
B	coeficiente angular
Bcl-2	fosforilação da proteína de linfomas da célula B
β-CD	β-ciclodextrina
HPβCD	hidroxipropil-β-ciclodextrina
CAT	catalase
CED	calorimetria exploratória diferencial
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CoQH ₂	citocromo C redutase
COX-2	ciclo-oxigenase 2
CV%	coeficiente de variação percentual
DCM	diclorometano
DP	desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPR	desvio padrão relativo
<i>d_(v,10)</i>	diâmetro das partículas correspondente a 10% da distribuição acumulada
<i>d_(v,50)</i>	diâmetro das partículas correspondente a 50% da distribuição acumulada

$d_{(v,90)}$	diâmetro das partículas correspondente a 90% da distribuição acumulada
ED	eficiência de dissolução
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAE	fase aquosa externa
FO	fase orgânica
ft	fração do fármaco dissolvido no tempo t
GSH	glutationa
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HOCl	ácido hipocloroso
IC_{50}	concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
IVTF	infravermelho com transformada de Fourier
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k	constante cinética de dissolução para as equações monoexponencial e de ordem zero
LD	limite de detecção
LDL	lipoproteína de baixa densidade humana
LQ	limite de quantificação
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	mistura física
m.p.	faixa de fusão
MSC	critério de seleção do modelo
n	número de repetições
n	expoente de liberação
NF- κ B	fator de transcrição nuclear κ appa B
O/A	emulsão óleo em água
O/O	emulsão óleo em óleo
$O_2\cdot^-$	ânion superóxido
$OH\cdot$	radical hidroxila
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PHAs	poli(hidroxialcanoatos)

PGA	poli(ácido glicólico)
pH	potencial hidrogeniônico
PHB	poli(3-hidroxibutirato)
PHBV	poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PKB	proteína quinase B
PLA	poli(ácido lático)
PLGA	poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PVAL	poli(álcool vinílico)
PVP	poli(vinilpirrolidona)
<i>r</i>	coeficiente de correlação
Se-GPx	selênio-glutationa peroxidase
sistema M1	micropartículas contendo resveratrol, formuladas pelo método de emulsão/ evaporação do solvente orgânico, a partir do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
sistema M2	micropartículas contendo resveratrol, formuladas pelo método de emulsão/ evaporação do solvente orgânico, a partir da poli(ϵ -caprolactona)
SOD ₂	superóxido dismutase
<i>span</i>	dispersão granulométrica
<i>t</i>	tempo
<i>Td</i>	tempo no qual 63,2 % do fármaco está dissolvido
T _g	temperatura de transição vítreia
T _m	temperatura de fusão
TGI	trato gastrointestinal
Tween®80	polissorbato 80, monooleato de sorbitano etoxilado
UV	radiação ultravioleta
UV-Vis	espectrofotometria na região do ultravioleta-visível
<i>y</i>	porcentagem de fármaco dissolvido no tempo <i>t</i>
%D	porcentagem de dissolução
Δm	variação de massa

RESUMO

O resveratrol é um potente agente antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e quimiopreventivo. No entanto, é sensível a algumas condições externas e ambientais, tais como: ar, luz e enzimas oxidativas, que podem reduzir a sua viabilidade e a sua biodisponibilidade para o uso clínico. Com o propósito de se elaborar sistemas de liberação modificada, o objetivo deste estudo foi a obtenção de micropartículas baseadas em poliésteres, contendo resveratrol, e a avaliação das características físico-químicas, do potencial antioxidante e do efeito sobre a hemólise de eritrócitos humanos desses materiais. As micropartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo resveratrol foram preparadas com sucesso pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente. Todas as formulações mostraram valores de eficiência de encapsulação adequados, superiores a 80%. As micropartículas de PHBV revelaram formato esférico com superfície rugosa e presença de poros. As micropartículas de PCL apresentaram formato esférico com superfície lisa. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier não demonstraram nenhuma ligação química entre o resveratrol e polímeros após a microencapsulação. As análises de difração de raio-X e de calorimetria exploratória diferencial indicaram que a microencapsulação conduziu a uma amorfização do fármaco. As micropartículas de PHBV e de PCL foram efetivas no controle da liberação do resveratrol. Os perfis de dissolução apresentaram o melhor ajuste para a equação biexponencial. Os ensaios de inibição do ácido hipocloroso e de descolarização do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) confirmaram a manutenção da atividade antioxidante do resveratrol presente nas micropartículas de PHBV e de PCL, mas dependente da morfologia das micropartículas e do perfil de dissolução. As micropartículas de PHBV e de PCL contendo resveratrol não apresentaram efeitos citotóxicos sobre os eritrócitos humanos. Esses resultados sugerem que as micropartículas poliméricas elaboradas a partir do PHBV e da PCL, contendo o fármaco, têm viabilidade como sistemas de liberação controlada por via oral do resveratrol, sendo uma alternativa interessante na prevenção de doenças crônicas.

ABSTRACT

Resveratrol is a potent antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and chemoprotective agent. However, it is sensitive to some external agents such as air, light and oxidative enzymes that can reduce its viability and bioavailability for clinical use. In order to provide a controlled release, the aim of this study was to obtain resveratrol-loaded polyester microparticles and to evaluate their physicochemical properties, antioxidant potential and effect on hemolysis of human erythrocytes. Microparticles of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) containing resveratrol were successfully prepared by simple emulsion/solvent evaporation. All formulations showed suitable encapsulation efficiency values higher than 80%. PHBV microparticles revealed spherical shape with rough surface and presence of pores. PCL microparticles were spherically shaped with smooth surface. Fourier-transformed infrared spectra demonstrated no chemical bond between resveratrol and polymers. X-ray powder diffraction patterns and differential scanning calorimetry analyses indicated that microencapsulation led to a drug amorphization. These PHBV/PCL microparticles delayed the dissolution profile of resveratrol. Release profiles were better fitted to biexponential equation. The hypochlorous acid scavenging activity and 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay confirmed that the antioxidant activity of resveratrol-loaded into PHBV/PCL microparticles was kept, but was dependent on the microparticle morphology and dissolution profile. Resveratrol-loaded PHBV/PCL microparticles showed no cytotoxic effect on red blood cells. These results support an experimental basis for the use of resveratrol-loaded PHBV/PCL microparticles as a feasible oral drug delivery carrier for controlled release of resveratrol, being an attractive alternative in chronic diseases prevention.

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes e apresenta um potencial de exercer efeitos deletérios (KARACAY et al., 2010). É considerado a principal causa para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e envelhecimento (PANDEY, RIZVY, 2010). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) são algumas das espécies reativas de oxigênio (EROs) (PREMKUMAR, BOWLUS, 2003). Os efeitos causados pelas EROs podem ser: danos nas membranas celulares ou em outras estruturas lipídicas, preferencialmente quando a peroxidação lipídica atua em ácidos graxos insaturados; modificação nas proteínas, alterando a estrutura terciária e provocando perda de função, fragmentação e ligações cruzadas; e alterações no DNA, que podem ser reorganizadas pelos mecanismos de reparo ou podem induzir a mutações (KARACAY et al., 2010).

Atualmente, existe um grande interesse pelo estudo de antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo. O excesso de radicais livres pode ser combatido por antioxidantes produzidos endogenamente ou absorvidos por meio da dieta (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

De acordo com Halliwell (1994), um antioxidante “é *qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”.

Os antioxidantes produzidos pelo corpo humano agem enzimaticamente, a exemplo de selênio-glutationa peroxidase (Se-GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD₂) ou, não enzimaticamente, como glutationa (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipoico e citocromo C redutase (CoQH₂) (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). Além desses antioxidantes, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e ainda, outras substâncias de natureza fenólica (SCHENEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Os compostos polifenólicos, abundantes nas fontes nutricionais, podem desempenhar um papel importante no sistema antioxidante. Dentre eles, o resveratrol ou *trans*-3,5,4'-tridroxi-*trans*-estilbeno é uma fitoalexina fenólica produzida por uma variedade de espécies vegetais em resposta ao estresse exógeno, ocasionado por lesões, infecções fúngicas e radiação ultravioleta. Esse ativo pode, particularmente, afetar o processo de carcinogênese em seus três estágios: iniciação, promoção e progressão. Além disso, tem demonstrado ser um supressor da angiogênese e da metástase de tumores. Exibe ampla atividade farmacológica, sendo usado por sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, cardioprotetora, neuroprotetora, quimiopreventiva e ação anti-envelhecimento (DAS, NG, 2009; LUCAS-ABELLÁN et al., 2007; BAUR et al., 2006; JANG et al., 1997).

Os possíveis mecanismos para esses diversos efeitos biológicos envolvem a modulação do metabolismo lipídico, da agregação plaquetária e da resposta inflamatória (SHI et al., 2007; NORATA et al., 2007; SHENOUDA et al., 2004; JAROLIM et al., 2004; PACIFICI et al., 2004).

As propriedades do resveratrol são atribuídas à sua capacidade de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana, enquanto que a supressão da atividade da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) também contribui para os seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante (KING et al., 2006).

Apesar dos numerosos estudos sobre as propriedades *in vitro* das substâncias polifenólicas, essas ações, frequentemente, não são observadas *in vivo*. A aparente discrepância entre trabalhos *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuída à baixa absorção e elevado metabolismo desses compostos (NEMEN, LEMOS-SENNNA, 2011).

No caso do resveratrol, sua utilização é limitada por ser um composto facilmente oxidável e extremamente fotossensível, sofrendo uma transformação induzida pela luz do isômero *trans* (Z) para o isômero *cis* (E) (PINEIRO, PALMA, BARROSO, 2006; TRELA et al., 1996). Essa instabilidade frente à luz, ao ar e às enzimas oxidativas reduz a sua viabilidade e a sua biodisponibilidade para o uso clínico (KIM et al., 2009).

Dessa forma, considerando a necessidade de otimizar o potencial terapêutico do resveratrol, torna-se interessante o uso de mecanismos capazes

de estabilizar esse fitoativo, preservando suas atividades biológicas e aumentando a sua biodisponibilidade.

Nesse sentido, o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos, como lipossomas, nanopartículas e micropartículas, pode ser uma estratégia viável e promissora.

Frente ao exposto, o propósito deste trabalho foi promover o desenvolvimento e a avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Promover a obtenção, a caracterização, a avaliação da liberação *in vitro*, a determinação do potencial antioxidante e o estudo da citotoxicidade sobre hemácias de sistemas poliméricos microparticulados contendo resveratrol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a obtenção de micropartículas poliméricas contendo resveratrol, a partir dos poliésteres biodegradáveis, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL);
- Proceder a determinação quantitativa do resveratrol incorporado nas micropartículas poliméricas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Efetuar a caracterização dos sistemas poliméricos por meio de análises morfológicas, espectroscópicas e térmicas;
- Estudar o mecanismo de liberação *in vitro* do resveratrol, em condição mimética ao trato intestinal;
- Quantificar a atividade antioxidante total do resveratrol presente nas micropartículas por meio do ensaio de inibição do ácido hipocloroso (HOCl) e do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS \cdot^+);
- Analisar a citotoxicidade dos sistemas poliméricos em estudo, utilizando o teste de hemólise *in vitro* de eritrócitos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

As tecnologias de liberação modificada de fármacos representam uma das áreas mais promissoras da ciência, com o objetivo de contribuir à saúde humana e animal, oferecendo diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Dessa forma, a investigação de sistemas de liberação, que incluem a modulação do processo de dissolução, a redução da toxicidade e o aumento da adesão e da conveniência do paciente, torna-se de extrema importância (RESTANI et al., 2010). Além disso, essas estratégias podem tornar os fármacos mais disponíveis em alvos específicos, para produzir um melhor efeito terapêutico (EVANGELISTA, 2006).

O desenvolvimento dessas formas farmacêuticas, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, além de promover o controle da liberação de ativos em sítios específicos, tem sido o objetivo de diferentes pesquisas nos últimos anos. Dentre os principais materiais utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MAINARDES, 2007).

Neste contexto, as micropartículas poliméricas têm sido bastante estudadas, pois são capazes de promover a liberação modificada de fármacos a partir de uma ampla variedade de materiais poliméricos e de diversos métodos de obtenção (TRAN, BENOÎTA, VENIER-JULIENNEA, 2011).

A microencapsulação pode permitir a proteção de fármacos sensíveis às condições ambientais, a eliminação de incompatibilidades entre dois ou mais ativos e o mascaramento do sabor desagradável dessas substâncias. As micropartículas são particularmente interessantes no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada. Esses materiais podem ampliar a biodisponibilidade de fármacos presentes em medicamentos de liberação imediata e minimizar possíveis efeitos colaterais (AHMAD et al., 2011; THOMPSON et al., 2007).

O termo micropartícula é resultante do tamanho dessas partículas que, geralmente, revelam um diâmetro médio entre 1 e 100 μm . Para a obtenção de micropartículas, é possível utilizar diversos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que são capazes de liberar o fármaco por mecanismos de difusão e/ou de degradação (erosão) do material polimérico (GARAY, POCHEVILLE, MADARIAGA, 2010; KISSEL et al., 2006). Normalmente, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos de estruturas, as microesferas e as microcápsulas (Figura 1).

As microesferas são caracterizadas como sistemas matriciais, nos quais o fármaco está homogeneamente disperso no material polimérico. As microcápsulas, no entanto, constituem sistemas reservatórios, nos quais é possível identificar microdomínios diferenciados do fármaco, que pode ser sólido ou líquido (SUAVE et al., 2006; KUMAR, 2000).

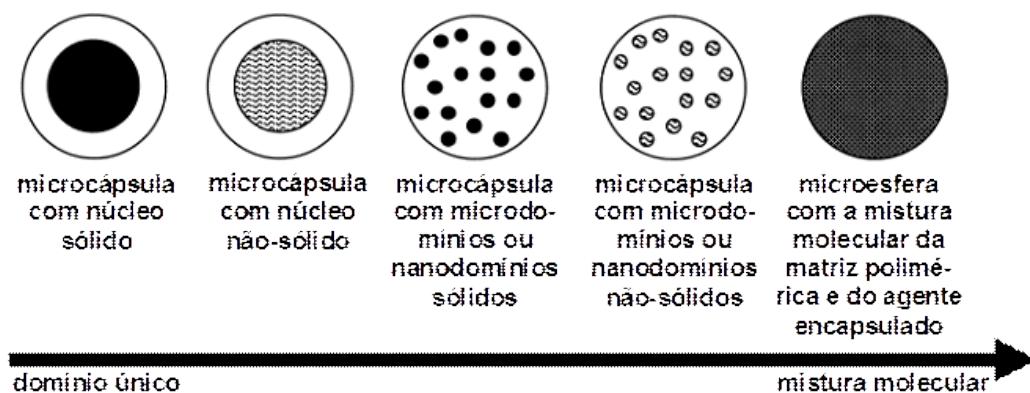


Figura 1 – Modelos de estrutura das micropartículas (adaptado de BIRNBAUM, BRANNON-PEPPAS, 2003)

O processo de microencapsulação, para ser considerado ideal, deve apresentar como características: rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo, facilidade em transpor para a escala industrial, além de ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e do material encapsulante em questão (GHARSALLAOUI et al., 2007; GIUNCHEDE, CONTE, 1995).

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a obtenção de micropartículas, permitindo uma adequação às características físico-químicas

dos diferentes fármacos. A escolha do procedimento mais efetivo na encapsulação de um determinado fármaco depende, basicamente, da hidrofilia/lipofilia do composto químico em avaliação (OBEIDAT, 2009).

Um sistema polimérico para a liberação de fármacos por via oral pode ser planejado e desenvolvido a partir de várias estratégias de processamento. Para a elaboração de microesferas, o método de emulsão e evaporação do solvente tem sido frequentemente empregado, face à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (LI, ROUAUD, PONCELET, 2008). Nesse caso, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução orgânica volátil contendo o polímero. Essa fase orgânica é emulsionada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido da fase interna pelo uso de calor, ou ainda, pela evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela aplicação de pressão reduzida. As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente adequado e secas sob condições apropriadas ou liofilizadas (TRAN, BENOÎTA, VENIER-JULIENNEA, 2011; OBEIDAT, 2009; JAIN, 2000).

Apesar da simplicidade das etapas, a formação de microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se a agitação e a natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de solvatação do polímero e, preferencialmente, de dissolução do fármaco são características desejáveis ao solvente da fase interna. Além desses aspectos, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixa faixa de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação, o fármaco e o polímero também devem ter baixa solubilidade na fase externa (HESLINGA, MASTRIA, ENIOLA-ADEFESO, 2009; LI, ROUAUD, PONCELET, 2008; WATTS, DAVIES, MELIA, 1990).

A eficiência de encapsulação é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração de fármaco inicialmente adicionado na formulação e a concentração presente nas partículas. Dessa maneira, quando o método de emulsão/evaporação do solvente é utilizado, a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco

entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por apresentar baixa hidrofilia podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão fase orgânica em fase aquosa (O/A). Entretanto, quando fármacos com elevada hidrofilia são empregados, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Nesse caso, a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão inversa (A/O), na qual um solvente polar contendo o fármaco e o polímero são emulsionados em uma fase oleosa, como o óleo mineral (LI, ROUAUD, PONCELET, 2008; SHUKLA, PRICE, 1989). Para fármacos hidrofílicos, é possível, ainda, a obtenção de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que a fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e essa emulsão resultante (A/O) é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (OBEIDAT, 2009; WATTS, DAVIES, MELIA 1990; OGAWA et al., 1988). O método de secagem por aspersão ou *spray drying* tem sido também amplamente aplicado na formulação de sistemas microparticulados, pois possibilita a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, como de ativos lipofílicos em emulsão aquosa (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Diferentes materiais poliméricos, com pequena ou nenhuma toxicidade, podem ser empregados na obtenção de micropartículas, nas quais a substância farmacologicamente ativa está dispersa ou dissolvida (OLIVEIRA, LIMA, 2006). Nesse contexto, o poli(metacrilato de metila), o poli(álcool vinílico), a poliacrilamida, o polietilenoglicol, o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), os copolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico (PLGA) e a policaprolactona (PCL) têm sido os biomateriais considerados clássicos e mais comuns à formação de micropartículas contendo fármacos, peptídeos, proteínas e antígenos (CHAKRAPANI, 2006).

Outros materiais como proteínas (LU, ZHANG, YANG, 2003), polissacarídeos, (KATO, ONISHI, MACHIDA, 2003), lipídeos (REITHMEIER, HERRMANN, GÖPFERICH, 2001) e a quitosana (SUAVE et al. 2006) têm sido estudados na liberação controlada, embora com uma frequência menor.

3.1.1 Poli(hidroxibutirato) e Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

Os poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres provenientes de fontes renováveis, derivados de hidroxiácidos, não sendo produzidos por síntese

química, mas biossinteticamente por bactérias, a partir de matérias-primas naturais, como a cana-de-açúcar. Esses polímeros ficam reservados em vacúolos no interior das bactérias para fornecimento de energia (ROA et al. 2010).

Os polímeros mais comuns do grupo dos PHAs, que têm sido utilizados como sistemas de liberação modificada de fármacos, são o poli(hidroxibutirato) (PHB) e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) (Figura 2) (CHEN, 2009).

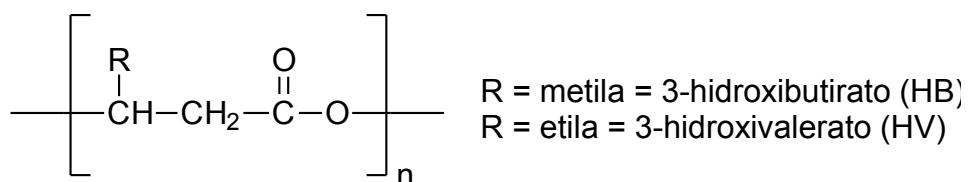


Figura 2 – Estruturas químicas do PHB e do PHBV

Além disso, o PHB apresenta inúmeras aplicações potenciais, como o uso em membranas biocompatíveis e em compósitos com hidroxiapatita (ROA et al. 2010). As estruturas químicas do PHB e do PHBV são muito similares aos polímeros sintéticos biodegradáveis mais usuais (PLA e PLGA), porém são degradados em uma taxa, geralmente, mais lenta (AMASS, AMASS, TIGHE, 1998).

Devido à biocompatibilidade e às propriedades não-tóxicas, o PHBV tem sido utilizado na preparação de micropartículas como sistemas de liberação modificada de fármacos (CHEN, 2009; FARAGO et al., 2008; ROSSI, AZGHANI, OMRI, 2004). A degradação das micropartículas de PHBV depende de alguns fatores como a massa molar do polímero e o grau de cristalinidade do mesmo. Nesse aspecto, quanto maior a presença de regiões amorfas no polímero, maior a sua capacidade de degradação (CHEN, DAVIS, 2002).

3.1.2 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos, de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos. A PCL é um material semicristalino, que forma soluções coloidais em

uma grande variedade de solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Entretanto, tem uma baixa solubilidade em acetona, acetato de etila, 2-butanona, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico. A fusão ocorre entre 59 e 64°C e sua transição vítreia (T_g), geralmente, está entre – 70 e – 60°C. Sua biocompatibilidade permite diversas aplicações no campo biomédico e na indústria farmacêutica (ROA et al., 2010; SINHA et al., 2004).

A PCL é capaz de sofrer degradação por meio de hidrólise das ligações éster da cadeia polimérica, gerando como produto final do processo o ácido ϵ -hidroxicaproico (Figura 3). Entretanto, a degradação da PCL é muito lenta devido a sua elevada hidrofobicidade, o que dificulta a penetração de água nas cadeias poliméricas e, consequentemente, a ocorrência dessa reação (NAIR, LAURENCIN, 2007; SINHA et al., 2004).

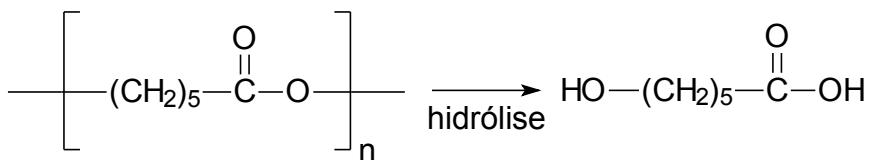


Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de hidrólise da PCL (MERKLI et al., 1998)

A lenta degradação da PCL em sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos não gera um microambiente ácido, como o produzido pelos polímeros PLA e PLGA. Esse fato é uma vantagem da PCL no desenvolvimento de micropartículas contendo proteínas, uma vez que essas macromoléculas podem desnaturar em função do pH e perder a sua atividade biológica. Outras vantagens relacionadas à PCL, frente aos polímeros PLA e PLGA, são o menor custo e a possibilidade de liberação de fármacos por um período mais prolongado (AL HAUSHEY et al., 2007).

3.2 ASPECTOS BIOFARMACÊUTICOS DO RESVERATROL

O resveratrol é um composto químico que pertence à classe dos estilbenos e consiste em dois anéis aromáticos unidos por um grupo vinila. A

nomenclatura da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) para o resveratrol é 3,4',5-tridroxi-estilbeno (Figura 1), embora seja também conhecido como 3,4',5-estilbenotriol. Sua fórmula química é $C_{14}H_{12}O_3$ e sua massa molar é 228,25 g.mol⁻¹ (LU et al., 2009). Existe como isômeros *cis*- e *trans*-, mas o isômero *trans* tem maior atividade biológica, devido à presença do grupo 4'-hidroxiestirila. O resveratrol é uma fitoalexina fenólica natural, produzido por uma variedade de espécies vegetativas em resposta a estresses exógenos, como lesões, infecções fúngicas ou radiação UV. É formado por meio de uma reação de condensação entre três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de 4-coumaroil-CoA, catalisada pela resveratrol sintase, que também gera quatro moléculas de CO_2 (DAS, NG, HO, 2010).

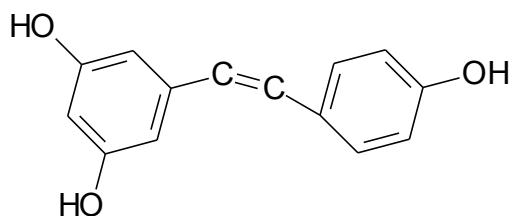


Figura 4 – Estrutura química do resveratrol

Vários estudos têm comprovado os benefícios do resveratrol à saúde. Esse fármaco tem demonstrado propriedades quimiopreventivas, antioxidantes, antiplaquetárias, antifúngicas, anti-inflamatórias, analgésicas, cardioprotetoras e neuroprotetoras (DAS, NG, 2009; RASTIJA, MEDIC-SARIC, 2009; LUCAS-ABELLÁN et al., 2007; BAUR, SINCLAIR, 2006).

Os possíveis mecanismos para essas diversas atividades biológicas envolvem a modulação do metabolismo lipídico, da agregação plaquetária e da resposta inflamatória (SHI et al., 2008; NORATA et al., 2007; JAROLIM et al., 2004; PACIFICI, 2004; SHENOUDA et al., 2004).

O resveratrol age com efetor biológico pleiotrópico, que regula as três fases do processo da carcinogênese, o início, a promoção e a progressão do tumor. Uma vez absorvido, pode atuar por diferentes mecanismos, como a inibição da ativação metabólica de compostos carcinogênicos, o estímulo da detoxificação de metabólitos reativos, a prevenção do DNA celular e a supressão da progressão do tumor (NEMEN, LEMOS-SENNNA, 2011).

Os efeitos anticarcinogênicos provocados pelo resveratrol também parecem estar associados à sua atividade antioxidante, visto que ele tem demonstrado inibir a ciclo-oxigenase (COX), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a hidroperoxidase, a proteína quinase C, a fosforilação da proteína de linfomas da célula B (Bcl-2), a proteína quinase B (PKB ou Akt), a quinase de adesão focal, o fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B), a metaloprotease de matriz tipo 9 e os reguladores do ciclo celular (ATHAR et al., 2007). O resveratrol também tem a capacidade de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana (LDL), por modular a atividade do metabolismo de lipídeos e de lipoproteínas. É capaz de suprimir a angiogênese e apresenta atividade estrogênica, devido à sua semelhança estrutural com o agente estrogênico dietilestilbestrol (NEMEN, LEMOS-SENNNA, 2011; KING, BOMSER, MIN, 2006).

No entanto, a utilização do resveratrol é limitada porque é um composto facilmente oxidável e extremamente fotossensível, sofrendo uma transformação induzida pela luz (radiação ultravioleta) do isômero *trans* para o isômero *cis* (PINEIRO, PALMA, BARROSO, 2006; TRELA, WATERHOUSE, 1996). Essa instabilidade frente à luz, ao ar e às enzimas oxidativas reduz a sua viabilidade e a sua biodisponibilidade para o uso clínico (KIM et al., 2009).

Ambos os isômeros tem propriedades antioxidantes e antiproliferativas. No entanto, há também diferenças significativas entre eles. O *trans*-resveratrol, ao contrário do isômero *cis*, estimula a expressão do gene SIRT1, que conduz à indução das vias de sinalização SIRT-dependente. A presença de sirtuínas, enzimas que processam a desacetilação das histonas ou a atividade da monoribosiltransferase nas células, diminui a taxa de envelhecimento replicativo, contribuindo assim para diminuir a taxa de morte celular (WALLE et al., 2004). A maior contribuição do resveratrol ocorre por proteção contra a apoptose, pelo aumento da ativação do sistema proteossomal e por estimular a expressão de enzimas antioxidantes, bem como a indução de vias de sinalização intracelulares envolvidas no combate ao câncer. Todos esses efeitos demonstram efetivamente a redução do envelhecimento de células normais e da atividade de células que estão envolvidas em processos patológicos, como o desenvolvimento da malignidade, a hiperproliferação, a neoangiogênese, a

disfunção endotelial e muitos outros sinais específicos de desequilíbrio metabólico (OGANESYAN et al., 2010).

Apesar de numerosos estudos *in vitro* sobre as propriedades dos compostos polifenólicos, seus efeitos, frequentemente, não são observados *in vivo* (GOLDBERG, YAN, SOLEAS, 2003). Essa aparente discrepância entre os trabalhos *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuída à baixa absorção e ao elevado metabolismo dessas substâncias orgânicas (WILLIAMSON, MANACH, 2005; WALLE et al., 2004). Após a administração oral, na dose de 25 mg, a absorção do resveratrol demonstrou ser inferior a 70%. Entretanto, a sua biodisponibilidade foi quase nula, uma vez que apenas uma quantidade traço dessa molécula (menos que 5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), na forma inalterada, foi encontrada no plasma (NEMEN, LEMOS-SENNNA, 2011). A rápida conjugação com sulfato no intestino e no fígado foi responsável pela redução da biodisponibilidade oral e pela meia-vida inicial baixa (8–14 min) do resveratrol (WENZEL, SOMOZA, 2005; WALLE et al., 2004). Outros fatores que limitam o aproveitamento terapêutico do resveratrol incluem a sua baixa estabilidade frente à oxidação (PINEIRO et al., 2006), a reduzida solubilidade em meio aquoso (13,6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ em pH 7,4) (HUNG et al., 2007) e a sua lipofilicidade (LÓPEZ-NICOLAS et al., 2006).

Dessa forma, considerando a sua degradação elevada frente às condições ambientais, a sua biodisponibilidade baixa e a sua meia-vida biológica curta, existe o interesse em adotar estratégias capazes de otimizar as características físico-químicas e farmacocinéticas desse ativo para preservar as suas importantes atividades biológicas na administração por via oral.

Nesse contexto, as formas farmacêuticas de liberação modificada contendo o resveratrol podem ser alternativas viáveis e promissoras, com o propósito de assegurar a sua estabilização, o aumento da sua biodisponibilidade e as condições mais adequadas ao uso clínico. No entanto, poucos estudos sobre a encapsulação do resveratrol estão disponíveis na literatura.

3.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO O RESVERATROL

Alguns trabalhos recentes, conduzidos a partir de diferentes materiais têm demonstrado a viabilidade da encapsulação do resveratrol.

Lucas-Abellán et al. (2007) trabalharam com a formação de complexos de inclusão entre β -ciclodextrina ou di-O- α -maltosil- β -ciclodextrina e resveratrol. A adição dessas ciclodextrinas no meio reacional demonstrou um efeito inibitório sobre a oxidação do resveratrol por lipo-oxigenases. Esse resultado foi dependente da constante de complexação entre o ativo e a ciclodextrina usada.

Das e Ng (2009) desenvolveram formulações para a liberação retardada de resveratrol, como grânulos de cálcio-pectina (Ca-pectina), para proteger o ativo durante a sua passagem através do trato gastrointestinal (TGI) superior e garantir a sua liberação na região do cólon. Os grânulos Ca-pectina foram preparados variando seis parâmetros de formulação (pH, concentração do agente de reticulação, tempo de reticulação, tempo de secagem, concentração de pectina e concentração de resveratrol). As partículas obtidas foram submetidas à análise morfológica, à avaliação da interação fármaco-polímero e ao estudo de degradação enzimática. Os grânulos foram capazes de encapsular uma quantidade muito elevada de resveratrol (acima de 97,5%). Dependendo dos parâmetros de formulação, a liberação de resveratrol após 10 h de incubação nos meios de dissolução foi entre 80 e 100%.

Kim et al. (2009) encapsularam o resveratrol em nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona), obtidas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente. O tamanho médio dos materiais elaborados com diclorometano (DCM) ($523,5 \pm 36,7$ nm) foi maior do que o verificado com a mistura DCM-etanol ($494,5 \pm 29,2$ nm) e DCM-acetona ($493,5 \pm 6,9$ nm). A eficiência de encapsulação empregando DCM como fase dispersa ($78,3 \pm 7,7\%$) foi maior do que a obtida com misturas de solventes. Um aumento na massa molar da PCL levou a um aumento na eficiência de encapsulação (de $78,3 \pm 7,7$ para $91,4 \pm 3,2\%$). O uso do copolímero em bloco do óxido de etileno e do óxido de propileno (Pluronic® F-127) produziu o menor tamanho médio das partículas. Esses resultados demonstraram que o solvente da fase dispersa, a massa

molar dos materiais poliméricos, o tipo de estabilizador da emulsão são fatores importantes que afetam as propriedades das nanopartículas contendo resveratrol.

Lu et al. (2009) realizaram estudos para a formação de complexos de inclusão do antioxidante resveratrol com ciclodextrinas, β -ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). A constante de estabilidade observada para o sistema resveratrol:HP β CD foi maior que para o sistema resveratrol: β CD, sugerindo que a HP β CD possui uma habilidade de inclusão mais elevada que a β CD. Segundo os pesquisadores, esse fato implica que a cavidade da ciclodextrina modificada fornece um melhor microambiente para o resveratrol. Isto provavelmente ocorre pois as substituições com o radical hidroxipropila ampliam a abertura da β CD original e reduzem as ligações de hidrogênio intramoleculares, permitindo o acesso da molécula hóspede à cavidade da HP β CD mais facilmente.

Frozza et al. (2010), visando preservar a atividade biológica do ativo e melhorar a sua biodisponibilidade cerebral, prepararam nanocápsulas de *trans*-resveratrol com núcleo lipídico. A distribuição das nanocápsulas no tecido cerebral foi avaliada a partir da administração por via intraperitoneal e por gavagem em ratos saudáveis. As nanocápsulas apresentaram um diâmetro médio de 241 nm, índice de polidispersidade de 0,2 e potencial zeta de -15 mV. As nanocápsulas demonstraram uma maior concentração de *trans*-resveratrol no cérebro, fígado e rim após a administração, do que a observada para o *trans*-resveratrol livre. Em resumo, nanocápsulas de resveratrol apresentaram alta eficiência de encapsulação, aumentaram a concentração de *trans*-resveratrol no tecido cerebral e a segurança gastrointestinal foi melhorada quando comparada com *trans*-resveratrol puro.

Oganesyan et al. (2010) desenvolveram estudos farmacocinéticos a partir de nanopartículas de resveratrol. Após a administração oral do resveratrol puro em ratos, apenas 19% da dose foi verificada no sangue, enquanto que o uso das nanopartículas de resveratrol, obtidas a partir do Eudragit® RL e de lecitina/quitosana, aumentou a biodisponibilidade para 39% e 61%, respectivamente.

Peng et al. (2010) incorporaram o resveratrol em microesferas de quitosana reticulada com vanilina para a liberação modificada e a estabilização

do fármaco. As micropartículas foram preparadas pelo método de emulsão, em presença do agente de reticulação. As microesferas apresentaram uma superfície lisa com uma distribuição de tamanho entre 53 e 311 μm . A eficiência de encapsulação do resveratrol nas microesferas foi superior a 90%. O resveratrol contido nos materiais microestruturados revelou uma maior proteção da luz e do calor em comparação com o resveratrol puro.

Dessa forma, considerando o pequeno número de artigos que tratam da liberação modificada do resveratrol, associado à possibilidade de redução da sua degradação química e, principalmente, de melhoria das características de biodisponibilidade do fármaco, surge à perspectiva de instituir o uso de micropartículas poliméricas de PHBV e de PCL voltadas a essa finalidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico (QUIMIS, modelo 235, Diadema, Brasil);
- Analisador de umidade por infravermelho (BEL ENGINEERING, modelo TOP RAY 160, Monza, Itália);
- Balança analítica de prato único (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Balança termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50, Quioto, Japão);
- Centrífuga para tubos (BIO ENG, modelo BE-4004, São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência dotado de detector de ultravioleta (WATERS, modelo 2695 Alliance, Milford, Estados Unidos);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratômetro de raio-X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão);
- Dissolutor de cubas (NOVA ÉTICA, modelo 299-6ATTS, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos);
- Espectrômetro de difração a laser (CILAS, modelo Cilas 920 L, Marseille, França);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (QUIMIS, modelo Q-136M4, Diadema, Brasil);
- Leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES, modelo SpectraMax 190, Sunnyvale, USA);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópico eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550 Superscan, Quioto, Japão);
- Placa de agitação e aquecimento (QUIMIS, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);

- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (SHIMADZU, modelo DSC-60, Quioto, Japão).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Resveratrol (99,8 % de pureza, Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Brasil).

4.2.2 Polímeros

- Poli(álcool vinílico) (PVAI) ($\overline{M_w}$ 72.000 g.mol⁻¹, 88,5 mol% de hidrólise, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Poli- ϵ -caprolactona (PCL) ($\overline{M_w}$ 70.000 a 90.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBV) ($\overline{M_w}$ = 380.000 g.mol⁻¹ 8,70 mol% de hidroxivalerato, Biocycle[®] L 110, PHB Industrial, Serrana, Brasil).

O fármaco e os polímeros foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

4.2.3 Água purificada

Para o desenvolvimento dos sistemas microparticulados foi utilizada água purificada pelo processo de destilação (H_2O destilada), em equipamento tipo Pilson (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).

4.2.4 Outros reagentes e solventes

- Acetonitrila grau HPLC (EMD CHEMICALS Inc., Darmstadt, Alemanha);
- Ácido acético grau HPLC (EMD CHEMICALS Inc., Darmstadt, Alemanha);
- Álcool etílico P.A. (EtOH) (99,8% de pureza, SYNTH, Diadema, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (ALDRICH Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Clorofórmio P.A. ($HCCl_3$) (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Diclorometano (CH_2Cl_2) (HEXIS CIENTÍFICA S/A, Indaiatuba, Brasil);

- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (KH_2PO_4) (SYNTH, Diadema, Brasil);
- Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) (BIOTEC ANADIOL, São José dos Pinhais, Brasil);
- Metanol grau HPLC (EMD CHEMICALS Inc., Darmstadt, Alemanha);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80, Tween® 80, DELAWARE, Porto Alegre, Brasil).

Os solventes orgânicos apresentaram grau analítico e foram usados sem tratamento prévio.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa iniciou com a obtenção das micropartículas poliméricas contendo resveratrol, a partir dos poliésteres biodegradáveis, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Para a determinação quantitativa do resveratrol incorporado nas micropartículas poliméricas foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco. A validação foi realizada para os parâmetros de linearidade, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os sistemas microparticulados foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. O mecanismo de liberação *in vitro* do resveratrol, em condições miméticas ao trato intestinal, foi estudado a partir do ensaio de dissolução e os perfis de liberação foram avaliados por modelos dependentes e independentes. A atividade antioxidante total do resveratrol presente nas micropartículas foi determinada pelo ensaio de inativação do ácido hipocloroso (HOCl) e por meio do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS•⁺). A avaliação da citotoxicidade dos sistemas poliméricos em estudo foi conduzida por meio do teste celular *in vitro* de hemólise.

As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 5.

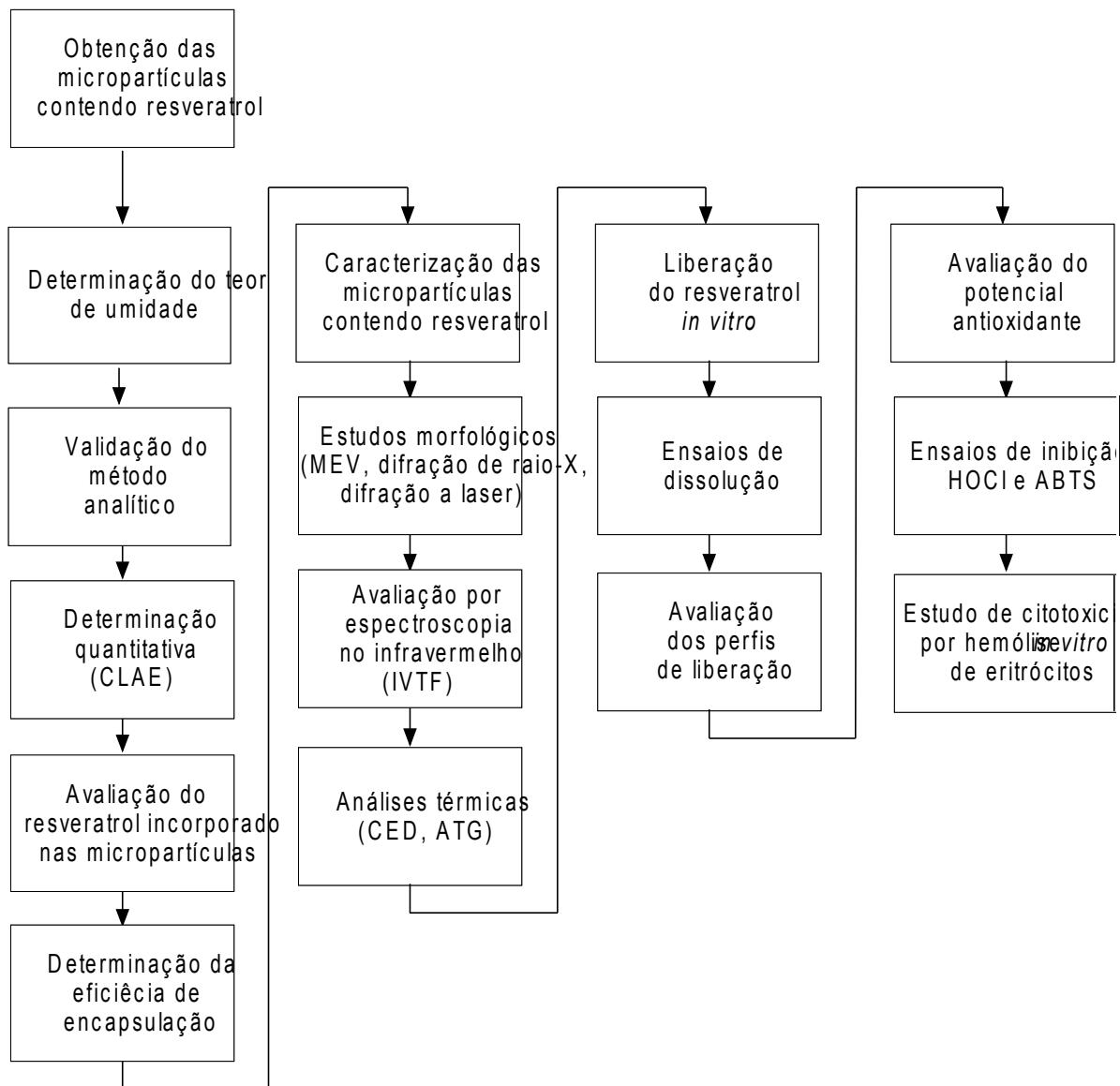


Figura 5 – Fluxograma das etapas da pesquisa

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das micropartículas poliméricas

As micropartículas foram obtidas a partir do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) ou da poli- ϵ -caprolactona (PCL). Os sistemas foram denominados M1 (micropartículas formuladas com o PHBV) e M2 (micropartículas preparadas com a PCL). Esses materiais foram obtidos em concentrações teóricas de 0, 5, 10 e 20% de resveratrol na composição (R0, R5, R10 e R20, respectivamente).

As micropartículas que compõem os sistemas M1 e M2 foram elaboradas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico (LI et al., 2008), a partir das formulações indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das formulações de micropartículas poliméricas contendo resveratrol

Composição	Formulação			
	R0	R5	R10	R20
Fase aquosa				
Polisorbato 80 (g)	0,25	0,25	0,25	0,25
PVAI (g)	4,00	4,00	4,00	4,00
H ₂ O destilada (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0
Fase orgânica				
Resveratrol (g)	—	0,10	0,20	0,40
PHBV (sistema M1) ou PCL (sistema M2) (g)	2,00	1,90	1,80	1,60
Clorofórmio (sistema M1) ou Diclorometano (sistema M2) (mL)	40,0	40,0	40,0	40,0

De forma sintética, o resveratrol foi dissolvido no solvente orgânico apropriado (sistema M1: clorofórmio; sistema M2: diclorometano) contendo o polímero (PHBV ou PCL). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa, sob agitação mecânica (5.000 rev.min⁻¹) por 5 min. A emulsão formada foi mantida em agitação mecânica (800 rev.min⁻¹), à temperatura ambiente, durante 4 h (Figura 6).

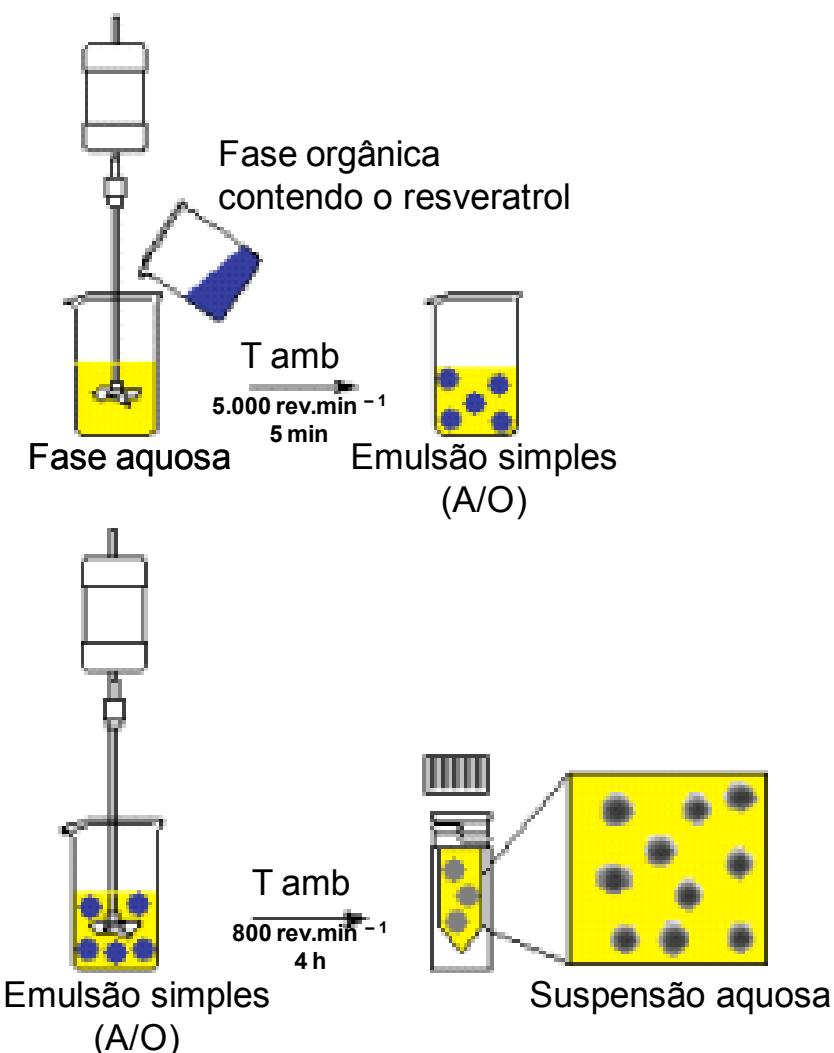


Figura 6 – Esquema de formação das micropartículas poliméricas contendo resveratrol pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente

Transcorrido o tempo para a evaporação do solvente orgânico, as micropartículas foram separadas por centrifugação ($2.500 \text{ rev}.\text{min}^{-1}$, 10 min) e lavadas, por 2 vezes, com água purificada. Os produtos obtidos foram secos em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. As micropartículas foram armazenadas na temperatura ambiente.

Todas as formulações foram desenvolvidas em triplicata, sendo que as micropartículas denominadas M1R0 e M2R0 foram elaboradas na ausência do fármaco, como controle negativo.

4.4.1.1 Misturas físicas

Misturas físicas entre os polímeros utilizados e o resveratrol foram preparadas para uma caracterização comparativa dos sistemas microparticulados em estudo. Foram elaboradas misturas físicas na proporção, em massa, de 1:5 (resveratrol:polímero) (20%) para os sistemas M1 e M2.

4.4.2 Rendimento

O rendimento das formulações do sistema M1 e M2 foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação das micropartículas pela soma das massas do PHBV ou da PCL, do resveratrol e do tensoativo polissorbato 80 (Tween® 80), excluindo os demais componentes, conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa (polímero + resveratrol + Tween}^R 80)} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.4.3 Determinação do teor de umidade

O conteúdo de água presente no resveratrol, no PHBV, na PCL e nas micropartículas dos sistemas M1 e M2 foi avaliada no analisador de umidade por infravermelho (TOP RAY 160, Bel engineering). Previamente, a termobalança foi calibrada, conforme as indicações do fabricante.

Para cada amostra, uma massa exata, de aproximadamente 1 g, foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105°C, durante um período de tempo variável, até massa constante. O valor em porcentagem referente à perda de massa foi calculado como sendo o teor de umidade da amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.4 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) foi determinada para os sistemas M1 e M2, a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Waters 2695 Alliance dotado de detector na região do ultravioleta, conforme os parâmetros estabelecidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do resveratrol por CLAE

Características	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 306$ nm)
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹
Coluna	Xterra Waters C18 250 X 4,6 mm, 5 µm
Fase móvel	ácido acético:água:acetonitrila:metanol (0,2:2,3:22,5:75)
Volume de injeção	20 µL

Previamente, o método passou pelo processo de validação analítica, conforme descrito a seguir.

4.4.4.1 Validação do método analítico para a quantificação do resveratrol presente nas micropartículas

A validação do método analítico por CLAE foi realizada segundo os critérios propostos pelo ICH (*International Conference on Harmonization of the technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*) (1996) e resolução R.E. 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003).

Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, sendo os ensaios efetuados por CLAE em sistema Waters 2695 Alliance dotado de detector de ultravioleta, no comprimento de onda de 306 nm (SAPINO et al., 2009) para os sistemas M1 e M2. Os dados foram analisados pelo software *Empower chromatography*.

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas três curvas analíticas, com seis níveis de concentração (10, 20, 25, 30, 40 e 50 µg.mL⁻¹), utilizando etanol como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, por meio da relação entre o desvio padrão da curva analítica e a sua inclinação, usando os fatores multiplicadores sugeridos pela norma ICH (1996), conforme demonstrado nas Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{B} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo, LD, o limite de detecção; LQ, o limite de quantificação; DP, o desvio padrão da curva analítica; e B, o coeficiente angular.

Para avaliar a repetibilidade, três concentrações diferentes (10, 30 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram analisadas em triplicata, totalizando nove determinações, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia.

A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação entre as determinações de uma mesma concentração (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em triplicata, mas realizadas em três dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR ou CV% inter-dia.

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade conhecida de fármaco (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) à solução-amostra, resultando nas concentrações de 12, 32 e 52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

Para a avaliação da robustez, as concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, de temperatura e de coluna cromatográfica e avaliadas em triplicata.

O fluxo foi modificado de 1 mL.min^{-1} para 0,9 mL.min^{-1} . A temperatura foi alterada de 25°C para 35 e 40°C. A coluna cromatográfica Waters Xterra C18 (250 X 4,6 mm, 5 μm) foi trocada pela coluna similar Vertical VertiSep GES C18 (250 X 4,6 mm, 5 μm). Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão.

As soluções-amostra utilizadas para a avaliação da repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez foram preparadas a partir da formulação M1R10, quando da validação do método analítico para o sistema M1 e da formulação M2R10, quando da análise de validade do método analítico para o sistema M2.

4.4.4.2 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas dos Sistemas M1 e M2

Resumidamente, foi pesada uma massa exata de micropartículas, equivalente a 20 mg de resveratrol. Esse material foi disperso em 7 mL de etanol e mantido por 12 h, em agitação magnética (1000 rev.min⁻¹). O volume foi completado, em balão volumétrico, com o mesmo solvente, até 10 mL e filtrado por membrana de poli(fluoreto de vinilideno) (Durapore®, filtro hidrofílico, 0,22 µm de abertura dos poros, Millipore). Em seguida, o filtrado foi diluído em etanol e a concentração do fármaco foi determinada por CLAE em 306 nm. O doseamento foi realizado em triplicata, frente ao método analítico previamente validado na faixa de 10 a 50 µg.mL⁻¹.

4.4.4.3 Eficiência de encapsulação

Considerando os resultados obtidos na quantificação do resveratrol, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada a partir da diferença entre a massa de fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas micropartículas (LI, ROUAUD, PONCELET, 2008), conforme demonstrado na Equação 4.

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{massa do resveratrol nas micropartículas}}{\text{massa inicial (teórica) do resveratrol}} \times 100$$

(Equação 4)

4.4.5 Caracterização dos sistemas poliméricos microparticulados

4.4.5.1 Análises morfológicas e de superfície

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas, pertencentes aos sistemas M1 e M2, foi realizada no microscópico eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu Co.). As micropartículas foram levadas à estufa a vácuo TE 395 (Tecnal) e fixadas em suporte metálico. Após, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu Co.). As micrografias foram obtidas em diferentes magnificações, após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do software específico.

As micropartículas poliméricas de PHBV e PCL, o resveratrol, os polímeros de partida e as misturas físicas foram examinadas em difratômetro de raio-X Shimadzu XRD-6000, scan de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $\text{K}\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade (CANEVAROLO JR., 2004).

4.4.5.2 Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica

O tamanho de partícula das formulações dos sistemas M1 e M2 foi avaliado por espectrometria de difração a laser, utilizando um granulômetro a laser CILAS 920L, com faixa de análise entre 0,3 a 400 μm .

As amostras pulverizadas e secas foram dispersas em água filtrada e sonicadas por 1 min, antes de ser realizada a medida. A partir da suspensão homogênea obtida, por meio do software específico, The Particle Expert® (versão 5.12, Cilas, Marseille, França), o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados. O *span*, valor matemático definido como a medida da dispersão granulométrica (CHEN, DAVIS, 2002), que avalia a variação do volume de distribuição das partículas em relação ao diâmetro médio, foi calculado a partir da Equação 5.

$$\text{span} = \frac{d_{(v,90)} - d_{(v,10)}}{d_{(v,50)}} \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo, $d(v,10)$, $d(v,50)$ e $d(v,90)$, respectivamente, o diâmetro das partículas correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada para a amostra.

4.4.5.3 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

As micropartículas poliméricas pertencentes aos sistemas M1 e M2 foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% em massa), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu Co.), 32 scans. min^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros obtidos por infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) das micropartículas foram

avaliados frente aos espectros do fármaco, dos polímeros de partida e das misturas físicas.

4.4.5.4 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas de ATG, que foram obtidas na faixa de temperatura entre 283 K (10°C) e 1173 K (900°C). Para isso, foi empregada uma termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), empregando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em cadinho de platina contendo aproximadamente 5 ± 0,1 mg da amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

A curva de calorimetria exploratória diferencial (CED) foi elaborada para o resveratrol, para os polímeros PHBV e PCL, para a mistura física e para as micropartículas preparadas, na faixa de temperatura entre 303 K (25°C) e 623 K (500°C). Foi utilizada uma célula calorimétrica da marca Shimadzu, modelo DSC-60, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sendo que a amostra (2,5 mg) foi acondicionada em cápsula de alumínio fechada. O equipamento foi previamente calibrado com índio (m.p. = 429,6 K; $\Delta H_{fusão}$ = 28,54 J.g⁻¹) e zinco (m.p. = 692,6 K).

4.4.6 Estudo de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram conduzidos para o resveratrol puro e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2. Para tanto, foi empregado o aparato 2 (pá) do dissolutor de cubas 299/6 (Nova Ética), mantendo a temperatura do sistema em 37 ± 0,5°C, a agitação em 75 rev.min⁻¹, por um período total de 12 h. O meio de dissolução utilizado foi o tampão fosfato pH = 6,8 (50 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 22,4 mmol.L⁻¹ de NaOH), em volume de 900 mL. Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras de 10 mL foram coletadas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume, e analisadas em 306 nm no espectrofotômetro UV-Vis Genesys 10 UV Scanning. Todo o procedimento foi realizado em triplicata, na ausência de luz.

4.4.6.1 Avaliação dos perfis de liberação

Os perfis de liberação *in vitro* foram obtidos plotando-se a porcentagem de resveratrol liberada em função do tempo. Posteriormente, esses resultados foram analisados por meio do teste da razão (eficiência de dissolução) e dos métodos modelo-dependentes.

A eficiência de dissolução do resveratrol foi determinada segundo Gil, Orlando e Matias (2005), United States Pharmacopeia (2005) e Khan (1975), e comparada com a eficiência de dissolução das diferentes formulações de micropartículas. A eficiência de dissolução é uma avaliação modelo-independente, definida pela área sob a curva de dissolução e expressa como a percentagem da área de um retângulo que descreve 100% da dissolução, em um determinado período de tempo (Equação 6).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Na qual: y é a porcentagem de fármaco dissolvido no tempo t .

A avaliação matemática dos perfis de liberação *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 7), ao modelo biexponencial (Equação 8), ao modelo de ordem zero (Equação 9) e ao modelo de Weibull (Equação 10), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (MSC), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \quad (\text{Equação 7})$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \quad (\text{Equação 8})$$

$$D = kt \quad (\text{Equação 9})$$

$$D = 100 \left[1 - e^{-(t/Td)b} \right] \quad (\text{Equação 10})$$

Na qual: $\%D$, percentual do fármaco dissolvido no tempo t ; k , α e β , constantes cinéticas de dissolução verificadas; A e B , concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; Td , tempo no qual 63,2 % do fármaco é dissolvido; b , parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (Equação 11) ou lei das potências foi também aplicado, permitindo a obtenção dos parâmetros a e n , com a finalidade de ampliar a informação sobre o mecanismo de liberação do fármaco a partir dos sistemas microparticulados.

$$ft = at^n \quad (\text{Equação 11})$$

Na qual: a , constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n , expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação; ft , fração do fármaco dissolvido no tempo t .

Para sistemas esféricos, a lei das potências apresenta duas interpretações físico-químicas distintas. Quando n assume um valor inferior a 0,43, isso indica que a liberação da substância é controlada por difusão (mecanismo de transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, indica que a liberação é controlada pelo inchamento (ou erosão) do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Valores de n entre 0,43 e 0,85 estão relacionados com a sobreposição de ambos os fenômenos, denominado de transporte anômalo (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

Os métodos modelo-dependentes destinados à avaliação dos perfis de liberação foram aplicados com o auxílio do software *MicroMath Scientist*® (versão 2.01, Saint Louis, Estados Unidos).

4.4.7 Estudo do potencial antioxidante

A atividade antioxidante total do resveratrol presente nas micropartículas foi determinada pelos ensaios de inibição do ácido hipocloroso (HOCl) e do radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}).

Soluções aquosas do fármaco puro e das micropartículas (M1R20 e M2R20), contendo as mesmas concentrações de resveratrol foram preparadas 30 min antes do início dos experimentos e mantidas na ausência de luz.

4.4.7.1 Inibição do ácido hipocloroso (HOCl)

Após 5 min de reação entre o HOCl (30 μ L, 75 μ mol.L⁻¹) e cada solução aquosa (20 μ L) do fármaco puro ou das micropartículas (M1R20 e M2R20), foram adicionados 20 μ L de uma solução contendo 10 mmol.L⁻¹ de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) dissolvida em dimetilformamida 50%, 100 μ mol.L⁻¹ de iodeto de potássio e 400 mmol.L⁻¹ de ácido acético (DYPBUKT et al., 2005). A reação foi realizada em 50 mmol.L⁻¹ de solução tampão fosfato de sódio (pH = 7.4) até o volume final de 200 μ L a 37°C por 15 min. A absorbância foi medida em 650 nm em um leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES, SpectraMax 190, Sunnyvale, USA). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e as micropartículas sem resveratrol (M1R0 e M2R0) foram utilizados como controle negativo. A atividade antioxidante foi obtida como porcentagem de inibição do HOCl usando a Equação 12.

$$Inibição = \left[\frac{(Ab - Aa)}{Ab} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Na qual: Ab é a absorbância do controle e Aa é a absorbância da amostra.

4.4.7.2 Ensaio de descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

Resumidamente, soluções aquosas de ABTS (7 mmol.L⁻¹) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L⁻¹) foram misturados em uma proporção volumétrica de 1:1 e incubadas na ausência de luz, à temperatura ambiente por 12 h, para a obtenção do radical catiônico ABTS^{•+} (RE et al., 1999).

Em seguida, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em 50 mmol.L⁻¹ de uma solução tampão de fosfato de sódio (pH = 7,4), para obter um valor de absorvância de $\pm 0,7$ a 734 nm. A complexação entre o ABTS^{•+} e o resveratrol puro ou as micropartículas (M1R20 e M2R20) foi medida pelo decréscimo da absorvância em 734 nm, após 30 min, em um leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES, SpectraMax 190, Sunnyvale, USA). Todas as leituras foram realizadas em triplicata e as micropartículas elaboradas sem a adição do resveratrol (M1R0 e M2R0) foram utilizadas como controle negativo. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do ABTS^{•+}, de acordo com a Equação 12.

4.4.8 Atividade citotóxica *in vitro* sobre hemácias

O efeito citotóxico *in vitro* do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL foi estudado utilizando amostras de sangue venoso heparinizado coletado de três voluntários saudáveis. Este experimento envolvendo o sangue humano foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o protocolo número 16173/11, parecer nº 121/2011.

O sangue total, recém coletado, foi centrifugado (4000 rev.min⁻¹ por 5 min) a 4°C em uma centrífuga refrigerada e o plasma foi cuidadosamente removido por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias foi lavada por centrifugação (4000 rev.min⁻¹ por 5 min) em solução tampão fosfato gelado (NaCl 0,15 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mmol.L⁻¹, pH = 7,4), por três vezes. Os eritrócitos foram ressuspensos com a solução tampão para obter um hematócrito de 5% (LI et al., 2000).

Soluções aquosas (10 μ L) do fármaco puro ou das micropartículas de PHBV e de PCL (M1R20 e M2R20) contendo a mesma concentração de resveratrol (71 μ g.mL⁻¹) foram incubadas, em triplicata, a 37°C com a suspensão de eritrócitos a 5% (450 μ L) e a solução tampão fosfato, previamente preparada (40 μ L), por 24 h sob agitação constante de 120 rev.min⁻¹. A suspensão de eritrócitos foi, então, centrifugada a 4000 rev.min⁻¹ por 5 min. O conteúdo de hemoglobina liberado, devido à ação hemolítica do resveratrol, foi determinado no sobrenadante, por meio da medida da absorvância em 540 nm, utilizando um leitor de microplacas (MOLECULAR

DEVICES, SpectraMax 190, Sunnyvale, USA) (HAPNER, DEUSTER, CHEN, 2010; BANERJEE et al., 2008).

Os ensaios também foram realizados para as micropartículas sem o resveratrol (M1R0 e M2R0). A hemólise observada na ausência da amostra foi coletada como branco. Os grupos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey. Um valor de $p \leq 0,05$ foi adotado para indicar diferenças estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas de PHBV que compõem o sistema M1 (M1R0, M1R5, M1R10 e M1R20) e as micropartículas de PCL do sistema M2 (M2R0, M2R5, M2R10 e M2R20) foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples (O/A) e evaporação do solvente orgânico. Após a secagem, os materiais do sistema M1 apresentaram um aspecto macroscópico pulverulento de cor amarelo-pálido, tonalidade semelhante àquela observada para o PHBV puro. Para o sistema M2, foi verificado um aspecto físico de pó quase branco.

5.1.1 Rendimento

Os rendimentos foram calculados com base na Equação 1 para as micropartículas dos sistemas M1 e M2. A Tabela 3 sumariza os resultados percentuais, apresentados na forma de valor médio e desvio padrão.

Todas as formulações revelaram um rendimento superior a 50%, o que pode ser considerado aceitável a partir do método empregado. Tanto para o sistema M1, quanto para o sistema M2, as micropartículas elaboradas com a menor quantidade de fármaco (5% de resveratrol) apresentaram um melhor rendimento, sendo 87,8% para a formulação M1R5 e 73,77% para a formulação M2R5.

Tabela 3 – Rendimento* obtido para as formulações dos sistemas M1 e M2, a partir do método de emulsão simples/evaporação do solvente

Formulação	Resveratrol inicial (g)	Rendimento (%)
M1R0	—	57,7 ± 9,3
M1R5	0,100	87,8 ± 8,2
M1R10	0,200	70,5 ± 5,9
M1R20	0,400	72,7 ± 9,1
M2R0	—	65,9 ± 2,2
M2R5	0,100	73,8 ± 5,1
M2R10	0,200	63,1 ± 2,0
M2R20	0,400	50,8 ± 6,7

* média (n = 3) ± desvio padrão

5.1.2 Determinação do teor de umidade

A Tabela 4 fornece os resultados referentes ao teor de água presente nas micropartículas que integram os sistemas M1 e M2, frente aos valores obtidos para o resveratrol (1,20%), PHBV (3,59%) e PCL (1,12%).

Para o sistema M1, foi verificado que as micropartículas apresentaram um teor de umidade semelhante ao do fármaco puro, variando entre 1,01% e 1,50%, respectivamente para as formulações M1R10 e M1R5. Valores de umidade, próximos aos materiais de partida, foram obtidos para as micropartículas do sistema M2, entre 1,09% (formulação M2R10) e 1,57% (formulação M2R0). Esses resultados indicam que o processo de secagem em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ foi efetivo na remoção da água empregada no processo de microencapsulação.

Tabela 4 – Teor de água* obtido para o resveratrol, para o PHBV, para a PCL e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2

Material	Umidade (%)
Resveratrol	1,20 \pm 0,12
PHBV	3,59 \pm 0,17
PCL	1,12 \pm 0,09
M1R0	1,29 \pm 0,11
M1R5	1,50 \pm 0,09
M1R10	1,10 \pm 0,08
M1R20	1,40 \pm 0,12
M2R0	1,57 \pm 0,13
M2R5	1,56 \pm 0,11
M2R10	1,09 \pm 0,08
M2R20	1,55 \pm 0,14

* média ($n = 3$) \pm desvio padrão

A quantidade de água residual nos pós tem grande influência sob a sua estabilidade física, ao mesmo tempo em que controla a magnitude das forças capilares responsáveis pela agregação das partículas (BOSQUILLON et al., 2004). Dessa forma, o teor de água tem relevância para prever possíveis alterações nos materiais elaborados. Considerando que os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma umidade reduzida, é possível estabelecer que essa água residual tenha pouca interferência na estabilidade física das micropartículas.

5.1.3 Determinação do resveratrol incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação

5.1.3.1 Validação do método analítico para a quantificação do resveratrol presente nas micropartículas dos sistemas M1 e M2

Considerando as três curvas analíticas elaboradas para a determinação quantitativa do resveratrol por CLAE, o estudo de linearidade revelou um valor de coeficiente de correlação (r) médio igual a 0,999805, indicando uma regressão linear significativa. A Figura 7 ilustra a curva analítica média obtida para quantificação do fármaco em solução etanólica, apresentando a equação da reta e o valor do r médio encontrado.

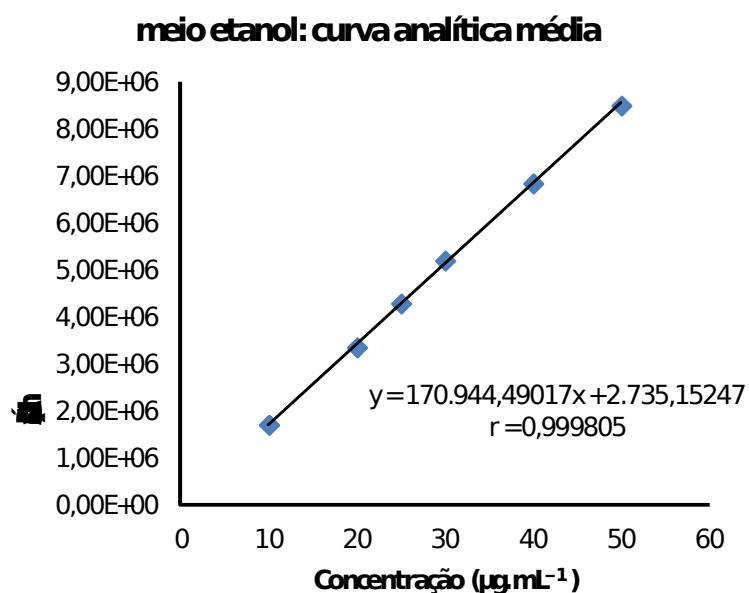


Figura 7 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do resveratrol obtida por CLAE ($\lambda = 306$ nm), em etanol

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 6 e 7, respectivamente. Os valores obtidos foram 172,18 ng.mL^{-1} para o limite de detecção e 521,76 ng.mL^{-1} para o limite de quantificação.

Os resultados de repetibilidade e de precisão intermediária, expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR), estão apresentados na Tabela 5. Para ambos os estudos, os valores de DPR foram inferiores a 5%,

demonstrando a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico empregado (ANVISA, 2003).

Tabela 5 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DPR dia 1 (%)	DPR dia 2 (%)	DPR dia 3 (%)	Média (%)
10	4,44			
30	0,51	1,99	0,52	1,01
50	0,94			

No que diz respeito à avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 99,99% para concentração final de 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 97,91% para 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 98,81% para 52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultando em uma percentagem média de recuperação de 97,48%, o que caracteriza o método como exato, segundo preceitos do ICH (1996) e da ANVISA (2003).

A robustez de um método analítico indica a capacidade do método desenvolvido em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, bem como sua confiabilidade durante o uso (ANVISA, 2003). As variações nos parâmetros de análise estabelecidos, fluxo, temperatura e tipo de coluna cromatográfica, apresentaram um DPR inferior a 5%, o que caracteriza o método como robusto.

5.1.3.2 Recuperação do resveratrol presente nas micropartículas

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg.g^{-1}) e a eficiência de encapsulação (%) para os sistemas M1 e M2 estão resumidas na Tabela 6. Todas as formulações apresentaram valores adequados de EE, superiores a 80%. Estes valores podem ser justificados, principalmente, devido à baixa solubilidade aquosa ($13,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ em $\text{pH} = 7,4$) do resveratrol (HUNG et al., 2007), que acarretou um aumento da concentração de fármaco no interior da micropartícula. Os resultados de eficiência de encapsulação foram, ainda, inversamente proporcionais à quantidade inicial de resveratrol utilizada, sendo que as micropartículas contendo 5% do ativo foram as que apresentaram os valores mais elevados de eficiência de encapsulação.

A relação entre o polímero e o fármaco é um fator crítico durante a formação de micropartículas e pode influenciar os valores de EE

(MAGHSOODI, 2009). A eficiência de encapsulação do resveratrol foi maior quando a quantidade de poliéster foi aumentada (Tabela 6). A EE para as micropartículas do sistema M1 aumentou de 80 para 93% quando a relação PHBV:resveratrol foi modificada de 4:1 (20% resveratrol) para 19:1 (5% resveratrol). A EE das micropartículas de PCL variaram de 88 para 101% quando a relação polímero:resveratrol foi alterada na mesma proporção. Esse efeito pode ser simplesmente devido à maior quantidade de polímero em relação à quantidade de fármaco adicionada, o que favoreceu a microencapsulação.

Das e Ng (2009), ao elaborar grânulos de cálcio-pectina contendo resveratrol pelo processo de geleificação iontoforética, verificaram valores de eficiência de encapsulação superiores a 97,5%. Kim et al. (2009) obtiveram nanopartículas de PCL, incorporando o resveratrol por emulsão simples e evaporação do solvente. Esses autores relataram valores de eficiência de encapsulação variando entre 78,3 e 91,4%, utilizando a PCL de $\overline{M}_w = 65.000$ g.mol⁻¹.

Tabela 6 – Teor¹ de resveratrol incorporado nas micropartículas de PHBV e de PCL (mg.g⁻¹) e eficiência de encapsulação² (EE, %)

Material	Resveratrol incorporado (mg.g ⁻¹)	EE (%)
M1R0	—	—
M1R5	46,43 ± 1,77	93
M1R10	83,80 ± 2,41	84
M1R20	159,30 ± 2,72	80
M2R0	—	—
M2R5	50,63 ± 1,61	101
M2R10	89,41 ± 2,03	89
M2R20	176,70 ± 2,55	88

¹média (n = 3) ± desvio padrão

²média (n = 3)

Peng et al. (2010) formulou microesferas de quitosana contendo resveratrol pelo método de emulsão, em presença de vanilina como agente de reticulação. Esses materiais foram obtidos com uma eficiência de encapsulação superior a 90%.

Dessa forma, as micropartículas dos sistemas M1 e M2 apresentaram valores condizentes com a literatura, considerando as características físico-químicas do ativo e o método de obtenção empregado.

5.1.4 Análises morfológicas e de superfície

Os resultados obtidos por MEV para o resveratrol e para os polímeros de partida estão indicados na Figura 8, sendo que as micrografias foram obtidas em aumento de 500 vezes. Foi observado que o fármaco (Figura 8a) apresentou uma morfologia cristalina. O PHBV (Figura 8b) revelou, antes da preparação das micropartículas, uma forma aglomerada sem estrutura definida. Os péletes de PCL, adquiridos do fornecedor Sigma-Aldrich, apresentaram uma superfície levemente irregular por MEV (Figura 8c).

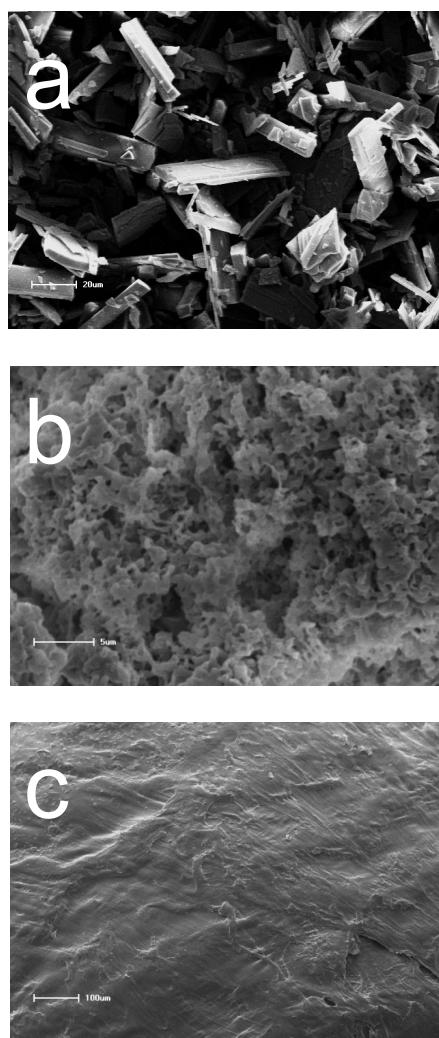


Figura 8 – Aspectos morfológicos do resveratrol puro (a), do PHBV (b) e da PCL (c) por MEV, aumento de 500 X

A avaliação por MEV das micropartículas do sistema M1 demonstrou formato esférico, com superfície rugosa (Figura 9). Os poros foram verificados, inclusive, na superfície das micropartículas M1R0 (Figura 9a), elaboradas como controle.

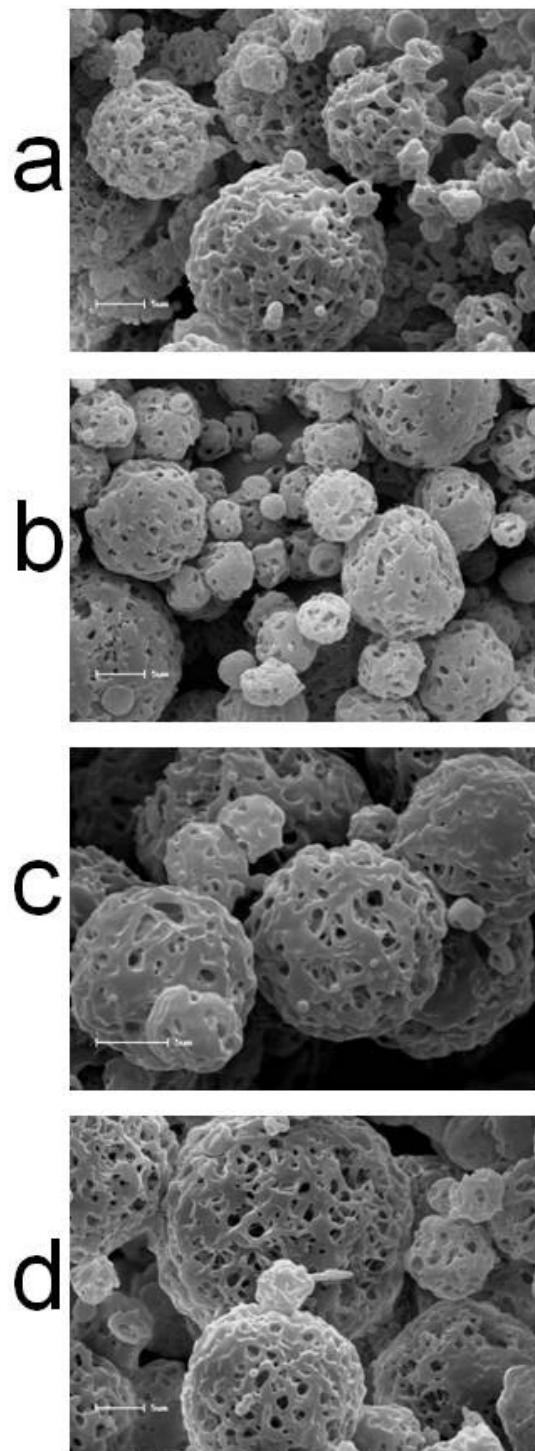


Figura 9 – Fotomicrografias das micropartículas do sistema M1 obtidas por MEV, aumento de 2000 X, M1R0 (a), M1R5 (b), M1R10 (c) e M1R20 (d)

A presença de poros representa uma importante evidência morfológica para essas micropartículas, o que pode modificar o processo de liberação de fármacos. Dados morfológicos similares foram fornecidos por Maia, Santana e Ré (2004), quando micropartículas de PHBV foram preparadas pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente. De acordo com a literatura, os poros podem ser decorrentes da natureza do poli-hidroxialcanoato utilizado e/ou resultantes da remoção rápida do solvente orgânico (FARAGO et al., 2004). A rugosidade observada, característica do PHBV puro pode favorecer a degradação do mesmo, pois proporciona um aumento na área superficial do polímero (MAIA, SANTANA, RÉ, 2004).

No entanto, para as micropartículas do sistema M2 foi observado um formato esférico, com superfície lisa e regular, sem a presença de poros (Figura 10). Com o aumento da concentração de resveratrol, alguns cristais de fármaco foram verificados na superfície dos materiais, o que pode ser constatado, particularmente, na formulação M2R20 (Figura 10d). Essa quantidade de fármaco encontrada na superfície das micropartículas, pode ser rapidamente dissolvida no meio aquoso e fornecer um comportamento de liberação imediata (efeito *burst*) (RIEKES et al., 2011). Esse efeito foi também observado em outros estudos relacionados a sistemas de liberação retardada utilizando biopolímeros (DUARTE et al., 2006; STULZER et al., 2008).

A ocorrência de cristais na superfície das micropartículas poliméricas pode ainda estar relacionada à baixa viscosidade da fase orgânica que, em função do volume de solvente empregado (40 mL), pode permitir a migração dos cristais para a interface da gotícula, durante a etapa de extração. Devido à insolubilidade do fármaco na fase externa aquosa, os cristais acabam permanecendo na interface até o enrijecimento da micropartícula. Esse fenômeno foi relatado anteriormente em estudos empregando o processo de emulsão/evaporação de solvente por Lionzo (2006), Gibaud, Bonneville, Astier (2002) e Binbaum et al. (2000).

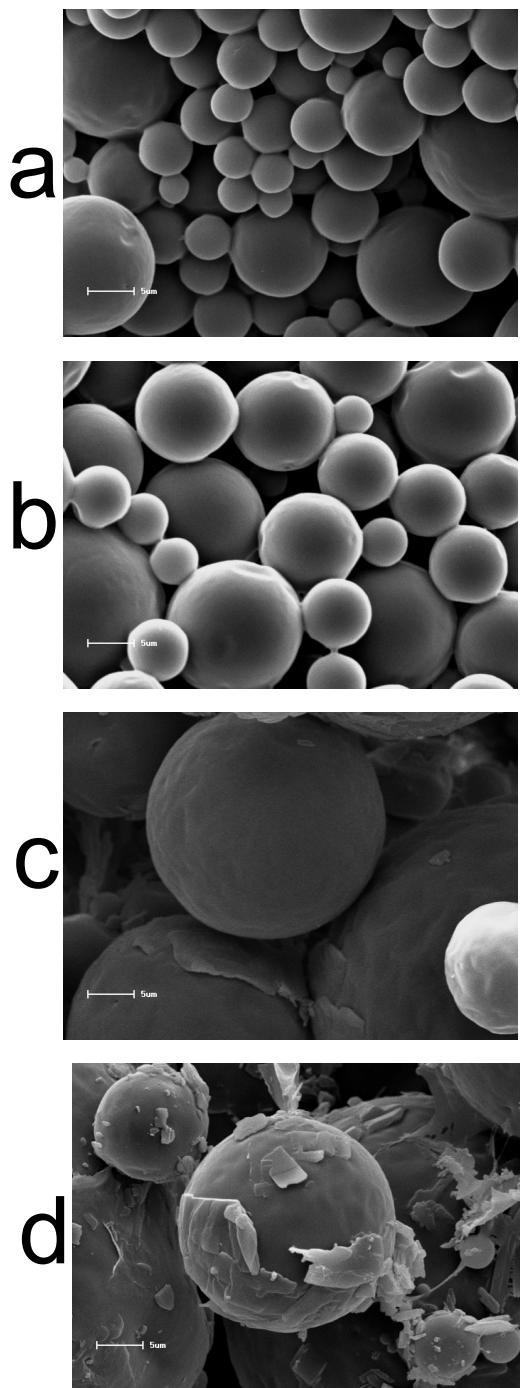


Figura 10 – Fotomicrografias das micropartículas do sistema M2 obtidas por MEV, aumento de 2000 X, M2R0 (a), M2R5 (b), M2R10 (c) e M2R20 (d)

As Figuras 11 e 12 sumarizam os resultados obtidos por difração de raio-X para o resveratrol puro, para o PHBV, para a PCL, para as respectivas misturas físicas e para as micropartículas do sistema M1 e M2. No caso do fármaco puro, foram verificados diferentes picos relacionados com a sua

estrutura cristalina, sendo que os picos principais aparecem em $2\theta = 6,62, 16,30, 19,17, 22,43, 23,55$ e $28,37$, enquanto que os polímeros de partida apresentaram um comportamento relativamente menos cristalino.

Os difratogramas das micropartículas que compõem o sistema M1 estão indicados na Figura 11. Para os materiais M1R5 e M1R10 foram verificados perfis de difração cristalina muito semelhantes ao PHBV puro, não sendo observados os picos de cristalinidade característicos do resveratrol, o que indica a dispersão do fármaco na matriz polimérica e é condizente com uma estrutura do tipo microesfera. No caso das partículas M1R20, foram registrados, embora em baixa intensidade, alguns picos de cristalinidade atribuídos ao resveratrol, o que pode indicar a presença de microdomínios do fármaco no material polimérico.

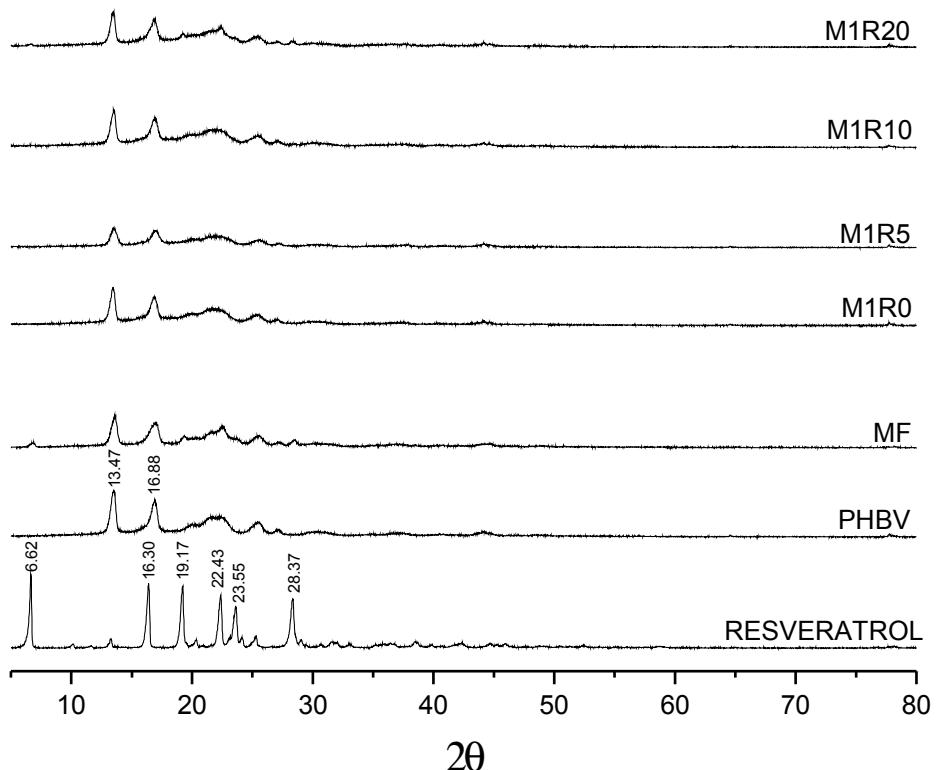


Figura 11 – Difratogramas do resveratrol puro, do PHBV, da mistura física PHBV:resveratrol e das micropartículas do sistema M1

Para as micropartículas do sistema M2 (Figura 12), foram observados perfis de difração cristalina semelhantes ao da PCL pura, denotando que o resveratrol apresentou um comportamento disperso no material polimérico, com redução expressiva de sua cristalinidade.

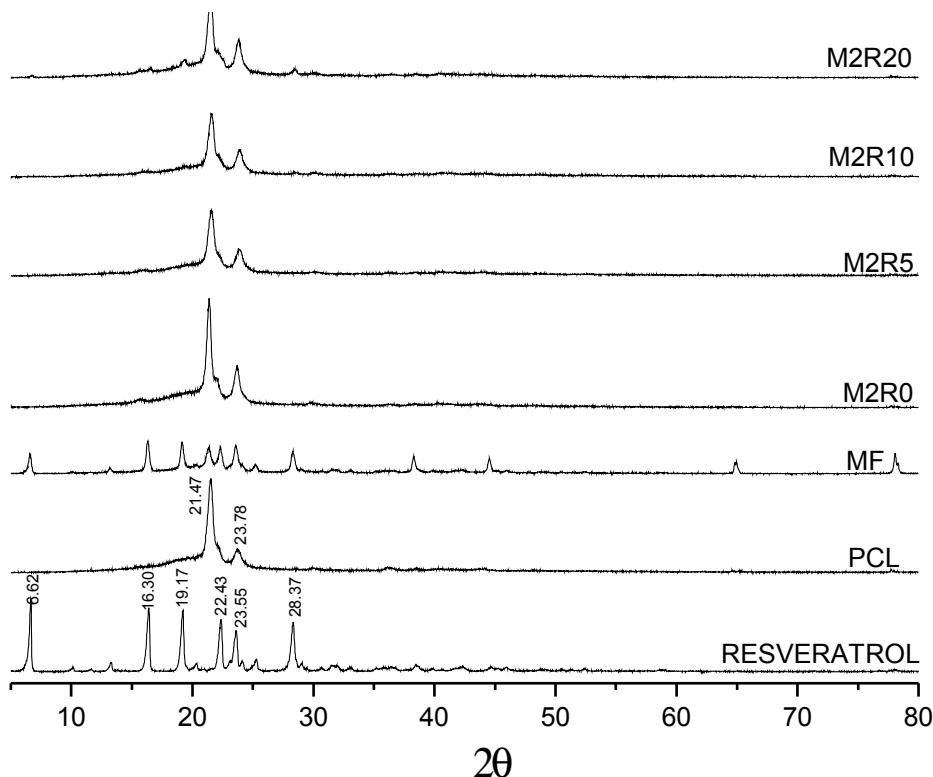


Figura 12 – Difratogramas do resveratrol puro, da PCL, da mistura física PCL:resveratrol e das micropartículas do sistema M2

Entretanto, para todos os materiais analisados, os resultados sugerem que o processo de microencapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos de difração cristalina característicos do resveratrol, levando à amorfização do fármaco (ANSARI et al., 2011).

Substâncias no estado sólido podem revelar características cristalinas e/ou amorfas. Em geral, os sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas, devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução. Sólidos no estado amorfóso têm moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, pouca energia é necessária para separá-los. Consequentemente, a sua dissolução é mais rápida do que quando na forma cristalina (RIEKES et al., 2011).

Resultados semelhantes foram obtidos por Ansari et al. (2011), ao formular nanoesponjas baseadas em ciclodextrinas para a liberação modificada de resveratrol.

5.1.5 Determinação do tamanho de partícula e da dispersão granulométrica

Os resultados de diâmetro médio e de *span* para as micropartículas poliméricas dos sistemas M1 e M2 estão apresentados na Tabela 7, sendo que as distribuições granulométricas estão demonstradas nas Figuras 13 e 14.

Para o sistema M1, a análise por espectroscopia de difração a laser indicou a presença de micropartículas poliméricas com diâmetro médio entre 25,23 μm (formulação M1R0) e 47,00 μm (formulação M1R5). As micropartículas do sistema M2 mostraram diâmetros médios variando de 33,97 μm (controle negativo) a 55,73 μm (formulação M2R20). Esses resultados indicam tamanhos de partícula superiores aos observados por MEV, o que pode ser justificado pela leitura de agregados de micropartículas quando da avaliação por espectroscopia de difração a laser.

Todas as formulações preparadas apresentaram valores de diâmetro médio inferiores a 60 μm e, embora esse tamanho de partícula não permita uma absorção pelos enterócitos, a administração oral dessas micropartículas pode proporcionar um efeito sustentado do fármaco, devido ao seu tempo prolongado de trânsito intestinal (DESAI et al., 1996).

Tabela 7 – Diâmetro médio e *span*¹ (dispersão granulométrica) para as micropartículas, indicando o teor² de resveratrol incorporado em cada material

Formulação	Resveratrol incorporado ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Diâmetro médio (μm)	Span
M1R0	—	25,23	2,38
M1R5	46,43 \pm 1,77	47,00	1,88
M1R10	83,80 \pm 2,41	33,75	2,25
M1R20	159,30 \pm 2,72	29,20	2,27
M2R0	—	33,97	1,33
M2R5	50,63 \pm 1,61	52,09	1,27
M2R10	89,41 \pm 2,03	52,84	1,37
M2R20	176,70 \pm 2,55	55,73	1,76

¹ calculado a partir do diâmetro das partículas correspondente a 90 %, 10 % e 50 % da distribuição acumulada para cada amostra

² média ($n = 3$) \pm desvio padrão

Com relação aos valores de *span*, a formulação M1R5 e os materiais do sistema M2 revelaram valores inferiores a 2, o que representa uma estreita dispersão em função da proximidade dos dados em torno da média. Dessa forma, as micropartículas formuladas a partir da PCL apresentaram um

comportamento monomodal mais adequado do que os materiais obtidos a partir do PHBV.

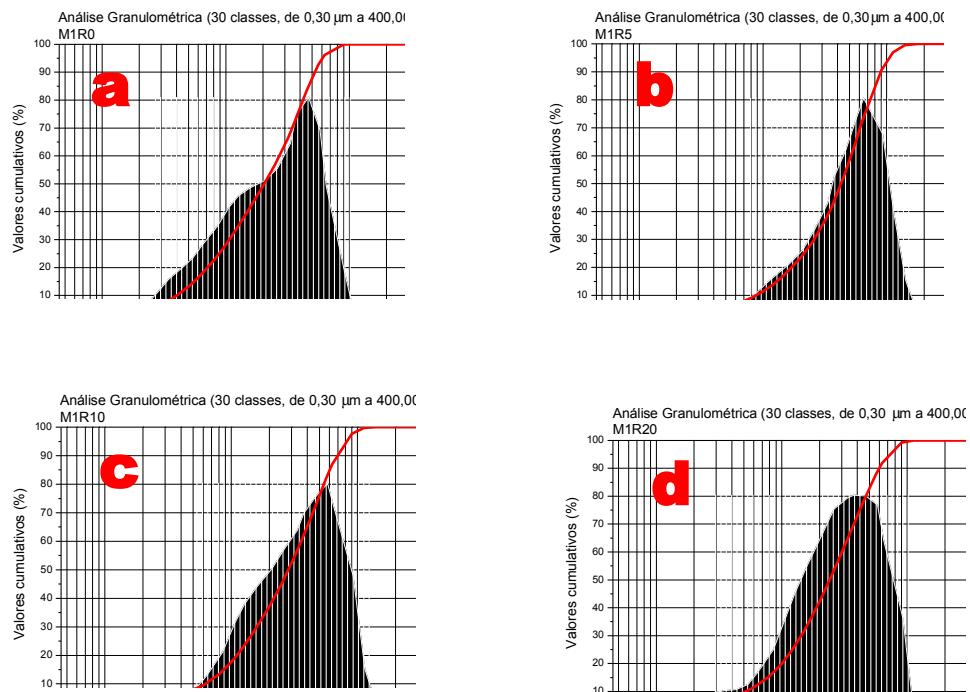


Figura 13 – Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas do sistema M1, M1R0 (a), M1R5 (b), M1R10 (c), M1R20 (d)

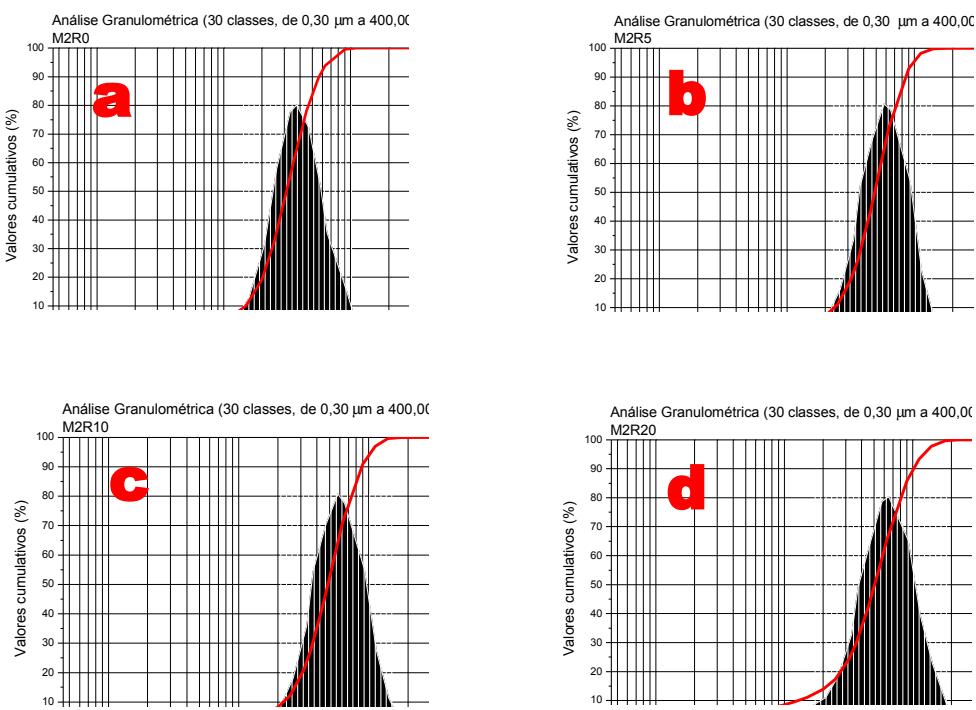


Figura 14 – Distribuição granulométrica obtida para as micropartículas do sistema M2, M2R0 (a), M2R5 (b), M2R10 (c), M2R20 (d)

Peng et al. (2010) obtiveram microesferas de quitosana contendo resveratrol com diâmetros médios de partícula entre 53 e 311 μm , a partir da reação de reticulação em presença de vanilina. Esses valores são superiores aos observados no presente trabalho, o que pode ser atribuído às diferenças entre os métodos de microencapsulação.

5.1.6 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de IVTF do sistema M1 e do sistema M2 estão mostrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. O espectro de IVTF do resveratrol puro indicou uma banda típica referente à vibração de deformação axial do grupamento OH em 3257 cm^{-1} e três bandas intensas e características em 1610, 1589, 1385 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de deformação axial das ligações duplas aromáticas, de C–C e de C–O. A banda típica dos carbonos olefínicos *trans* foi observada em 965 cm^{-1} (SHI et al., 2008).

O espectro infravermelho do PHBV exibiu uma banda forte em 1720 cm^{-1} devido ao estiramento do grupamento C=O. Bandas típicas de $800\text{--}975\text{ cm}^{-1}$ foram correspondentes à vibração de estiramento simétrico de –C–O–C–. Além disso, o estiramento antisimétrico de –C–O–C– conduziu a formação de bandas entre 1060 e 1150 cm^{-1} (MAGHSOODI, 2009). Considerando que a PCL também é um poliéster alifático, seu espectro foi semelhante ao do PHBV com uma banda forte em 1727 cm^{-1} , correspondente a vibração de deformação axial do grupamento C=O e duas bandas em 2943 e 2864 cm^{-1} , devido as vibrações simétricas e assimétricas do grupamento –CH₂, respectivamente (POLETTO et al., 2007).

Os espectros obtidos para as micropartículas de PHBV e de PCL apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para as respectivas misturas físicas. Portanto, é possível estabelecer que nenhuma ligação química entre o fármaco e os polímeros foi formada durante o processo de microencapsulação.

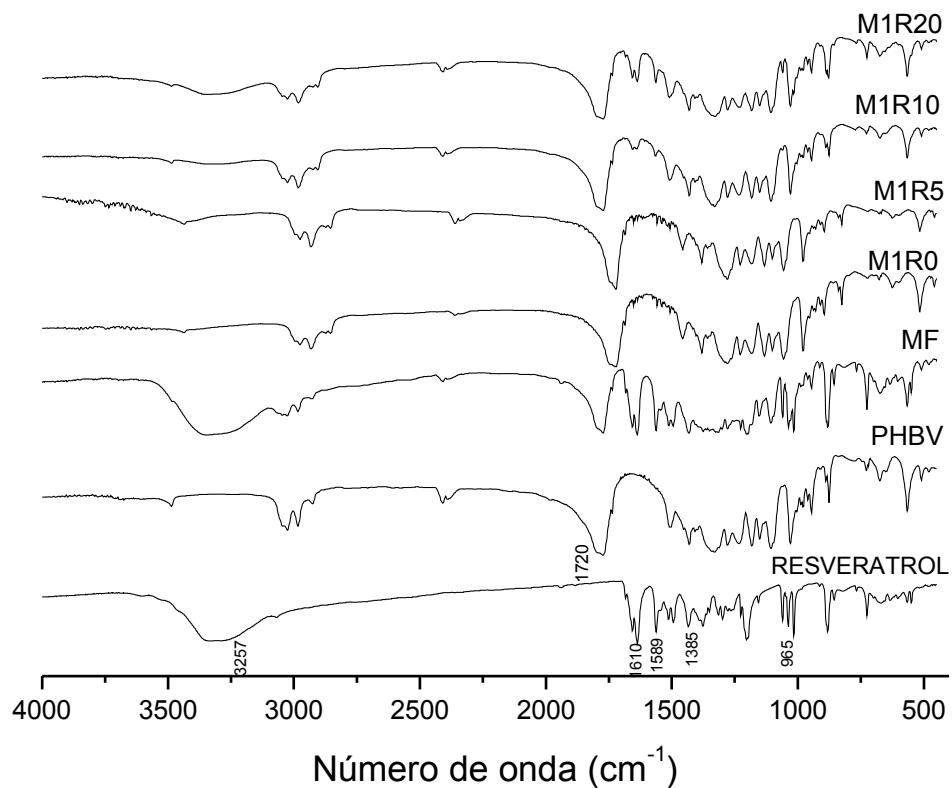


Figura 15 – Espectros IVTF do resveratrol, do PHBV, da mistura física e das micropartículas M1R0, M1R5, M1R10 e M1R20

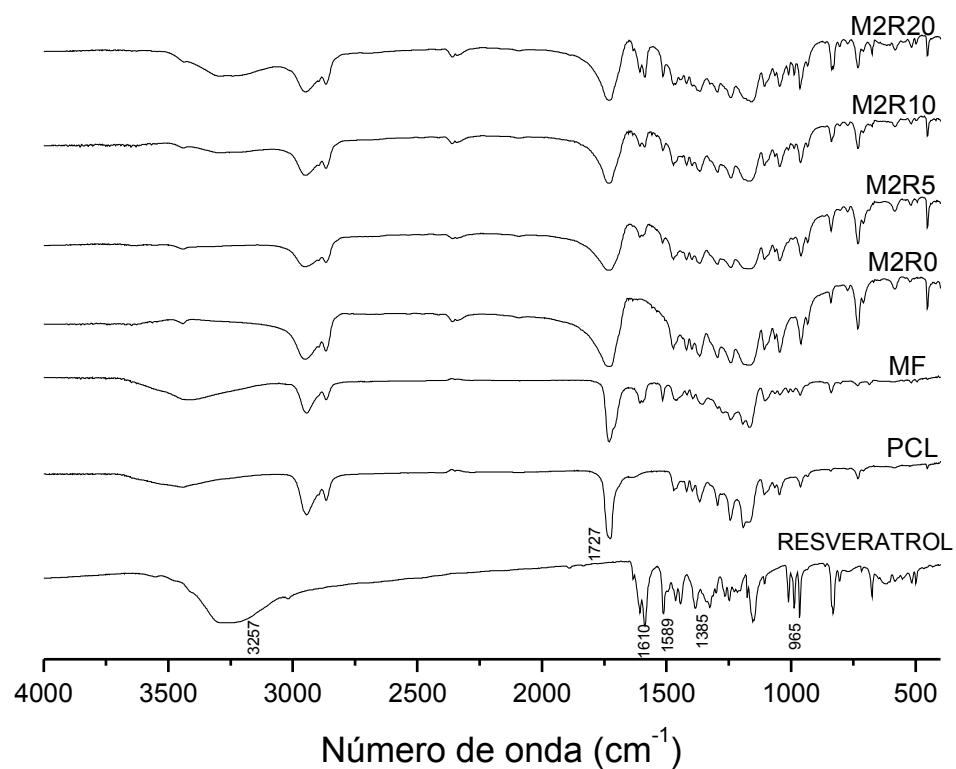


Figura 16 – Espectros IVTF do resveratrol, da PCL, da mistura física e das micropartículas M2R0, M2R5, M2R10 e M2R20

5.1.7 Análise térmica

As curvas de ATG obtidas para o resveratrol, para os polímeros de partida, para as misturas físicas e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2 estão representadas nas Figuras 17 e 18.

O resveratrol apresentou dois eventos de perda de massa que pode ser observado por meio de sua curva termogravimétrica derivada (DTG). O primeiro, verificado na região entre 625 K e 758 K ($\Delta m = 41,7\%$) e o segundo, na região compreendida entre 758 K e 1150 K ($\Delta m = 57,5\%$). As curvas de ATG dos polímeros de partida apresentam um único evento de perda de massa, nas faixas de temperatura de 564 a 591 K ($\Delta m = 97,6\%$) para o PHBV, e entre 639 e 734 K ($\Delta m = 97,7\%$) para a PCL.

As micropartículas do sistema M1 apresentaram eventos de degradação térmica iniciando em 585, 581, 577 e 582 K para M1R0, M1R5, M1R10 e M1R20, respectivamente, enquanto que, as formulações do sistema M2 iniciaram a sua degradação térmica em 671 K (M2R0), 689 K (M2R5), 686 K (M2R10) e 683 K (M2R20). Esses resultados indicam que as micropartículas de PCL são termicamente mais estáveis do que as de PHBV. Dados semelhantes foram descritos anteriormente para micropartículas de carvedilol, em que as formulações contendo PCL revelaram uma melhora da estabilidade térmica, quando comparadas com as formulações preparadas com PHBV (RIEKES et al., 2011).

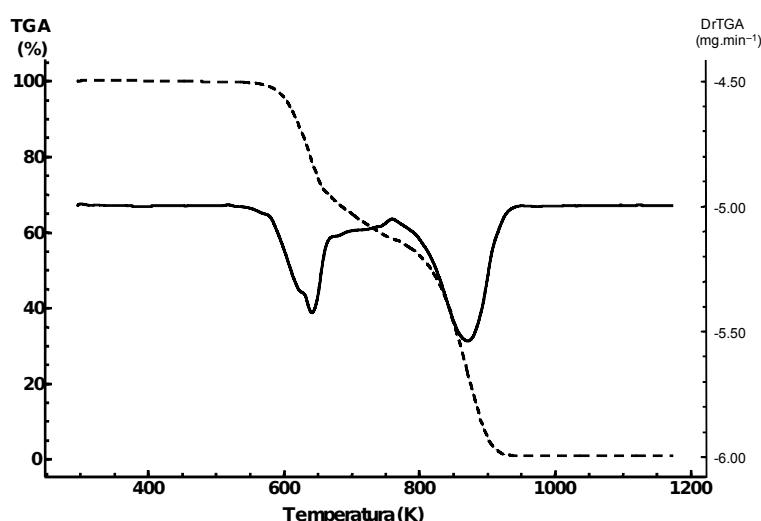


Figura 17 – Curvas de ATG e DTG do resveratrol

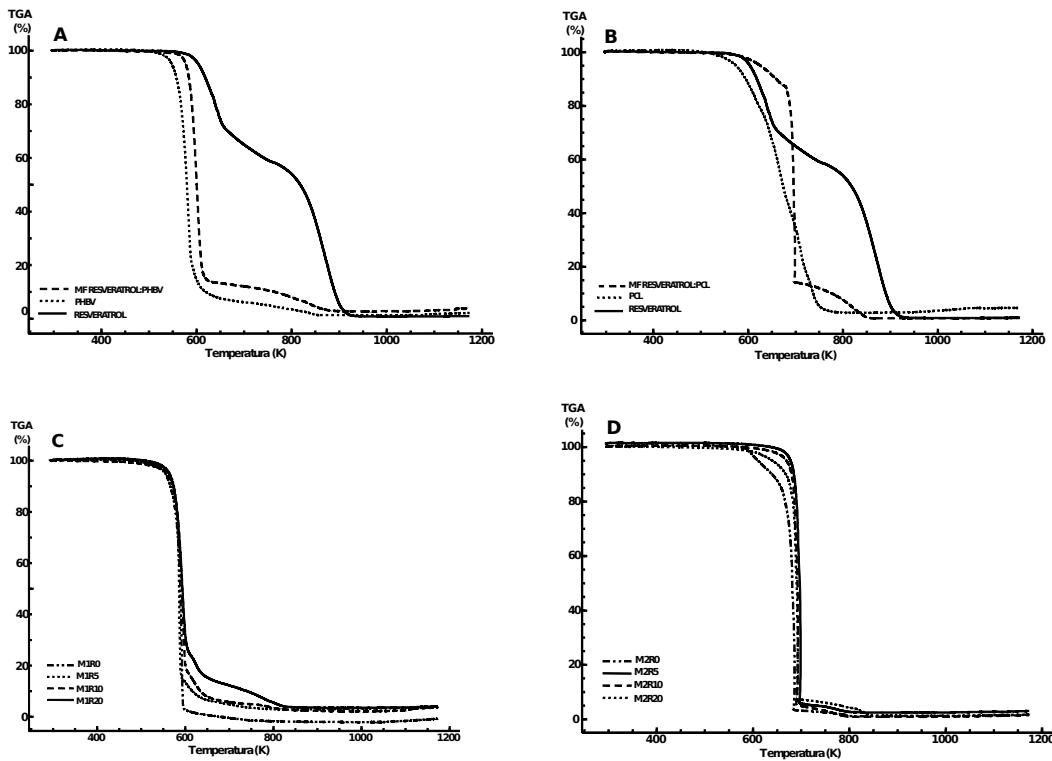


Figura 18 – Curvas de ATG do resveratrol (A,B), do PHBV (A), da PCL (B), da mistura física PHBV:resveratrol (A), da mistura física PCL:resveratrol (B), das micropartículas do sistema M1 (C) e das micropartículas do sistema M2 (D)

Os termogramas do resveratrol, dos polímeros de partida, das misturas físicas e das micropartículas dos sistemas M1 e M2, avaliados por CED, estão mostrados na Figura 19.

Para o resveratrol puro, foi observado um único evento térmico de fusão em 539 K, resultado condizente com o especificado na literatura para esse fármaco (SUN, SHAO, YAN, 2008; KIM et al., 2011).

As temperaturas de fusão (T_m) obtidas para os polímeros de partida foram 438 K para o PHBV e 333 K para a PCL, confirmando os dados previamente relatados (POLETTI et al., 2007). Tanto para as micropartículas do sistema M1, quanto para as micropartículas do sistema M2, foi observado o desaparecimento do evento térmico de fusão característico do fármaco. Este comportamento térmico sugere que ocorreu uma amorfização do fármaco. Esses dados estão de acordo com os verificados anteriormente por difração de raio-X, em que os picos cristalinos característicos dos polímeros foram evidenciados nos materiais microparticulados.

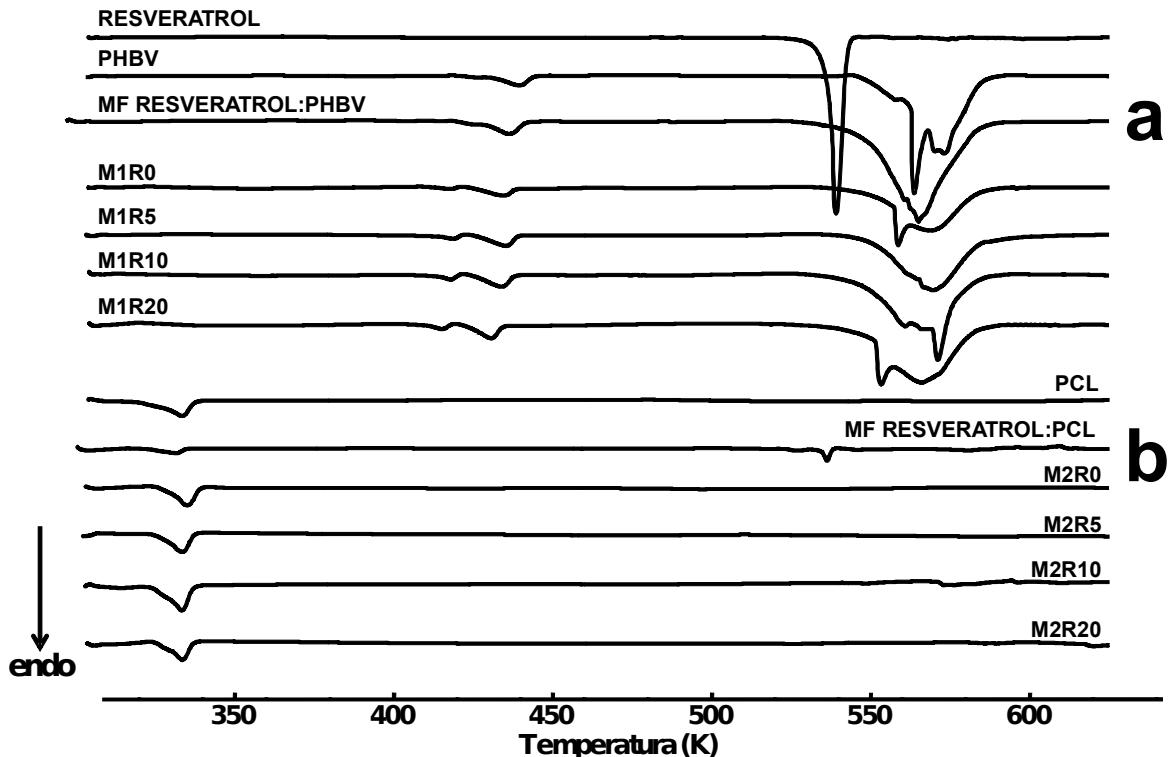


Figura 19 – Termogramas obtidos por CED do resveratrol (a,b), do PHBV (a), da PCL (b), da mistura física PHBV:resveratrol (a), da mistura física PCL:resveratrol (b), das micropartículas do sistema M1 (a) e das micropartículas do sistema M2 (b)

5.1.8 Estudo de liberação *in vitro*

Os perfis de liberação obtidos para o resveratrol puro e para as micropartículas poliméricas dos sistemas M1 e M2 estão apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Quando da avaliação do fármaco puro, uma liberação de 80% foi obtida em 45 min. Entretanto, as formulações do sistema M1 demonstraram a liberação de 80% do resveratrol contido nas micropartículas nos tempos médios de 300 min (M1R5), 240 min (M1R10) e 90 min (M1R20). Ao se analisar os materiais do sistema M2, um valor de 80% de liberação do resveratrol foi atingido nos tempos médios de 720, 300 e 180 min, para as micropartículas M2R5, M2R10 e M2R20, respectivamente.

Dessa forma, esses resultados demonstraram que ambos os sistemas foram efetivos em promover uma taxa de dissolução mais lenta do que a do fármaco puro. No entanto, em uma análise comparativa, as micropartículas de PCL apresentaram uma taxa de liberação mais lenta do resveratrol que os materiais desenvolvidos a partir do PHBV, sendo que, a relação polímero:fármaco e os aspectos morfológicos das micropartículas obtidas afetaram os perfis de dissolução.

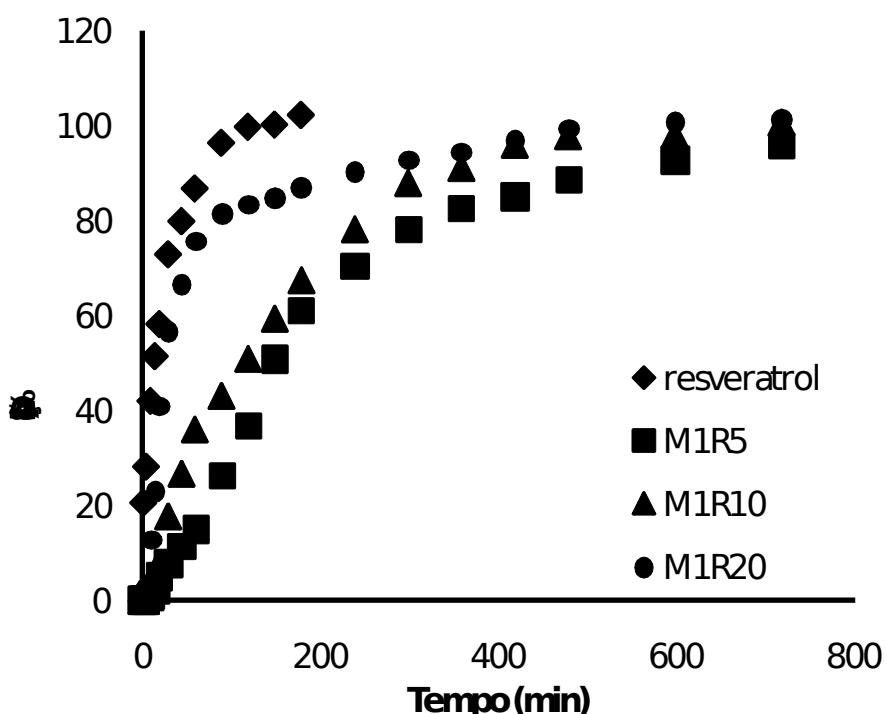


Figura 20 – Perfil de liberação *in vitro* do fármaco puro e das micropartículas do sistema M1

Para ambos os sistemas, as formulações obtidas na relação polímero:fármaco de 19:1 (5% de resveratrol) demonstraram uma dissolução mais lenta do resveratrol. Provavelmente, a maior quantidade de poliéster presente nessas formulações proporcionou um melhor efeito no controle da taxa de dissolução do fármaco. A mais rápida liberação do resveratrol que ocorreu nas micropartículas do sistema M1 pode também ser relacionada com a sua superfície porosa observada anteriormente por MEV. Geralmente, os estudos de micropartículas demonstram que a taxa de dissolução do fármaco é

mais rápida para materiais que apresentam maior porosidade (POLETTI et al., 2007).

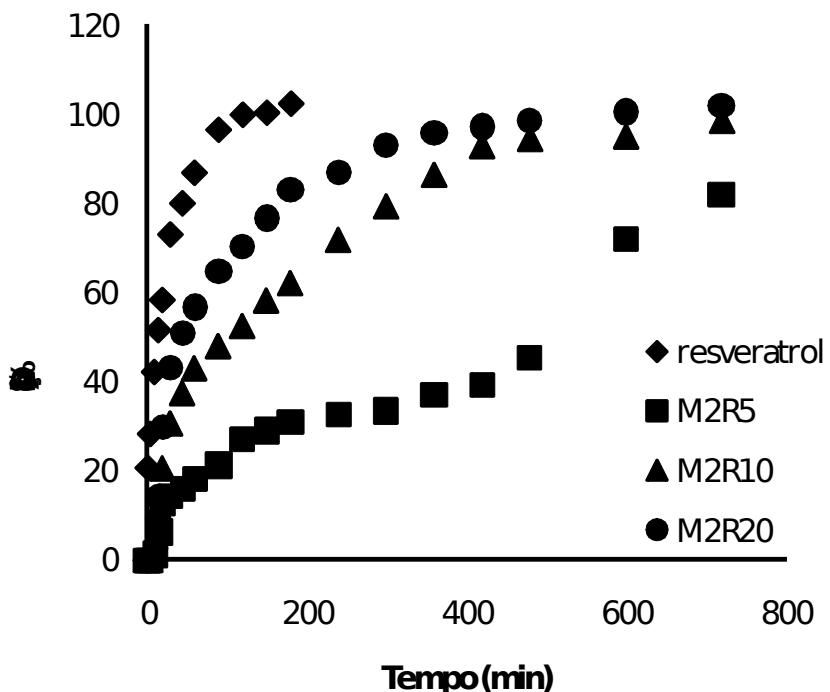


Figura 21 – Perfil de liberação *in vitro* do fármaco puro e das micropartículas do sistema M2

Considerando a Equação 6, a eficiência de dissolução do resveratrol puro, avaliada no tempo final de 720 min, foi de 96,23%. As formulações do sistema M1 apresentaram valores de eficiência de dissolução de 73,26% (M1R5), 78,61% (M1R10) e 88,92% (M1R20). Enquanto que as micropartículas do sistema M2 demonstraram resultados de eficiência de dissolução de 52,25, 78,00 e 84,99%, respectivamente para os materiais M2R5, M2R10 e M2R20. A literatura (FORTUNATO et al., 2007) relata que valores elevados de eficiência de dissolução são verificados para formas farmacêuticas de liberação imediata. Dessa forma, os materiais poliméricos utilizados acarretaram uma redução do valor da eficiência de dissolução do resveratrol, sendo estratégias interessantes para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo prolongada.

Os modelos matemáticos, representados pelas Equações de 7 a 10, foram aplicados aos perfis de liberação do fármaco puro e das micropartículas dos sistemas M1 e M2, empregando o software MicroMath Scientist®. A seleção do melhor modelo foi realizada, considerando os dados obtidos para o coeficiente de correlação (r) e para o critério de seleção do modelo (MSC). Ainda assim, foi analisada a coerência dos valores encontrados para as constantes cinéticas de liberação e o ajuste gráfico verificado para cada equação.

Os perfis de liberação do resveratrol e das micropartículas dos sistemas M1 e M2 revelaram um melhor ajuste dos dados experimentais para o modelo biexponencial (Tabela 8), em relação aos outros modelos matemáticos avaliados. Dessa forma, é possível estabelecer que o comportamento de liberação do fármaco a partir das micropartículas tem sua descrição orientada por duas constantes de liberação, a α ou constante cinética da etapa rápida de liberação e a β , constante cinética verificada na etapa lenta de liberação.

Tabela 8 – Resultados da modelagem matemática pela equação biexponencial para o resveratrol puro e para as micropartículas dos sistemas M1 e M2

Material	Modelo biexponencial			
	MSC	R	α (min$^{-1}$)	β (min$^{-1}$)
Resveratrol puro	5,45	0,9988	0,9902	0,8262
Sistema M1				
M1R5	5,30	0,9984	0,0357	0,0054
M1R10	5,23	0,9982	0,0082	0,0082
M1R20	4,26	0,9953	0,0360	0,0042
Sistema M2				
M2R5	2,18	0,9616	0,0693	0,0014
M2R10	4,32	0,9956	0,0465	0,0044
M2R20	4,18	0,9949	0,0363	0,0066

Esses resultados demonstraram que as micropartículas de PHBV e de PCL prolongaram a liberação do resveratrol, no entanto, sem alterar o modelo de liberação. A primeira etapa da liberação foi inicialmente rápida (efeito *burst*), enquanto que a segunda etapa foi lenta (liberação controlada). Essa liberação inicial pode ajudar a atingir rapidamente uma concentração adequada de resveratrol no plasma, enquanto a liberação controlada pode manter uma concentração efetiva do fármaco no plasma por um período mais longo (PENG

et al., 2010). Com isso, a baixa biodisponibilidade do resveratrol devido ao seu rápido metabolismo e eliminação pode ser parcialmente evitada pelo processo de microencapsulação, prolongando assim a sua meia-vida biológica *in vivo*.

Aplicando o modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 11), as micropartículas do sistema M1 revelaram valores de n de 1,23 (M1R5), 0,89 (M1R10) e 1,28 (M1R20). Para o sistema M2, foram obtidos valores de n de 0,65, 0,57 e 0,73 para os materiais M2R5, M2R10 e M2R20, respectivamente.

Valores de n superiores a 0,85, como observados para as formulações do sistema M1, estão relacionados à erosão do material polimérico e ainda, no caso de polímeros insolúveis como o PHBV, à entrada do fronte do solvente na estrutura das micropartículas, com a dissolução do fármaco e formação de poros, o que favorece a sua remoção ao meio externo (SIEPMANN, PEPPAS, 2001). As formulações que compõem o sistema M2 mostraram valores de n entre 0,43 e 0,85, indicando que o mecanismo de liberação do fármaco ocorre por um transporte anômalo (SIEPMANN, PEPPAS, 2001), no qual existe a sobreposição dos eventos de difusão fickiana do bioativo e da entrada do fronte de solvente na estrutura dos produtos microparticulados.

5.1.9 Estudo do potencial antioxidante

Para verificar se o processo de microencapsulação tem influência na capacidade antioxidante do resveratrol, o ensaio de inibição do ácido hipocloroso (HOCl) e a descoloração do radical catiônico ABTS^{•+} foram avaliadas.

O potencial antioxidante do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL pela inibição do HOCl são apresentados na Figura 22. O resveratrol puro ($IC_{50} = 0,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou um maior efeito de inativação do HOCl, seguido pelas micropartículas M1R20 ($IC_{50} = 3,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e M2R20 ($IC_{50} = 9,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em sistemas biológicos, o HOCl é o agente oxidante mais tóxico e abundante produzido por neutrófilos. Ele também pode atacar moléculas importantes e gerar outras EROs que são altamente prejudiciais.

Os resultados do teste de descoloração do ABTS^{•+} estão mostrados na Figura 23. Considerando a inibição do ABTS^{•+}, uma maior atividade foi obtida para o resveratrol puro ($IC_{50} = 2,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e para as micropartículas M1R20 ($IC_{50} = 11,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Um valor de $IC_{50} = 21,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observado para a

formulação M2R20. Esse ensaio é amplamente utilizado para a triagem das propriedades antioxidantes de compostos orgânicos, e reflete a capacidade da molécula em doar elétrons ou hidrogênio para inativar o radical.

Nas concentrações estudadas, o resveratrol puro e as micropartículas de PHBV e de PCL demonstraram diferenças na capacidade antioxidant. Esses resultados sugerem que a microencapsulação pelo método de emulsão simples/evaporação do solvente tem influência sobre o potencial antioxidant do resveratrol. Em ambos os ensaios, as micropartículas sem o fármaco apresentaram um efeito antioxidant insignificante.

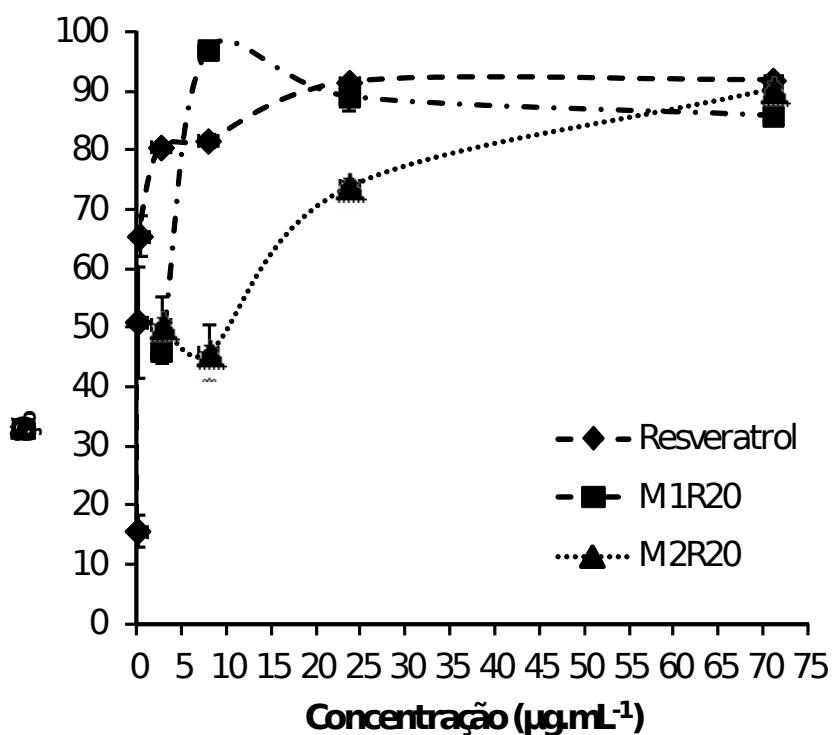


Figura 22 – Efeito antioxidant do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL pela inibição do HOCl

Os resultados verificados para a atividade antioxidant podem estar fortemente relacionados com a morfologia e com a cinética de dissolução do resveratrol presente nas micropartículas de PHBV e de PCL. As micropartículas preparadas a partir do PHBV apresentaram uma superfície porosa, a qual pode oferecer uma liberação mais rápida do resveratrol quando

comparada com as micropartículas de PCL. Esse aspecto poroso também pode permitir um melhor acesso das espécies oxidantes ao interior das micropartículas de PHBV. Estes valores obtidos para o potencial antioxidante estão de acordo com os perfis de liberação *in vitro*, nos quais as micropartículas de PCL revelaram uma taxa de dissolução mais lenta.

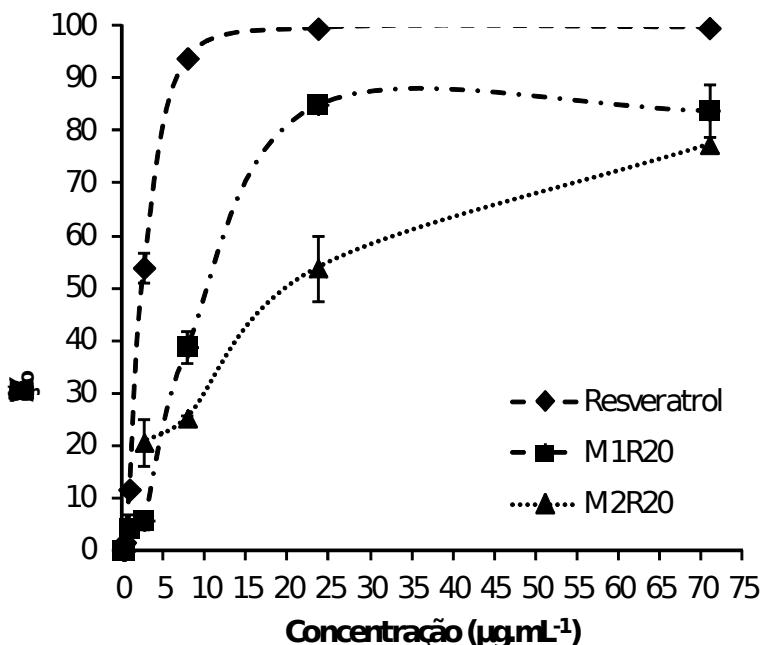


Figura 23 – Efeito antioxidante do resveratrol puro e das micropartículas de PHBV e de PCL pela descoloração do radical catiônico ABTS^{•+}

Dados diferentes foram previamente relatados para complexos de inclusão entre o *trans*-resveratrol e a β -ciclodextrina ou a hidroxipropil- β -ciclodextrina, que mostraram pequenas diferenças na capacidade sequestrante contra o oxidante DPPH[•] (LU et al., 2009). Por outro lado, a atividade antioxidante foi reduzida quando da preparação de uma emulsão lipídica e de um sistema micelar aquoso, contendo resveratrol (HUNG et al., 2007).

Assim, é possível sugerir que as micropartículas de PHBV e de PCL contendo resveratrol oferecem um sistema viável para controlar a liberação desse fármaco, devido à manutenção do seu efeito antioxidante e que esse potencial é dependente da morfologia das micropartículas e do perfil de dissolução.

5.1.10 Atividade citotóxica *in vitro* sobre hemácias

O ensaio de hemólise é um procedimento rápido, eficiente, simples e de baixo custo para investigar a citotoxicidade de micro/nanopartículas na membrana de eritrócitos por quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada (CÓTICA et al., 2012). Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade estão apresentados na Figura 24. Em relação aos valores de hemólise, o resveratrol puro e as micropartículas de PHBV e de PCL não apresentaram diferenças significativas em relação ao branco ($p > 0,05$). Esses dados indicam que o fármaco puro e as micropartículas de PHBV e de PCL apresentam compatibilidade com os eritrócitos. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada apenas entre o resveratrol e a formulação M1R0 ($p = 0,0467$), o que pode estar relacionada às diferenças de estrutura química e de massa molar dessas substâncias.

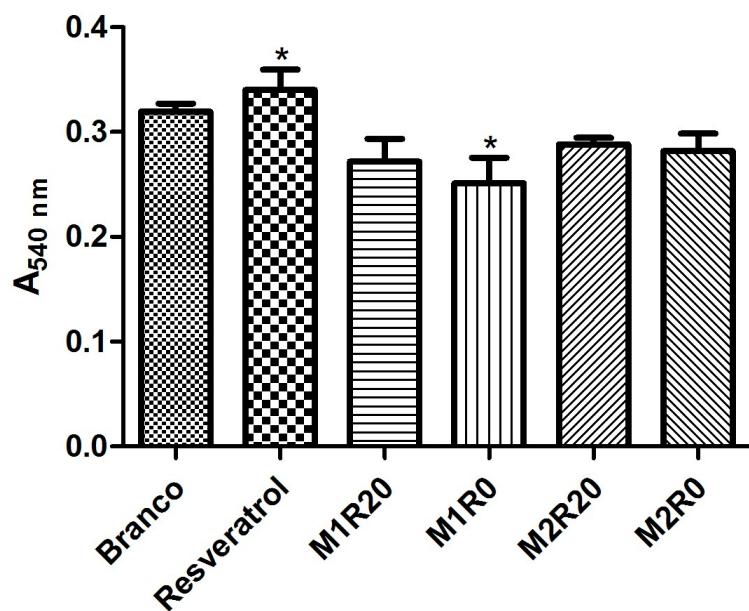


Figura 24 – Valores de absorvância resultante da hemoglobina liberada no ensaio de hemólise para o branco, para o resveratrol puro e para as micropartículas de PHBV e de PCL (* diferença estatisticamente significativa, $p = 0,0467$)

De acordo com a literatura, o resveratrol não apresenta nenhum efeito hemolítico nos eritrócitos até a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (JUNG, SEU, LEE, 2007). No entanto, nenhum trabalho anterior realizou ensaios de hemólise

em micropartículas de PHBV e de PCL contendo resveratrol. Portanto, os resultados do presente trabalho de citotoxicidade demonstram que as micropartículas de poliéster obtidas não têm propriedades hemolíticas nos eritrócitos, indicando a viabilidade de seu potencial para aplicações farmacêuticas e/ou biotecnológicas.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, micropartículas contendo resveratrol, formuladas a partir do PHBV (sistema M1) e da PCL (sistema M2), foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico.

Valores elevados de eficiência de encapsulação foram obtidos para os dois sistemas poliméricos. Diferenças morfológicas e de tamanho de partícula foram verificadas entre o sistema M1 e o sistema M2. Os espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho indicaram que nenhuma ligação química entre o resveratrol e os polímeros foi formada durante o processo de microencapsulação. Os ensaios efetuados por difração de raio-X e de calorimetria exploratória diferencial demonstraram que o processo de microencapsulação conduziu a uma amorfização do fármaco. Essas características desempenharam um papel decisivo na cinética de liberação do fármaco. As micropartículas preparadas a partir do PHBV e da PCL proporcionaram uma diminuição substancial na taxa de dissolução de resveratrol, sem alterar o modelo biexponencial de liberação. O potencial antioxidante do resveratrol presente no interior das micropartículas de PHBV e de PCL foi mantido, mas dependente da morfologia das micropartículas e do perfil de dissolução. As micropartículas de PHBV e de PCL não mostraram efeitos citotóxicos sobre os eritrócitos.

Assim, é possível sugerir que as micropartículas poliméricas elaboradas com os polímeros biodegradáveis PHBV e PCL apresentam as condições adequadas para o controle da liberação do resveratrol, sendo uma alternativa interessante para melhorar a biodisponibilidade do fármaco.

As formulações desenvolvidas têm ainda, viabilidade como sistemas de liberação controlada por via oral, sendo alternativas atraentes na prevenção de doenças crônicas como, por exemplo, câncer, diabetes, hipertensão e envelhecimento.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

AHMAD, M.; MADNI, A.; USMAN, M.; MUNIR, A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology** v. 75, p. 384-387, 2011.

AL HAUSHEY, L.; BOLZINGER, M. A.; BORDES, C.; GAUVRIT, J. Y.; BRIANCON, S. Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 16-25, 2007.

AMASS, W.; AMASS, A. E., TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymer and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International** v. 47, p. 89-144, 1998.

ANSARI, K. A.; VAVIA, P. R.; TROTTA, F.; CAVALLI, R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: *in vitro* characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. **American Association of Pharmaceutical Scientists** v. 12, n. 1, p. 279-286, 2011.

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

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions** v. 174, p. 134-139, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** v. 26, p. 113-123, 2006.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 5, p. 493-506, 2006.

BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. **Microparticle drug delivery systems**. In: BROWN, D.M. (ed.) *Drug delivery systems in cancer therapy*. Totowa: Humana Press, p. 117-135, 2003.

BIRNBAUM, D. T.; KOSMALA, J. D.; HENTHORN, D. B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of b-estradiol from PLAGA microparticles: the effect of organic solvent on encapsulation and release. **Journal of Controlled Release** v. 65, p. 375-387, 2000.

BOSQUILLON, C.; ROUXHET P. G.; AHIMOU, F.; SIMON, D.; CULOT, C.; PRÉAT, V.; VANBEVER, R. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. **Journal of Controlled Release** v. 99, p. 357-367, 2004.

CANEVAROLO JR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

CHAKRAPANI, A. **Processing and characterization of polymer microparticles for controlled drug delivery systems**. 92 p. Doutorado em Filosofia, The Ohio State University, Columbus, 2006.

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation** v. 19, n. 2, p. 191-201, 2002.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews** v. 38, p. 2434-2446, 2009.

CÓTICA, L. F.; FREITAS, V. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; VENDRAME, S. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M.; STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 324, p. 559-563, 2012.

DAS, S.; NG, K. Y. Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 99, n. 2, p. 840-860, 2009.

DAS, S.; NG, K. Y.; HO, P. C. Formulation and optimization of zinc-pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. **American Association of Pharmaceutical Scientists** v. 11, n. 2, p. 729-741, 2010.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. **Pharmaceutical Research** v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DUARTE, M. A. T.; HUGEN, R. G.; MARTINS, E. S.; PEZZIN, A. P. T.; PEZZIN, S. H. Thermal and mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ϵ -caprolactone) blends. **Materials Research** v. 9, n. 1, p. 25-27, 2006.

DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology and Medicine** v. 39, p. 1468-1477, 2005.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**. 345 p. Livre-docênciа em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

FARAGO, P. V.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; ZAWADZKI, S. F. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. **Journal of Brazilian Chemical Society** v. 19, n. 7, p. 1298-1305, 2008.

FORTUNATO, K. A.; DOILE, M. M.; SCHMÜCKER, I. C.; SCHUCKO, S. K.; SILVA, M. A. S.; RODRIGUES, P. O. Influência da complexação com β -ciclodextrina sobre a liberação do acetato de dexametasona a partir de matrizes hidrofílicas de hidroxipropilmetylcelulose (HPMC) e polioxetileno (PEO) **Latin American Journal of Pharmacy** v. 26, p. 513-521, 2007.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; SILVA, T. da; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of *trans*-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology** v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology** v.197, p. 211-217, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International** v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **International Journal of Pharmaceutics** v. 242, p. 197-201, 2002.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Uniderp, 2005.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: An overview. **STP Pharma Sciences** v. 5, p. 276-290, 1995.

GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; SOLEAS, G. J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clinical Biochemistry** v. 36, p. 79-87, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews** v. 52, p. 253-265, 1994.

HAPNER, C. D.; DEUSTER, P.; CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions** v. 186, p. 275-279, 2010.

HESLINGA, M. J.; MASTRIA, E. M.; ENIOLA-ADEFESO, O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release** v. 138, p. 235-242, 2009.

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

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: methodology**. London: ICH, 1996 (ICH Harmonised Tripartite Guideline).

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials** v. 21, p. 2475-2490, 2000.

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

JAROLIM, S.; MILLEN, J.; HEEREN, G.; LAUN, P.; GOLDFARB, D.S.; BREITENBACH, M. A novel assay for replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research** v. 5, p. 169-177, 2004.

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

KARACAY, O.; SEPICI-DINCEL, A.; KARCAALTINCABA, D.; SAHIN, D.; YALVAC, S.; AKYOL, M.; KANDEMIR, O.; ALTAN, N. A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24–36 weeks of gestation. **Diabetes Research and Clinical Practice** v. 89, p. 231-238, 2010.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. **Current Pharmaceutical Biotechnology** v. 4, p. 303-309, 2003.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 27, p. 48-49, 1975.

KIM, B. K.; LEE, J. S.; OH, J. K.; PARK, D. J. Preparation of resveratrol-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by oil-in-water emulsion solvent evaporation method. **Food Science and Biotechnology** v. 18, n. 1, p. 157-161, 2009.

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

KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** v. 5, p. 65-70, 2006.

KISSEL, T.; MARETSCHEK, S.; PACKHAUSER, C.; SCHNIEDERS, J.; SEIDEL, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. (ed.). **Microencapsulation: Methods and industrial applications**. Boca Raton: Taylor & Francis Group v. 158, p. 99-122, 2006.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics** v. 363, p. 26-39, 2008.

LI, S.; IRVIN, G. C.; SIMMONS, B.; RACHAKONDA, S.; RAMANNAIR, P.; BANERJEE, S.; JOHN, V.; MCPHERSON, G. L.; ZHOU, W.; BOSE, A. Structured materials syntheses in a self-assembled surfactant. **Colloids and Surfaces A** v. 174, 275-281, 2000.

LIONZO, M. I. Z. **Micropartículas de P(HBHV) e blendas de P(HBHV):PCL contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelos de**

fármacos: caracterização físico-química e perfis de liberação *in vitro*. 138 p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; NUNEZ-DELICADO, E.; PÉREZ-LÓPEZ, A. J.; BARRACHINA, A. C.; CUADRA-CRESPO, P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of *trans*-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** v. 1135, p. 158-165, 2006.

LU, B.; ZHANG, J. Q.; YANG, H. Lung-targeting microspheres of carboplatin. **International Journal of Pharmaceutics** v. 265, p. 1-11, 2003.

LU, Z.; CHENG, B.; HUB, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry** v. 113, p.17-20, 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, I.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; NÚNEZ-DELICADO, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. **Food Chemistry** v. 104, p. 39-44, 2007.

MAGHSOODI, M. Physicomechanical properties of naproxen-loaded microparticles prepared from Eudragit L100. **American Association of Pharmaceutical Scientists** v. 10, n. 1, p. 120-128, 2009.

MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 21, n. 1, p. 1-12, 2004.

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina.** 133 p. Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 563-580, 1998.

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

NEMEN, D.; LEMOS-SENNNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova** v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PASSAMONTI, S.; PIRILLO, A.; VIOLI, F.; CATAPANO, A. L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of cathechin, caffeic acid and *trans*-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. **Atherosclerosis** v. 191, p. 265-271, 2007.

OBEIDAT, W. M. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation** v. 3, p. 178-192, 2009.

OGANESYAN, E. A.; MIROSHNICHENKO, I. I.; VIKHRIEVA, N. S.; LYASHENKO, A. A.; LESHKOV, S. Y. Use of nanoparticles to increase the systemic bioavailability of *trans*-resveratrol. **Pharmaceutical Chemistry Journal** v. 44, n. 2, p. 25-27, 2010.

OGAWA, Y.; YAMAMOTO, M.; OKADA, H.; YASHIKI, T.; SHIMAMOTO, T. A new technique to efficiently entrapment leuprolide acetate into microcapsules of polyactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 1095-1103, 1988.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

PACIFICI, G. M. Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: a review of the literature. **International Journal of Clinical Pharmacology** v. 42, p. 488-495, 2004.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress *in vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 21, n. 5, p. 909-913, 2010.

PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; XIE, M.; LIU, Y.; BAI, C.; CHEN, L. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry** v. 121, p. 23-28, 2010.

PINEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Determination of *trans*-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** v. 1110, p. 61-65, 2006.

POLETTI, F. S.; JAGER, E.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics** v. 345, p. 70-80, 2007.

PREMKUMAR, K.; BOWLUS, C. L. Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** v. 542, p. 99-103, 2003.

RASTIJA, V.; MEDIC-SARIC, M. QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 44, p. 400-408, 2009.

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

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **Journal of Controlled Release** v. 73, p. 339-350, 2001.

RESTANI, R. B.; CORREIA, V. G.; BONIFÁCIO, V. D. B.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids** v. 55, p. 333-339, 2010.

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

ROA, J. P. B.; MANO, V.; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E. B.; SILVA, M. E. S. R.; SOUZA FILHO, J. D. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-ε-caprolactona) a partir de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ε-caprolactona). **Polímeros** v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

ROSSI, S.; AZGHANI, A. O.; OMRI, A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 54, p. 1013-1018, 2004.

SAPINO, S.; CARLOTTI, M. E.; CARON, G.; UGAZIO, E.; CAVALLI, R. *In silico* design, photostability and biological properties of the complex resveratrol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry** v. 63, p. 171-180, 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHENOUDA, N. S.; ZHOU, C.; BROWNING, J. D.; ANSELL, P. J.; SAKLA, M. S.; LUBAHN, D. B.; MACDONALD, R. S. Phytoestrogens in common herbs regulate prostate cancer cell growth in vitro. **Nutrition and Cancer** v. 49, p. 200-208, 2004.

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

SHUKLA, A. J.; PRICE, J. C. Effect of drug (core) particle size on the dissolution of theophylline from microspheres made from low molecular weight cellulose acetate propionate. **Pharmaceutical Research** v. 6, n. 5, p. 418-421, 1989.

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

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, V. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Development of controlled release captopril granules coated with ethylcellulose and methylcellulose by fluid bed dryer. **Drug Delivery** v.15, n. 1, p.11-18, 2008.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal** v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SUN, X.; SHAO, Y.; YAN, W. Measurement and correlation of solubilities of *trans*-resveratrol in ethanol + water and acetone + water mixed solvents at different temperatures. **Journal of Chemical Engineering** v. 53, p. 2562-2566, 2008.

THOMPSON, C. J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G. A.; MUNDAY, D. L. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolymers. **International Journal of Pharmaceutics** n. 329, p. 53-61, 2007.

TRAN, V.; BENOÎTA, J. P.; VENIER-JULIENNEA, M. C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics** v. 407, p. 1-11, 2011.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 44, p. 1253-1257, 1996.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 28 ed. Rochville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

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

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

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Molecular Nutrition & Food Research** v. 49, p. 472-481, 2005.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 81, p. 243S-255S, 2005.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa



PARECER N° 121/2011
Protocolo: 16173/11

No dia 27 de Outubro de 2011, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **“Citotoxicidade de micropartículas de PHBV/PCL contendo resveratrol”** de responsabilidade do pesquisador Paulo Vitor Farago.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: 31 de Outubro de 2012.

Ponta Grossa, 31 de Outubro de 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


 Prof. Dr. Ulisses Coelho
 Coordenador