

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA CARLETTO

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO RESVERATROL EM
MODELO DE MELANOMA MURINO**

PONTA GROSSA

2015

BRUNA CARLETTO

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO RESVERATROL EM
MODELO DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada como requisito 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. Giovani Marino Favero

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

C281 Carletto, Bruna
Avaliação antitumoral in vitro e in vivo de nanopartículas de PCL contendo resveratrol em modelo de melanoma murino/ Bruna Carletto. Ponta Grossa, 2015. 80f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1.Trans-resveratrol. 2.Nanocápsulas. 3.B16F10. 4.Viabilidade celular. I.Favero, Giovani Marino. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.7



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 02/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA BRUNA CARLETO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 23 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo terceiro dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 14h00min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Giovani Marino Fávero, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Bruna Carletto. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Giovani Marino Fávero (Presidente) / UEPG, Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski / USP e Profª Dra. Priscileila Colerato Ferrari/ UEPG, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“AVALIAÇÃO ANTITUMORAL IN VITRO E IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO RESVERATROL EM MODELO DE MELANOMA MURINO”**.

Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata Aprovada (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração *Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia*, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):

Prof. Dr. Giovani Marino Fávero - UEPG

Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski – USP

Profª Dra. Priscileila Colerato Ferrari/ UEPG

Dedico esta dissertação às pessoas
que me dão força para atingir os meus
objetivos, meus pais e meu irmão;
Obrigada por toda preocupação,
incentivo e apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por ter me protegido e iluminado durante a execução desse trabalho assim como tem feito sempre em minha vida.

Aos meus pais, Balduir e Marciah, meus maiores mestres, não pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas sim pelo exemplo de vida, de fé, de perseverança, de moral, de ética e humildade. Por não terem medido esforços para que eu e meu irmão pudéssemos estudar, pelo constante incentivo, por terem me apoiado em todas as minhas decisões e por todo amor que me dedicam, serei eternamente grata!

Ao meu irmão Rodolfo pela amizade, cumplicidade e incentivos recebidos ao longo de todos estes anos.

Ao Professor Dr. Giovani Marino Favero e ao Professor Dr. Paulo Vitor Farago pela competência com que orientaram este meu trabalho e o tempo que generosamente me dedicaram, transmitindo-me ensinamentos e sugestões úteis, com paciência e dedicação, por terem confiado em mim e terem colaborado com o meu crescimento pessoal e profissional.

Às professoras Dras. Kátia Sabrina Paludo, Iriane Eger e a Professora doutoranda Jessica Bitencourt Emilio Mendes por toda ajuda, empréstimos de materiais e auxílio nos experimentos.

Aos Professores Dr. Najeh Khalil e Dra. Rubiana Mainardes e a mestrandia Luciana Facco Dalmolin pelo auxílio na análise de eficiência de encapsulação.

À Dra. Camila Guimarães Moreira por todas as dicas e auxílio no trabalho com as células.

Às colegas de turma Daiane Mirante, Mona Lisa Simionato e Lívia Eidam agradeço pelo maravilhoso convívio, apoio, paciência, generosidade, ajuda em vários momentos e amizade. A presença de vocês tornou esse caminho mais fácil.

À Juliana Berton por ser minha companheira em todos os momentos, pela paciência, pelas conversas, troca de experiências, protocolos, apoio e amizade.

À Tamara Nascimento Ferreira pela ajuda no experimento *in vivo*.

Aos demais colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Às minhas amigas Francistiele, Annelise, Amanda e Fabiane pela amizade, disponibilidade e pelas oportunas manifestações de companheirismo e encorajamento.

Às técnicas do biotério Marilene e Maria por toda ajuda durante o experimento *in vivo* e pelo apoio e amizade.

Aos funcionários e técnicos de laboratório, que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho, em especial, a Elizabete e a Luciane.

Aos professores da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEPG/ Unicentro pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e pela dedicação nas disciplinas ministradas.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Às instituições de fomento Capes e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

E, à todos aqueles que, de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O melanoma é um tumor de pele muito letal e, quando disseminado, apresenta prognóstico pouco favorável. Por isso, novos fármacos e tratamentos são importantes para a busca de resultados mais promissores. O tratamento deste tipo de tumor depende necessariamente de intervenção cirúrgica tendo pouco resultado com a quimioterapia complementar. Estudos evidenciaram o resveratrol como um fármaco que atua em diversas etapas da carcinogênese. Aliado a isso, os sistemas de liberação modificada de fármacos estão sendo estudados para melhorar características indesejadas e otimizar suas ações. O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol e avaliar o seu potencial antitumoral na linhagem de melanoma B16F10. As nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) contendo resveratrol foram preparadas com sucesso pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Todas as formulações apresentaram valores de eficiência de encapsulação adequados, superiores a 97%. As nanocápsulas revelaram formato esférico com superfície lisa. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier não indicaram nenhuma interação química entre o resveratrol e o polímero após a nanoencapsulação. As análises de difração de raios X demonstraram que o processo de nanoencapsulação levou a uma amorfização do sistema. Os ensaios de viabilidade celular por MTT e vermelho neutro confirmaram que as nanocápsulas contendo resveratrol possuem efeito citotóxico sobre as células de melanoma murino nas concentrações de 300 e 100 μ M. Quando analisada a morfologia das células tratadas com resveratrol livre, pode-se observar que as mesmas entram em processo de morte celular por apoptose. No ensaio *in vivo*, os resultados demonstraram que o tratamento com as nanocápsulas contendo resveratrol levou a uma redução do volume tumoral dos camundongos em relação aos grupos tratados com resveratrol livre e os controles. Os animais tratados também apresentaram um aumento da massa corporal sugerindo que estes animais tiveram uma melhor resposta ao tratamento quando comparado ao grupo controle. A análise histológica revelou um aumento da área necrótica e da inflamação no tumor nos animais tratados com as nanocápsulas contendo resveratrol, e o tratamento também levou ao não desenvolvimento de hemorragia pulmonar e metástase. Esses resultados indicam que as nanocápsulas elaboradas a partir da PCL contendo resveratrol possuem ação antiproliferativa frente as células de melanoma, sendo uma alternativa interessante no seu tratamento.

Palavras Chave: trans-resveratrol, Nanocápsulas, B16F10, Viabilidade celular

ABSTRACT

Melanoma is a very lethal skin tumor and, when widespread, presents unfavorable prognosis. Therefore, new drugs and treatments are important to the search for more promising results. Treatment of this type of tumor surgery necessarily depend on having little effect on the supplementary chemotherapy. Studies have shown resveratrol as a drug that acts in different stages of carcinogenesis. Allied to this, modified release systems of drugs are being studied to improve unwanted features and optimize their actions. The aim of this study was to develop polymeric nanocapsules containing resveratrol and assess their potential antitumor in B16F10 melanoma strain. The nanocapsules of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) containing resveratrol were successfully prepared by interfacial deposition of preformed polymer. All formulations showed encapsulation efficiency values suitable above 97%. Nanocapsules revealed spherical shape with smooth surface. Infrared Fourier transform spectra indicated no chemical interaction between the polymer and resveratrol after the nanoencapsulation. The analysis of X-ray diffraction showed that the process of nanoencapsulation led to an amorphisation of the system. Cell viability assays for neutral red and MTT confirmed that resveratrol-containing nanocapsules have cytotoxic effect on murine melanoma cells at concentrations of 300 and 100 micrometers. When analyzed the morphology of the cells treated with resveratrol free, it can be seen that they enter into the process of cell death by apoptosis. In the *in vivo* assay, the results demonstrated that treatment with resveratrol-containing nanocapsules led to a reduction in tumor volume of the mice in the groups treated with resveratrol and free controls. Treated animals also showed an increase in body mass suggesting that these animals had a better response to treatment compared to the control group. Histological analysis revealed an increase in necrotic area in the tumor and inflammation in the animals treated with the nanocapsules containing resveratrol and the treatment also led to the development of non-pulmonary hemorrhage and metastasis. These results indicate that the nanocapsules prepared from the PCL containing resveratrol have antiproliferative action front melanoma cells, with an interesting alternative in their treatment.

Keywords: trans-resveratrol, Nanocapsules, B16F10, cell viability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química dos isômeros (a) <i>trans</i> -resveratrol e (b) <i>cis</i> -resveratrol	23
Figura 2 – Hidrólise e metabolismo dos produtos de degradação da PCL.....	32
Figura 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa.....	36
Figura 4 – Aspectos morfológicos da PCL (A), do resveratrol (B) por FEG, aumento de 4.00 kx.....	50
Figura 5 – Fotomicrografias das nanocápsulas por FEG em aumento de 200kx (C) e 331 kx (D)	51
Figura 6 – Espectros IV-TF do resveratrol, da PCL e da mistura física (resveratrol:PCL)	52
Figura 7 – Espectros IV-TF da mistura física (resveratrol:PCL) e das nanocápsulas NR-3, NR-5, NR-10 e NR-0	53
Figura 8 – Difrátogramas do resveratrol puro, da PCL e da mistura física resveratrol:PCL	54
Figura 9 – Difrátogramas da mistura física resveratrol:PCL e das nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10	55
Figura 10 – Efeito do resveratrol livre e das nanocápsulas contendo resveratrol na viabilidade celular de células de melanoma B16F10 pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C).	56
Figura 11 – Efeito do resveratrol livre e das nanocápsulas contendo resveratrol na viabilidade celular de células de melanoma B16F10 pelo ensaio de vermelho neutro nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C).	58
Figura 12 – Efeito do resveratrol livre na morfologia das células de melanoma murino B16F10. Micrografias das células controle nos aumentos de 40X (A) e 100X (B), células tratadas com 1 µM nos aumentos de 40X (C) e 100X (D), células tratadas com 3 µM nos aumentos de 40X (E) e 100X (F), células tratadas com 10 µM nos aumentos de 40X (G) e 100X (H), células tratadas com 30 µM nos aumentos de 40X (I) e 100X (J), células tratadas com 100 µM nos aumentos de 40X (K) e 100X (L) e células tratadas com 300 µM nos aumentos de 40X (M) e 100X (N).	60

Figura 13 – Gráfico do volume do tumor (mm ³) durante o tratamento com nanocápsulas contendo resveratrol, nanocápsulas vazias, resveratrol livre e controle.	62
Figura 14 - Volume do tumor de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma, tratados com doses diárias de 5 mg/kg/dia de resveratrol livre, encapsulado e seus controles, no final do tratamento.	63
Figura 15 - Variação de massa corporal (g) dos camundongos durante a análise de crescimento tumoral.....	64
Figura 16- Micrografias de cortes histológicos de melanomas B16F10. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A) Controle portador de melanoma no aumento de 40X, (B e C) Controle tratado com NR-0 no aumento de 40X, (D) Tratado com resveratrol livre no aumento de 40X, (E e F) tratado com NR-10 no aumento de 10X (E) e 40X (F)	65
Figura 17– Micrografias de cortes histológicos de pulmões. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A e B) Controle portador de melanoma no aumento de 20X, (C) Controle tratado com NR-0 no aumento de 20X, (D) Tratado com resveratrol livre no aumento de 20X, (E) tratado com NR-10 no aumento de 20X	67
Figura 18 – Micrografias de cortes histológicos dos demais órgãos analisados. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A) fígado no aumento de 20X, (B) cérebro no aumento de 10X, (C) baço no aumento de 40X, (D) baço no aumento de 100X	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades não ideais de fármacos, suas implicações farmacêuticas e seus efeitos quando em sistemas de liberação controlada	28
Tabela 2 - Composição das formulações de nanocápsulas contendo resveratrol...	37
Tabela 3 - Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do resveratrol por CLAE	40
Tabela 4 - Tamanho de partícula e Índice de polidispersão* (PDL) para as nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10.	47
Tabela 5 – Valores de Potencial zeta* para as nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10	48
Tabela 6 - Eficiência de encapsulação* do Resveratrol nas nanocápsulas	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
Bcl-2	Proteína 2 de linfoma de células B proteína anti-apoptótica
Bcl-xl	Proteína de isoforma longa relacionada a Bcl-2
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDK4	Gene da cinase dependente de ciclina 4
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
c-myc	Proto-oncogene
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenase -1
COX-2	Ciclooxigenase -2
DRX	Difração de raios X
EE%	Eficiência de encapsulação
FEG	Microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IPD	Índice de polidispersão
IV-TF	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
MC1R	Receptor de Melanocortina 1
MDR	Resistência múltipla a fármacos
MMPs	Metaloproteínas de matriz
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NR-3	Formulação de nanocápsulas contendo 3 mg de resveratrol
NR-5	Formulação de nanocápsulas contendo 5 mg de resveratrol
NR-10	Formulação de nanocápsulas contendo 10 mg de resveratrol
NR-0	Formulação de nanocápsulas controle sem resveratrol
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Tampão Fosfato
PCL	Poli(ε-caprolactona)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína cinase
p53	Proteína supressora de tumor

p19	Inibidor de cinase dependente de ciclina
SFB	Soro fetal bovino
SFLC	Sistema de liberação controlada de fármacos
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 MELANOMA.....	19
3.1.1 Características biológicas do melanoma.....	21
3.2 RESVERATROL.....	22
3.2.1 Atividade antitumoral do resveratrol	26
3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	27
3.3.1 Nanopartículas poliméricas	29
3.3.2 PCL	31
3.3.3 Sistemas de liberação contendo resveratrol.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES.....	34
4.1.1 Fármaco	34
4.1.2 Produção das nanopartículas	34
4.1.3 <i>In vivo</i> MTT e vermelho neutro	34
4.1.4 Outros reagentes.....	35
4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	35
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	36
4.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE PCL CONTENDO RESVERATROL.....	37
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS	38
4.5.1 Determinação do pH	38
4.5.2 Análise do tamanho de partícula.....	38
4.5.3 Potencial zeta.....	38
4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (FEG)	38

4.5.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-FT)	39
4.5.6 Análise por difração de raios X (DRX).....	39
4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	39
4.7 ENSAIOS <i>in vitro</i>	40
4.7.1 Cultura da linhagem B16F10.....	40
4.7.2 Tratamento das células	41
4.7.3 Viabilidade celular por MTT	41
4.7.4 Ensaio de viabilidade do vermelho neutro.....	41
4.7.5 Avaliação morfológica	42
4.8 ENSAIOS <i>in vivo</i>	42
4.8.1 Cuidados éticos.....	42
4.8.2 Manutenção dos animais.....	43
4.8.3 Implante das células tumorais	43
4.8.4 Parâmetros macroscópicos do crescimento tumoral.....	43
4.8.5 Tratamento dos animais.....	44
4.8.6 Análise histológica.....	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTICULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	46
5.2 POTENCIAL ZETA.....	47
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	48
5.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE	50
5.5 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV-FT)	51
5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)	53
5.7 ESTUDO <i>in vitro</i>	55
5.7.1 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT	55
5.7.2 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO.....	57
5.7.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA	59
5.8 ESTUDO <i>in vivo</i>	62

5.8.1 Tamanho do tumor	62
5.8.2 Massa corporal dos camundongos portadores de melanoma	63
5.8.3 Análise histológica.....	65
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO A – Parecer da comissão de ética em pesquisa.....	79

1 INTRODUÇÃO

O melanoma tem sido apontado como a neoplasia de pele mais perigosa em razão da sua elevada predisposição ao desenvolvimento de metástases (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). A sua origem ocorre em decorrência de alterações genéticas celulares, alterações essas que levam a um descontrole da proliferação e adesão celular (HAASS *et al.*, 2004).

No Brasil, o câncer de pele é um dos tipos de câncer mais incidente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores registrados (INCA, 2014), sendo que o melanoma apresenta um risco de incidência de 1 em 75 pessoas (WARGO; TANABE, 2009).

Mesmo com o avanço de pesquisas promissoras relativas ao tratamento, ainda não foram elaborados métodos eficientes que sejam capazes de estender de forma considerável a sobrevida dos pacientes com metástase de melanoma. Portanto, a estratégia para a diminuição da mortalidade continua sendo a identificação prévia do melanoma primário e também dos pacientes com risco de metástase (MARSDEN *et al.*, 2010).

Desse modo, tornou-se pertinente a busca de novos fármacos que possam atuar de forma mais efetiva no tratamento e prevenção da doença. Foi nessa perspectiva, que o resveratrol emergiu no contexto desse estudo, devido suas características e peculiaridades, como tratado a seguir.

O resveratrol é uma substância produzida em algumas plantas em consequência de uma agressão externa que pode ser decorrente de ataque por fungos, radiação ultravioleta ou dano mecânico, por isso é considerada uma fitoalexina (NAKATA, 2012). É uma substância produzida por mais de 70 espécies de plantas como amora, amendoim entre outros, (UDENGWE *et al.*, 2008; BALIGA; KATIYAR, 2006) sendo que a uva é a que possui maior concentração.

Já foi comprovado que o resveratrol age na prevenção e tratamento de diversos processos patológicos como doenças cardiovasculares e diabetes, também atuando positivamente em diversas neoplasias como câncer de mama, cólon e próstata (BAUR; SINCLAIR, 2006). Isso faz com que o resveratrol seja uma substância com grande possibilidade de ter uma ação positiva frente às células de melanoma.

Além disso, Wenzel e Somoza (2005) e Walle *et al.* (2004) relataram que o resveratrol apresenta uma biodisponibilidade muito baixa, tanto em estudos em animais, como em humanos, devido ao seu amplo e acelerado metabolismo pré-sistêmico, o que ocasiona a presença de apenas traços da molécula na circulação sistêmica.

Para tentar solucionar limitações como baixa biodisponibilidade, sistemas nanoestruturados estão sendo elaborados para liberação modificada de fármacos (ROGER *et al.*, 2010)

Nesse sentido, o desenvolvimento de nanocarreadores de liberação modificada de fármacos contendo resveratrol pode ser uma estratégia viável e promissora, como uma alternativa para melhorar a sua biodisponibilidade, fazendo com que o fármaco permaneça por mais tempo na circulação sistêmica.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo resveratrol na busca do aproveitamento do seu potencial terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol e avaliar o seu potencial antitumoral em melanoma murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanocápsulas poliméricas contendo resveratrol pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado;
- Caracterizar as nanocápsulas poliméricas por meio de análises físico-químicas, morfológicas e espectroscópicas;
- Determinar a concentração de resveratrol incorporado nas nanocápsulas poliméricas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação do fármaco;
- Investigar a ação do nanocarreador, com diferentes concentrações de resveratrol, sobre a proliferação e a viabilidade da linhagem B16F10;
- Analisar as alterações morfológicas em células B16F10 após tratamento com resveratrol livre;
- Avaliar o efeito antitumoral do resveratrol *in vivo*, em um modelo de implante de melanoma murino em camundongo;
- Realizar avaliação histopatológica do melanoma, pulmão, fígado, baço e cérebro após tratamento dos camundongos com resveratrol livre e com as nanocápsulas contendo resveratrol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MELANOMA

O câncer é um processo patológico definido pela multiplicação e pela propagação descontrolada de células anormais, nos tecidos. Diversos estímulos induzem a proliferação celular e o processo de morte celular, havendo um equilíbrio coordenado entre esses eventos. O desequilíbrio desses processos pode levar a um acúmulo de células e a uma ocasional desorganização tecidual, como ocorre nos processos neoplásicos, cujas células perdem sua capacidade de diferenciação, função e possuem alto poder de invasão e metástases (MOMESSO, 2010).

Desse modo, as neoplasias são formadas por uma massa de tecido anormal com crescimento excedente, em comparação aos tecidos normais. Essa diferenciação das células tumorais é um dos indícios da progressão maligna do tumor. Tumores indiferenciados ou pouco diferenciados apresentam um grau de malignidade superior aos com boa diferenciação celular. Entre os tumores malignos pouco diferenciados com crescimento rápido, infiltrativo e altamente nocivo, tem-se o melanoma (WADE; WHITE, 1986).

O melanoma juntamente com o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular se caracteriza como um tipo de câncer de pele (MARSILLAC; REZENDE, 1996), e ao contrário dos dois últimos a exposição ao sol não é condicional para o seu desenvolvimento, desde que podem ser encontrados tumores em regiões que recebem pouca incidência da luz solar como região abdominal, palma das mãos e sola dos pés, entre outros. Contudo, a relação entre a exposição solar e a incidência do melanoma é complexa especialmente quando ocorre de forma intensa como no caso das queimaduras solares (MARKOVIC *et al.*, 2007).

Dentre os fatores que podem contribuir com o desenvolvimento da neoplasia pode-se citar o histórico familiar de melanoma; possuir múltiplos nevus displásicos; xeroderma pigmentoso e imunossupressão. Pessoas com histórico familiar positivo para melanoma apresentam uma elevação no risco de desenvolver a doença em 30 a 70 vezes quando comparado com a população em geral (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

É considerado um tumor altamente agressivo e um dos tumores com maiores taxas de letalidade em estágios avançados. Além disso, o melanoma é um dos únicos tumores que tem capacidade de evoluir para metástase em qualquer órgão, incluindo localizações pouco comuns como intestino, baço e coração (MARSILLAC; REZENDE, 1996; BALCH *et al.*, 2009).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2014 os casos de melanoma no Paraná atingiram uma porcentagem de incidência de 5,19 para homens e 5,05 para mulheres para cada 100 mil habitantes. No Brasil a região que registra maior número de casos é o Rio Grande do Sul com uma estimativa de 6,78 casos para cada 100 mil habitantes.

Apesar do melanoma compreender em torno de 10% dos casos de câncer de pele, ele é responsável por mais de 80% das mortes, e tem um índice de sobrevivência em 5 anos de 16% em pacientes com a doença metastática (POSTOVIT *et al.*, 2006; ARORA; ATTWOOD, 2009).

É considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um evidente problema de saúde pública mundial, sendo previsto para 2030 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer. O melanoma está classificado no Brasil como 13º câncer mais incidente entre homens e mulheres (INCA, 2014).

A principal alternativa terapêutica para o tratamento do melanoma até o momento é a cirurgia, visto que é a única que pode realmente levar a remissão completa do paciente quando diagnosticado nos estágios iniciais da doença (SLINGLUFF *et al.*, 2011).

Quando diagnosticado tardiamente as terapias utilizadas como quimioterapia, radioterapia, bioquimioterapia e vacinas apresentam atividade limitada com pouco impacto na sobrevivência do paciente, esta baixa resposta à quimioterapia pode estar relacionada aos mecanismos de resistência intrínseca, presentes nas células do tumor (EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004; MOUAWAD *et al.*, 2010).

Já em pacientes em estágios avançados da doença o tratamento é acima de tudo paliativo, com o intuito de aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida, já que a perspectiva de cura após o tratamento não é elevada o que revela um prognóstico negativo (HOWELL *et al.*, 2007; INCA, 2014).

Tendo isso em vista tem-se uma urgência na investigação e desenvolvimento de agentes individuais mais eficientes que separadamente ou em associações possam gerar opções de novos tratamentos que atuem de forma mais significativa sobre o melanoma (MOUAWAD *et al.*, 2010).

3.1.1 Características biológicas do melanoma

O Melanoma é uma doença multifatorial, como também é observado em outras neoplasias, apresentando como fatores de risco para o seu desenvolvimento alterações epigenéticas, exposição a agentes ambientais e também predisposição genética (MACKIE *et al.*, 1989), por isso não pode ser considerado uma doença única e simples, por apresentar um conjunto de desordens que são promovidas por complexas alterações moleculares (KENNEDY *et al.*, 2001; SEKULIC *et al.*, 2008).

O processo de formação da célula neoplásica se dá através da modificação de uma célula normal. Alguns dos processos que levam a essa alteração são o silenciamento ou mutação de genes supressores de tumor, como a inativação da p53 e proto-oncogenes como o c-myc, que levam a um aumento da proliferação celular e possibilitam que essas células tumorais colonizem regiões diferentes do seu sítio inicial (SCHWARTZ, 1997; POLLARD, 2004).

Pho *et al.* (2006) relatou que os genes CDK4 e p19 estão relacionados com a predisposição de ocorrência do melanoma com maior poder invasivo e também estão relacionados no controle do ciclo celular. Já o MC1R está relacionado com a propensão ao desenvolvimento de melanoma com um menor poder invasivo.

O processo celular e molecular que está envolvido na metástase do melanoma não está completamente compreendido por ser um evento extremamente complexo. A difusão destas células para outras localizações no organismo envolve uma série de etapas como perda da adesão intracelular, invasão da derme, penetração nos vasos sanguíneos e linfáticos, sobrevivência intravascular, adesão ao tecido alvo e enfim proliferação e angiogênese (IRELAND *et al.*, 2011).

As células de melanoma também apresentam índices reduzidos de apoptose espontânea *in vivo* quando comparado com outras células neoplásicas, e também demonstram resistência quando induzida a apoptose *in vitro* por agentes químicos (SOENGAS; LOWE, 2003; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Devido a sua alta resistência ao tratamento, são necessárias novas terapias que estimulem o aumento da possibilidade de cura e o tempo de sobrevida e para isso é fundamental elucidar os eventos que ocorrem na gênese do tumor. Já se sabe que no melanoma, estão alterados componentes reguladores do ciclo celular, genes reguladores da senescência, o que contribui para a elaboração de novas drogas e metodologias que sejam específicas para essas alterações, aumentando então a eficiência do tratamento (DA CRUZ, 2010).

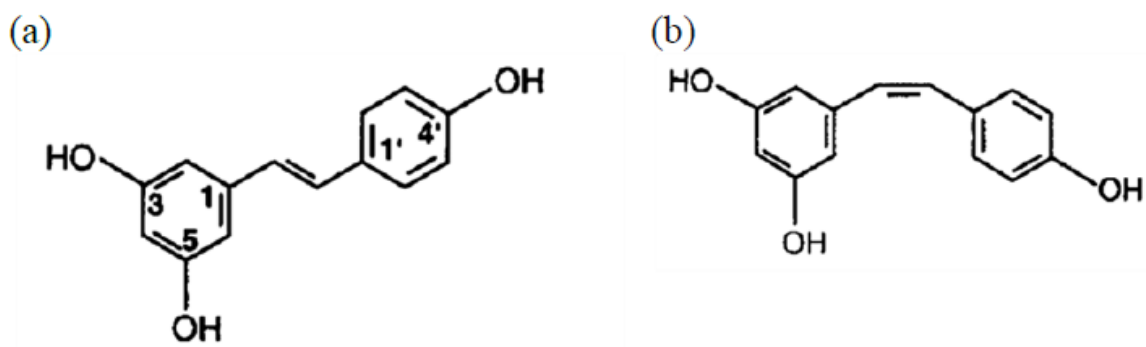
3.2 RESVERATROL

O Resveratrol (3, 4', 5'-trihidroxiestilbeno) é um composto fenólico oriundo da fenilalanina (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005). Está presente em uma ampla variedade de espécies de plantas no entanto a uva é a que apresenta maior quantidade, contendo aproximadamente 50 a 100 µg de resveratrol por grama na casca onde apresenta maior concentração (UDENGWE *et al.*, 2008; BALIGA; KATIYAR, 2006)

É classificado como uma fitoalexina natural, por ser sintetizada pelo próprio vegetal em decorrência de um estímulo exógeno como radiação ultravioleta, dano mecânico, ataque por fungos patogênicos ou, ainda, pelo ambiente de cultivo e clima (NAKATA, 2012).

As formas isoméricas *cis*- e *trans*- encontram-se apresentadas na Figura 1. Sendo que, a radiação ultravioleta estimula a obtenção da forma *cis*- (FRÉMONT, 2000), que apresenta atividade biológica reduzida. Enquanto a forma *trans*-, além de possuir maior ação biológica é a que se encontra presente em maior quantidade na natureza (NEVES *et al.*, 2012). O *trans*-resveratrol pode ser obtido sinteticamente e já está disponível comercialmente (FRÉMONT, 2000).

Figura 1- Estrutura química dos isômeros (a) *trans*-resveratrol e (b) *cis*-resveratrol



O interesse em estudos sobre os efeitos do resveratrol surgiu devido ao chamado “paradoxo francês”, com base em uma situação muito comum na França. Nesse país, a população mantinha uma alimentação com alta ingestão de gordura saturada mas, mesmo assim, apresentava baixos índices de morte decorrente de doenças cardíacas (KING *et al.*, 2006; WENZEL; SOMOZA, 2005), apresentando índice de infarto 40% menor que no resto da Europa (SAIKO *et al.*, 2008).

Este fato foi correlacionado ao consumo de vinho, e o efeito cardioprotetor observado foi atribuído ao resveratrol que está presente em grande quantidade no vinho tinto (NAKATA, 2012).

Os benefícios do resveratrol para a saúde, têm sido elucidado de forma significativa em várias pesquisas, cujos resultados apontam para os seus efeitos positivos no tratamento de várias doenças (NAKATA, 2012), como a ação antioxidante, efeito antitumoral, e atividades antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória e cardioprotetora (GOSWAMI; DAS, 2009).

Todavia, algumas limitações podem ser vinculadas à utilização do resveratrol, como a facilidade de oxidação decorrente de sua elevada fotosensibilidade. E quando exposto à radiação ultravioleta por longos períodos pode sofrer isomerização passando da sua forma *trans*- para *cis*- (NEVES *et al.*, 2012).

Estudos comprovam que se o resveratrol estiver totalmente protegido da luz ele se mantém estável por um grande período (FRÉMONT, 2000). Mas,

se desprotegido da luz, ocorre redução da atividade e da sua biodisponibilidade (KIM *et al.*, 2009).

Embora o resveratrol apresente uma alta taxa de absorção, estudos farmacocinéticos mostram uma baixa biodisponibilidade e uma rápida depuração da circulação. Isso pode ser esclarecido por um intenso metabolismo de fase II, gerando metabólitos presentes no plasma e na urina, os glicuronídeos e o sulfato de resveratrol (BOOCOCK *et al.*, 2007; BAUR; SINCLAIR, 2006; WALLE *et al.*, 2004).

Devido sua molécula primária ser extensivamente metabolizada pelo organismo, o resveratrol apresenta tempo de meia vida muito curto, que pode variar de 8 a 14 minutos aproximadamente, diminuindo a sua possibilidade para o uso terapêutico (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Apesar da grande quantidade de trabalhos sobre as propriedades dos compostos polifenólicos *in vitro*, os efeitos não são verificados *in vivo*, sendo que o elevado metabolismo desse composto é um dos possíveis motivos pelo qual se explica a disparidade entre os relatos *in vitro* e *in vivo* (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

O resveratrol também apresenta baixa solubilidade aquosa e baixa estabilidade frente à oxidação, além da fotossensibilidade, o que restringe o seu uso terapêutico (PIÑEIRO; PALMA; BARROSO, 2006).

É absorvido basicamente no intestino. Durante o seu metabolismo, ocorre a glicuronidação e a sulfatação, tanto no fígado como no duodeno, sendo seus principais derivados o *trans*-resveratrol-3-O-glicuronídeo, *trans*-resveratrol-4'-O-glicuronídeo, e *trans*-resveratrol-3-O-sulfato. Rapidamente metabolizado, cerca de 75% é excretado através da urina e das fezes (WENZEL; SOMOZA, 2005; YU *et al.*, 2002).

Estudos relataram uma característica importante referente à farmacocinética do resveratrol, que é a ocorrência da sua ligação com proteínas plasmáticas, como a albumina sérica e a hemoglobina. Esse fato contribui para a sua permanência no organismo por um período maior de tempo (LU, 2007).

Outra estratégia que vem sendo muito discutida no desenvolvimento de análogos do resveratrol é a sua metilação, visando a sua permanência no sangue na sua forma ativa. Essas estruturas se apresentam mais estáveis e

biodisponíveis, tendo atividades equivalentes ou, até mesmo, maiores das desempenhadas pelo resveratrol (FULDA, 2010).

Em um estudo realizado por Ortuño *et al.* (2010), foi observado que o resveratrol é mais satisfatoriamente absorvido quando oriundo dos produtos naturais da uva quando comparado a comprimidos, este trabalho revelou que em doses similares de resveratrol a biodisponibilidade a partir do vinho ou suco de uva foi seis vezes maior do que quando ingerido por comprimidos, o que salienta a importância da matriz na disponibilidade biológica da substância.

Quase que a totalidade dos estudos referentes a administração do resveratrol revelam a ausência de toxicidade após a sua administração, em doses até 5,0 g não foram relatados efeitos adversos consideráveis (BOOCOCK *et al.*, 2007).

Os efeitos que são atribuídos ao resveratrol baseiam-se na sua capacidade de afetar diversos alvos moleculares. Esses alvos podem ser classificados em dois tipos aqueles modulados por interação física direta com o resveratrol; e aqueles modulados indiretamente, por meio da mudança dos níveis de expressão de diferentes genes (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008).

Harikumar e Aggarwal (2008) revisaram os diversos estudos que comprovam que o resveratrol se liga diretamente a diversas moléculas como: proteína cinase (PKC), proteína de resistência a múltiplos fármacos 1, integrinas, lipoproteínas plasmáticas, albumina, ácidos nucleicos entre outras. Também relataram que, em muitas situações, essa interação entre o resveratrol e as proteínas pode levar a sua inativação molecular.

Estudos complementares necessitam ser feitos, a fim de compreender melhor os efeitos do resveratrol, visto que ele tem um amplo espectro de ação, podendo atingir diversos alvos moleculares. Cabe também ressaltar, que o efeito do resveratrol varia de acordo com o tipo celular, com o estado metabólico da célula e com a concentração utilizada (ZAMIN, 2010).

Devido a essas características relatadas, a produção de diferentes sistemas de liberação de fármacos se mostra interessante, o que favorece um aumento do efeito terapêutico, em decorrência da maior concentração do fármaco no organismo (FROZZA *et al.*, 2010).

3.2.1 Atividade antitumoral do resveratrol

Considerando aspectos históricos, Jang e colaboradores, em 1997, demonstraram uma grande atividade anticancerígena para o resveratrol, como consequência de sua capacidade de inibir os estágios de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese, por apresentar propriedades antimutagenicas, antioxidantes, pela ativação de enzimas metabolizadoras de drogas de fase II, efeitos anti-inflamatórios e pela inibição das ciclooxigenases (COX).

Entretanto, os mecanismos exercidos pelo resveratrol para que apresente ação antineoplásica não estão completamente esclarecidos, diversas possibilidades são abordadas a fim de elucidar os caminhos utilizados para que ocorra a sua ação (NEVES *et al.*, 2012).

Estudos anteriores demonstram que o resveratrol possui a capacidade de inibir a metástase e a angiogênese, induzir apoptose, parada do ciclo celular e senescência em diversos tumores (AGGARWAL *et al.*, 2004). Apresenta-se eficaz na indução da apoptose em células da epiderme de camundongos, células de leucemias promielocíticas humana, células mamárias e em diversas linhagens celulares de câncer de cólon e próstata (DONG, 2003).

O resveratrol demonstrou a habilidade de atuar em diversos alvos e rotas celulares, que estão presentes no crescimento celular e apoptose (FRÉMONT, 2000).

As causas do desenvolvimento de cânceres malignos envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio, estas que são capazes de danificar componentes principais das células (FRÉMONT, 2000), devido a isso seus efeitos anticarcinogênicos parecem estar intimamente ligados à sua atividade antioxidante por inibir as prostaglandinas, a formação de óxido nítrico, bem como as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (GUSMAN; MALONNE; ATASSI, 2001).

Pode inibir tanto a ativação de agentes pró-mutagênicos como estimular a detoxificação de carcinógenos e prevenir o organismo contra diversos agentes tóxicos ambientais (ATHAR *et al.*, 2007).

O resveratrol tem a capacidade de modular diversos produtos gênicos como os regulatórios do ciclo celular tais como CDKs, ciclinas e c-myc. Também apresenta capacidade de induzir a apoptose por meio do aumento da

atividade da p53 e da diminuição de produtos antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xl (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008).

A modulação de proteínas cinases também está associada ao efeito regulatório do crescimento celular mediado pelo resveratrol. Este também inibe a angiogênese e vias metastáticas, mediadas através da expressão de metaloproteínas de matriz (MMPs), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), cathepsina D, molécula de adesão intracelular (ICAM) e e-selectinas (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008).

Alguns estudos realizados com animais indicam que mesmo as pequenas doses de resveratrol que permanecem biodisponíveis já são suficientes para que apresente interação com os produtos gênicos desempenhando a sua atividade quimiopreventiva (BANERJEE *et al.*, 2002).

A ação exercida pelo resveratrol na carcinogênese, é decorrente de diversas alterações e mecanismos celulares, e estes mecanismos são específicos para cada neoplasia, devido ao perfil genético celular (CHIELA, 2011), o que torna mais complexo o processo de elucidação destes mecanismos frente a uma linhagem específica.

3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

As tecnologias de liberação modificada de fármacos constituem uma das áreas mais promissoras da ciência, e tem como finalidade contribuir para saúde humana e animal, proporcionando diversas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais. Assim sendo, a investigação de sistemas de liberação, que abrangem a melhora do processo de dissolução, diminuição da toxicidade e o aumento da adesão, possuem grande importância (RESTANI *et al.*, 2010).

As nanopartículas apresentam distribuição de tamanho que pode variar de 1 a 1000 nm e são comumente caracterizadas como partículas coloidais (RAO GECKELER, 2011). Essas partículas tem a capacidade de aumentar a eficácia dos fármacos, fazendo com que sejam mais disponíveis em alvos específicos (EVANGELISTA, 2006), conferindo a capacidade de liberação controlada destes fármacos, protegendo-os contra a sua inativação prematura

e também permitindo a diminuição da resistência múltipla a fármacos (MDR) (BRIGGER *et al.*, 2012).

Para solucionar problemas como baixa solubilidade, toxicidade, rápida metabolização, problemas na biodistribuição tem sido desenvolvido sistemas de liberação controlada como apresentado na tabela 1:

Tabela 1- Propriedades não ideais de fármacos, suas implicações farmacêuticas e seus efeitos quando em sistemas de liberação controlada

Problemas	Implicação	Efeitos do SFLC*
Solubilidade Baixa	É difícil de obter formulação adequada utilizando moléculas hidrofóbicas, pois estas precipitam em água	Permite uso de moléculas hidrofóbica ou hidrofílica, pois melhora a solubilidade das mesmas
Danos no tecido	Derramamento inadvertido de fármacos citotóxicos	Liberação regulada por SFLC não permite esse problema
Rápida inativação de fármaco <i>in vivo</i>	Perda de atividade	Protege o fármaco da degradação prematura, portanto, podem-se utilizar baixas concentrações do fármaco
Farmacocinética desfavorável	Fármaco é eliminado rapidamente pelos rins, por isso necessita ser adicionado em altas concentrações	Pode modificar substancialmente a farmacocinética do fármaco
Biodistribuição	Distribuição sistêmica, podendo afetar tecidos normais	Altera os volumes de distribuição diminuindo efeitos secundários
Falta de seletividade por tecidos alvos normais	Distribuição de fármacos em tecidos saudáveis acarreta em efeitos secundários, restringindo altas dosagens	Podem aumentar a concentração do fármaco em tecidos tumorais pelo efeito pela permeabilidade e retenção aumentadas

*SFLC: Sistema de liberação controlada de fármacos

Fonte: (GOTO, 2011).

Além disso, pesquisas indicam que muitos tumores apresentam sensibilidade reduzida aos tratamentos e que isto se deve à ausência de seletividade dos fármacos em relação às células tumorais ou devido à dificuldade de penetração no interstício tumoral, assim a nanotecnologia vem para suprir essas necessidades de novas possibilidades para o tratamento do câncer (FENG *et al.*, 2004), fazendo com que os fármacos apresentem uma maior especificidade em relação as células tumorais, promovendo a melhora da eficácia terapêutica bem como reduzindo os efeitos tóxicos (BRIGGER *et al.*, 2012).

3.3.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas vem sendo largamente utilizadas como carreadoras de fármacos com a finalidade de facilitar a sua distribuição no organismo, são classificadas com base na sua estrutura e composição podendo formar nanoesferas e nanocápsulas (MARTINS *et.al.*, 2010; RAO; GECKELER, 2011).

As nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica densa em que o fármaco pode estar retido na sua superfície polimérica ou disperso homogeneamente por toda partícula, são compostas por polímero, tensoativo e fármaco, já as nanocápsulas além dos componentes anteriores contam com a presença de óleo e água, podendo o fármaco estar disperso no polímero ou retido no seu interior (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Na maior parte as partículas se apresentam em estruturas esféricas, mas também podem possuir outras formas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), possuem diâmetro que tende a variar entre 200 e 500 nm e apresentam valores baixos de polidispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Sabe-se que comparando o tamanho das micropartículas com o diâmetro reduzido das nanopartículas, estas apresentam vantagens em relação à sua elevada absorção a nível intracelular (JUNG *et al.*, 2000), e vários destes sistemas nanoparticulados são empregados para a estabilização de fármacos sensíveis a condições extremas como: luz, potencial óxido redutor, suco gástrico (GOTO, 2011), também para aumentar sua meia vida (LIM *et al.*, 2011) e tornar o fármaco mais biodisponível no organismo (SONAJE *et al.*, 2010).

A liberação do fármaco contido na partícula depende da sua localização, quando estiver presente apenas na superfície da nanopartícula a sua liberação será rápida, no entanto, se estiver localizado no seu interior ocorrerá uma liberação mais prolongada (GUPTA; VYAS, 2012).

Para a escolha do método de preparação e do polímero adequado é necessário observar as características físico-químicas da substância a ser encapsulada, sendo que a composição do polímero e a natureza do fármaco e dos adjuvantes exercem uma grande influência sob a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação das nanopartículas (REIS, 2007).

Já a distribuição de tamanho, estrutura e estabilidade das partículas dependem das condições utilizadas na produção, bem como das variáveis da formulação. Entre os elementos examinados, estão o tipo, as características químicas, a quantidade tanto da fase oleosa como dos agentes emulsionantes, a proporção entre os tensoativos lipofílico e hidrofílico na nanoemulsão e a natureza e toxicidade do monômero (GOTO, 2011).

As nanopartículas podem ser produzidas por diversos métodos, dentre eles estão os fundamentados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos e os obtidos pela precipitação de polímeros pré-formados. Todas as partículas produzidas por esses métodos resultam em suspensões coloidais aquosas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O método de obtenção por polímero pré-formado apresenta quatro formas de obtenção: por deslocamento do solvente, *salting out*, emulsificação-difusão do solvente ou por emulsificação-evaporação do solvente (TAHARA *et al.*, 2010; OZTURK *et al.*, 2010). Este último, é um método que apresenta maior rendimento em comparação aos outros métodos de produção de nanopartículas poliméricas, possuindo também a vantagem de poder incorporar a sua estrutura tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos (SEVERINO *et al.*, 2011).

Esses métodos de produção possuem similaridade quanto aos procedimentos utilizados, abrangendo a preparação de duas fases: uma a fase orgânica onde estão presentes os componentes da nanopartícula e outra a fase aquosa que contém o estabilizante (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado é baseado na mistura de fase orgânica com a fase aquosa por um lento gotejamento sob agitação vigorosa, após essa mistura ocorre uma rápida difusão do solvente que leva à diminuição da tensão superficial entre as fases, dando origem a uma suspensão coloidal de nanocápsulas. Após a formação das partículas é realizada a remoção do solvente por evaporação em pressão reduzida e a suspensão formada é concentrada retirando-se o excesso de água (FESSI *et al.*, 1989).

Na formulação, a adição de óleo é essencial e suas características como viscosidade e tensão interfacial interferem no produto final, pois quanto mais

viscoso e quanto maior a tensão maior será o diâmetro das partículas formadas (SANTOS, 2010). Dessa forma, os tensoativos também são importantes para auxiliar na obtenção de partículas menores e são essenciais na estabilidade das suspensões de nanopartículas diminuindo o risco de agregação durante o preparo e o armazenamento (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2006).

Existe uma variedade de polímeros que podem ser empregados na preparação das nanopartículas, entretanto os poliésteres alifáticos estão sendo largamente utilizados por possuírem características favoráveis à sua utilização como forma de entrega de fármacos (RAO *et al.*, 2011; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

3.3.2 PCL - poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, semicristalino e hidrofóbico (ALEXIS *et al.*, 2008), que tem gerado interesse comercial por ser um polímero biodegradável quando comparado com outros poliésteres, é biocompatível com diversas linhagens celulares, não causa reação inflamatória, nem tóxica e é estável (NAIR; LAURENCIN, 2007).

Embora apresente características muito favoráveis, possui uma baixa temperatura de fusão, em torno de 60° C, podendo causar problemas durante a sua utilização, limitando então as suas aplicações (SOLOMÃO, 2011).

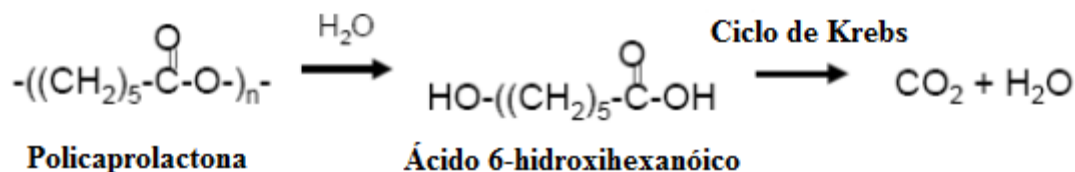
O polímero utilizado na preparação das nanopartículas deve frequentemente apresentar característica biocompatíveis e ser biodegradável, pois necessitam ser degradados *in vivo* em metabólitos naturais do organismo ou em fragmentos menores para serem eliminados com mais facilidade (ANGELOVA *et al.*, 1999).

Polímeros sintéticos como poli (ácido lático-co-ácido glicólico), poli- ϵ -caprolactona e poliacrilatos apresentam vantagem quando comparados aos polímeros naturais como a quitosana, albumina e a gelatina por possuírem uma degradação mais lenta, possibilitando que haja uma liberação controlada do fármaco (IRACHE *et al.*, 2011).

No organismo a degradação da PCL ocorre primeiramente pela hidrólise das suas ligações éster, após isso ocorre uma degradação

intracelular, esses produtos de degradação são metabolizados por meio do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), dando origem a CO_2 e H_2O (Figura 2) (WOODRUFF *et al.*, 2010; ROOHANI-ESFAHANI *et al.*, 2010).

Figura 2- Hidrólise e metabolismo dos produtos de degradação da PCL.



Fonte: FERNANDES (2011).

3.3.3. Sistemas de liberação contendo resveratrol

Para que o resveratrol exerça o seu potencial terapêutico *in vivo* a sua limitação relacionada a baixa biodisponibilidade deve ser solucionada. Atualmente o objetivo de diversas pesquisas é a melhora dessas características que limitam a sua utilização (AMRI *et al.*, 2012).

Donsi *et al.* (2011) descreve as nanoemulsões como formulações ideais para o encapsulamento do resveratrol, devido a possibilidade de utilizar pequenas concentrações de agentes emulsionantes e por ser um método de produção fácil e que obtém alto rendimento.

Para que ocorra um aumento da eficiência do resveratrol como fármaco quimiopreventivo foram produzidos lipossomas e os resultados obtidos revelaram que quando associado à curcumina ele reduz significativamente o adenocarcinoma de próstata *in vivo* (NARAYANAN *et al.*, 2009).

Teskac e Kristl (2010) elaboraram nanopartículas lipídicas sólidas a fim de aumentar a absorção do resveratrol por queratinócitos e observaram por fluorescência que as partículas atravessavam rapidamente a membrana celular absorvendo uma fração significativa da dose administrada.

Microesferas poliméricas contendo resveratrol foram utilizadas para promover o controle da liberação quando administradas por via oral e também melhorar a estabilidade durante o armazenamento por longos períodos os resultados demonstraram que as micropartículas levaram a uma liberação

inicialmente rápida mas seguida de um platô proporcionando uma liberação mais eficaz e contínua, também se mostraram mais estáveis à radiação ultravioleta e ao calor quando comparadas ao resveratrol livre (PENG *et al.*, 2010).

Nanopartículas lipídicas sólidas foram produzidas a fim de aumentar a biodisponibilidade cerebral do resveratrol, fazendo com que uma maior concentração do fármaco chegue ao cérebro, os resultados encontrados confirmaram que as nanopartículas contendo resveratrol levaram a uma maior concentração do fármaco no cérebro quando comparado ao resveratrol livre, mostrando então que as nanopartículas lipídicas sólidas podem servir como um sistema promissor para o tratamento de neoplasias cerebrais (JOSE *et al.*, 2014).

Diante da revisão apresentada considera-se viável a investigação dos efeitos do resveratrol encapsulado em forma de nanocápsulas para o tratamento de melanoma.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

4.1.1 Fármaco

- *Trans*-Resveratrol (Fargon, São Paulo)

4.1.2 Produção das Nanopartículas

- Poli(ϵ -caprolactona) - Mw 10.000 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH;
- Monooleato de sorbitano - Span 80®, OXITENO;
- Polissorbato 80 - Tween 80®, NUCLEAR;
- Triglicerídeos de cadeia média - Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico - FOCUS QUÍMICA;
- Acetona P.A - VETEC QUÍMICA FINA;
- Água ultrapura - sistema Milli-Q Gradiente Millipore®.

4.1.3 *In vitro* MTT e Vermelho Neutro

- Linhagem celular B16F10 – ATCC;
- Meio RPMI 1640 - Cultilab;
- Tampão HEPES – Hexapur Bio Lab. LTD;
- Soro Fetal Bovino – GIBCO;
- Penicilina/Estreptomicina – Invitrogen;
- MTT - Sigma Chemical;
- Vermelho neutro – INLAB;
- Cloreto de Cálcio – Anidrol prods Químicos;
- Formol – Chemco;
- Ácido acético – VETEC Química Fina;
- Etanol P.A - VETEC Química Fina;

4.1.4 Outros reagentes e solventes

- Metanol (Grau HPLC) (J.T. Baker)

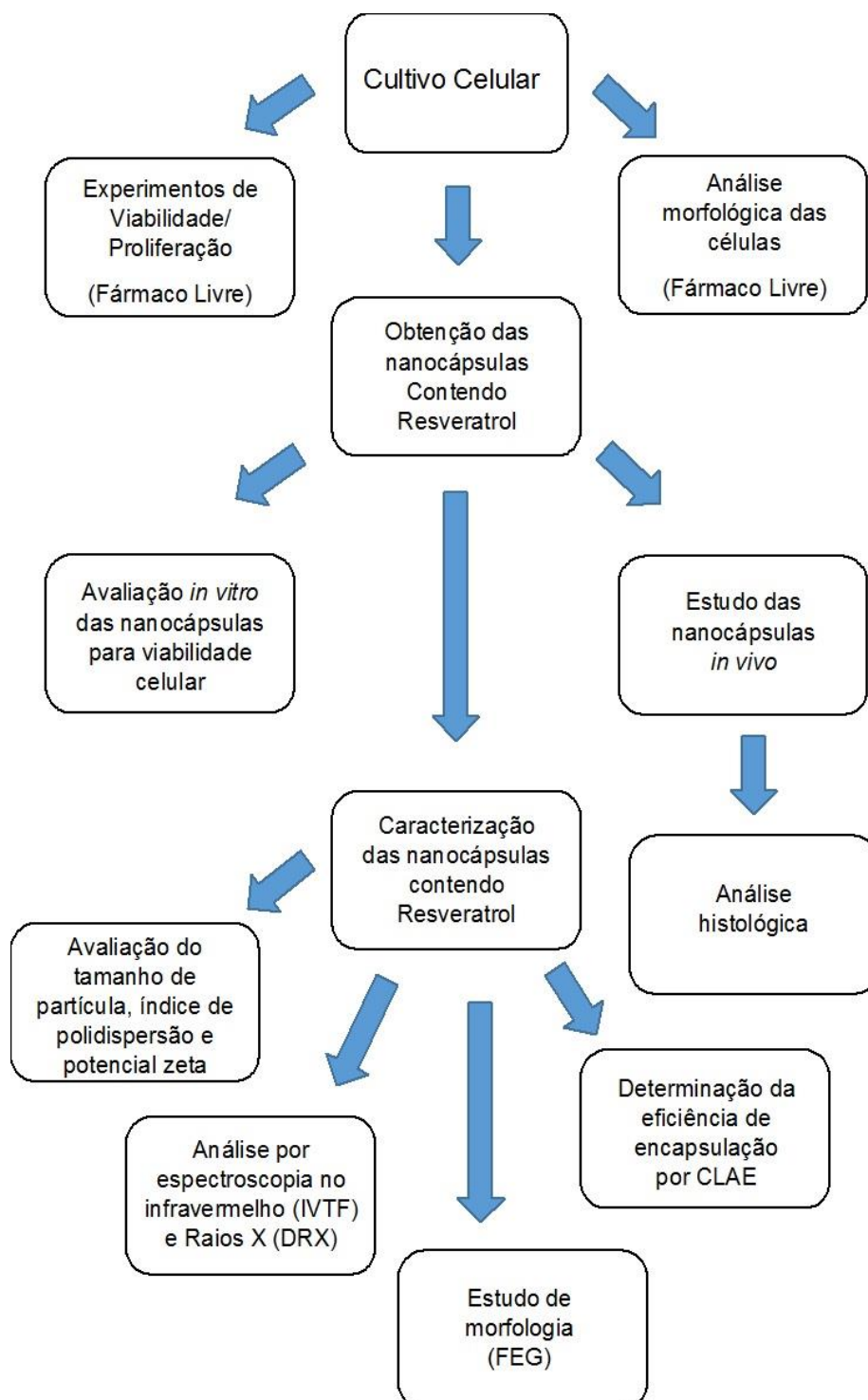
4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - Waters® Alliance acoplado à um detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA) e coluna fase reversa C18 (25 cm) de tamanho de partícula 5µm – Xterra Waters®;
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier - SHIMADZU, modelo IR Prestige-21;
- Balança analítica – Gehaka, modelo AG 200;
- Bomba a vácuo – FISATOM, modelo 830;
- Potenciômetro digital de bancada - HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 21;
- Destilador de água - FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil;
- Capela de fluxo laminar – VECO;
- Centrífuga – Bio Eng, BE-4004;
- Difrator de raios X - RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão;
- Evaporador Rotativo – FISATOM, modelo 801;
- Espectrômetro de auto correlação a laser - MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90;
- Leitor de placas – EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT
- Placas de cultura – TPP – Tissue Culture testplant 96 F;
- Membranas filtrantes – Kasvi;
- Sistemas de filtração por membranas – Millipore;
- Membranas de ultrafiltração Amicon® Ultra-0,5 –Millipore;
- Ultra centrífuga refrigerada - HITACHI, modelo Himac CR21GII;
- Microscópio invertido – Optiphase;
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo - TESCAN, modelo Lyra3;
- Estufa CO₂ – Isotemp Fisher Scientific;
- Agitador magnético com aquecimento – SOLAB, modelo SL-91;

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As etapas realizadas na parte experimental estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa.



4.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PCL CONTENDO RESVERATROL

Neste trabalho, as nanopartículas foram produzidas a partir do método de deposição interfacial de polímero pré-formado, descrito inicialmente por Fessi (1989), conforme a tabela 2.

Tabela 2- Composição das formulações de nanocápsulas contendo resveratrol

Composição	Formulação			
	NR-0	NR-3	NR-5	NR-10
Fase aquosa				
Tween 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
H ₂ O destilada (mL)	53,0	53,0	53,0	53,0
Fase orgânica				
Resveratrol (mg)	—	3,00	5,00	10,00
PCL (g)	0,10	0,10	0,10	0,10
Acetona (mL)	27,0	27,0	27,0	27,0
Span 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077
Triglicerídeo de cadeia média (g)	0,33	0,33	0,33	0,33

Resumidamente, a PCL (0,1 g) foi dissolvida em acetona (27 mL) na presença de Span[®] 80 (0,077g), resveratrol (concentrações de 3mg (NR-3), 5mg (NR-5) e 10mg (NR-10) e triglicerídeos de cadeia média (0,33g). Após 10 minutos de agitação magnética moderada, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa contendo Tween[®] 80 (0,077g) e água destilada (53mL) por meio de um gotejamento com fluxo uniforme e contínuo sob agitação mecânica vigorosa à temperatura de 40° C. O produto dessa agitação foi uma nanoemulsão que permaneceu sob agitação magnética por 10 minutos. Em seguida, o solvente orgânico foi removido rapidamente por evaporação, sob pressão reduzida a 40°C, concentrando a amostra em um volume final de 10 mL. Uma suspensão de nanocápsulas (NR-0) foi formulada sem o fármaco, como controle negativo.

Todas as formulações para a caracterização do sistema foram produzidas em triplicata, a preparação das partículas foi realizada protegida da luz.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

4.5.1 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões de nanocápsulas foram determinados diretamente, nas formulações, utilizando um potenciômetro digital calibrado, à temperatura ambiente.

4.5.2 Análise do tamanho de partícula

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (distribuição de tamanho) foram medidos por espectroscopia de correlação de fótons, após a diluição de uma alíquota da suspensão de nanopartículas em água purificada (1:1000) a temperatura ambiente.

4.5.3 Potencial zeta

O Potencial Zeta das suspensões de nanopartículas em água foram determinadas por anemometria laser Doppler. As amostras foram diluídas (1:1000) e acondicionadas em uma célula eletroforética a 25°C, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores dos potenciais foram calculados como a média e desvio padrão dos valores da mobilidade eletroforética repetidas em triplicata.

4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (FEG)

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de efeito de campo (FEG) utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kVa. Uma alíquota das suspensões de nanocápsulas foi depositada sobre o *stub* (porta amostra). Os filmes obtidos foram recobertos com uma fina camada de ouro.

Micrografias foram então obtidas com aumentos de 4 kx, 200 kx e 330 kx.

4.5.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

Para esse ensaio, o resveratrol, a PCL, as nanocápsulas e a mistura física foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, as amostras foram empregadas em pastilhas de KBr e analisadas na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , 32 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm^{-1} .

4.5.6 Análise por difração de raios X (DRX)

As medições de DRX foram realizadas utilizando radiação K α de cobre em comprimento de onda de 1.5418 Å à temperatura ambiente. A tensão utilizada foi de 30 kV e a corrente foi de 40 mA. As amostras foram acondicionadas em um suporte de amostras de vidro e digitalizadas a partir de 4° para 80°, para a observação de possíveis picos de cristalinidade.

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A quantificação do resveratrol encapsulado nas nanocápsulas foi realizada pelo método indireto. O método consiste na determinação do fármaco livre no ultrafiltrado. As suspensões de nanocápsulas foram submetidas a ultrafiltração/centrifugação, utilizando o dispositivo de centrifugação Amicon® (10,000 MW, Millipore) a 14.000 rpm, durante 30 minutos.

Uma alíquota do ultrafiltrado foi diluída (1:2) em metanol e água (50:50, v/v), filtrada em membrana de poro 0,22 μm e analisada por um método de CLAE previamente validado por Lindner e colaboradores (2013), utilizando os parâmetros descritos na tabela 3, a partir da equação da reta da curva analítica de resveratrol. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 3 - Parâmetros cromatográficos utilizados para a quantificação do resveratrol por CLAE

Características	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 306$ nm)
Fluxo	0,9 mL.min ⁻¹
Coluna	Xterra Waters C18 250 X 4,6 mm
Fase móvel	Metanol: Água (51:49)
Volume de injeção	20 μ L

A eficiência de encapsulação (EE%) foi calculada a partir da diferença entre as concentrações total e do fármaco livre como descrito na equação 1.

$$EE\% = RSV_{\text{inicial}} - RSV_{\text{livre}} / RSV_{\text{inicial}} \times 100$$

(Equação 1)

Onde, RSV_{inicial} corresponde a concentração de Resveratrol adicionada inicialmente na formulação e RSV_{livre} é a concentração do fármaco não incorporado a nanocápsula quantificada por CLAE. Os valores da eficiência de encapsulação foram expressos por média e desvio padrão.

4.7 ENSAIOS *in vitro*

4.7.1 Cultura da linhagem B16F10

A cultura da linhagem tumoral B16F10, ATCC CRL- 6475, adquiridas de ATCC, USA; Foi realizada em meio RPMI 1640. Suplementado com Soro Fetal Bovino a 10%. As células foram mantidas em estufa em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em garrafas de cultura de 125 cm². Foram utilizados para o cultivo 1% de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL. Estas células foram expandidas para congelamento e realização dos experimentos.

4.7.2 Tratamento das células

As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células/mL (5000 células/poço) e incubadas por 24 horas com meio completo para restabelecimento das suas condições de crescimento. Para a avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular a linhagem B16F10 foi incubada com concentrações equimolares do fármaco em estudo (300 μ M, 100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M e 1 μ M), na sua forma livre e encapsulada, por um período de 24, 48 e 72 horas.

4.7.3 Viabilidade celular por MTT

Neste teste, tanto a proliferação como a citotoxicidade podem ser avaliadas através de um sistema de oxirredução mitocondrial. Dessa forma, o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi reduzido através das células viáveis, formando o sal de formazan, o qual foi solubilizado para a leitura da absorvância por meio de leitor de ELISA a 570 nm. As células da linhagem B16F10 foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar, por 24, 48 e 72 horas. Após este período, 100 μ L da solução de MTT foi adicionada a placa de cultura e foi incubada por mais 3 horas. Logo após, foi adicionado álcool isopropílico para solubilização dos cristais de formazan. Após a completa solubilização dos cristais foi realizada a leitura a 570 nm e a citotoxicidade celular para cada sistema foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Absorvância por poço}}{\text{Média da absorvância do controle}} \times 100$$

(Equação 2)

4.7.4 Ensaio de viabilidade com Vermelho Neutro

O tratamento das células B16F10 ocorreu como descrito no item 4.7.2. Após o tratamento, o meio de cultura contendo o fármaco foi substituído por 200 μ L meio de cultura sem soro contendo o reagente de vermelho neutro 250

$\mu\text{mol/L}^{-1}$ (previamente centrifugado e filtrado em membrana de 0,22 μm para remoção dos cristais formados). A placa foi incubada a 37°C (5% CO_2) por 2 horas para a incorporação do corante pelos lisossomos das células e estas foram lavadas/fixadas com uma solução de CaCl_2 1% e formaldeído 5% em tampão fosfato (PBS). A cada poço da placa foi adicionado 200 μL de ácido acético 1% em etanol a 50% para a solubilização do corante. A placa foi agitada por 20 minutos e a absorvância foi determinada em leitor de placas a 520 nm.

4.7.5 Avaliação Morfológica

Para avaliação morfológica foi realizado o plaqueamento das células em placa de 24 poços sobre lamínula, o tratamento foi realizado conforme descrito no item 4.7.2 diferindo somente na quantidade de células utilizadas (15.000 células por poço), as células foram então fixadas por 10 minutos com uma solução de PBS e formol a 2%, após isso as células foram lavadas com PBS e então foi realizada a coloração com 300 μL do corante May Grunwald por 15 minutos, os poços foram lavados com água e foi adicionado o corante Giensa por 5 minutos, o processo foi finalizado com uma nova lavagem com água.

A lamínula foi fixada sobre uma lamina para a visualização no microscópio óptico.

4.8 ENSAIOS *in vivo*

4.8.1 Cuidados éticos

Este protocolo experimental foi previamente submetido à análise e à aprovação da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). (ANEXO A).

4.8.2 Manutenção dos animais

Foram utilizados camundongos C57bl/6J tanto fêmeas como machos, de 8 a 10 semanas, com 25 ± 10 gramas de peso fornecidos pelo Biotério do setor de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPG. Esses animais foram mantidos agrupados em gaiolas plásticas em sala climatizada a temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro e escuro de 12 horas, onde permaneceram durante todo o experimento. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecidas *ad libitum*.

Os procedimentos seguiram as normas de conduta com pesquisa animal e foram realizados após a autorização do comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.8.3 Implante das células tumorais

A linhagem de células B16F10 (melanoma murino) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa (37°C) com atmosfera de 5% de dióxido de carbono, até confluência.

Para o implante das células os camundongos C57bl/6J tiveram a região posterior do dorso tricostomizada. As células B16F10 (5×10^4) foram injetadas no dorso dos camundongos. Para este procedimento não foi necessário o uso de anestésicos, pois estes roedores não apresentam inervação subcutânea portanto não sendo um processo doloroso ao animal. Este tipo de tumor possui um crescimento acelerado sendo visível em menos de 10 dias do implante (OTAKE *et al.*, 2010).

4.8.4 Parâmetros macroscópicos do crescimento tumoral

Após o desenvolvimento visível e palpável do tumor implantado, cerca de 10 dias após a injeção das células, a massa corporal e o volume do tumor foram diariamente medidos. A massa corporal é um critério importante para avaliação do desenvolvimento do tumor, pela massa pode-se acompanhar, por exemplo, se está ocorrendo processo de caquexia (OTAKE *et al.*, 2010). O volume foi obtido em mm^3 utilizando a equação 3.

Volume Tumoral = Medida longitudinal (mm) x [medida transversal (mm)]² x 0,52
(Equação 3)

4.8.5 Tratamento dos Animais

Depois de 10 dias da implantação das células de melanoma, os animais foram divididos em 4 grupos, como segue: (1) não tratados – Grupo controle; (2) tratados com as nanocápsulas vazias – Grupo veículo; (3) tratados com 5 mg.Kg/dia de resveratrol livre – Grupo fármaco livre; (4) tratados com 5 mg.Kg/dia de fármaco contido nas nanocápsulas – Grupo nanocápsulas com fármaco, utilizando um n de 8 animais por grupo. Os tratamentos foram administrados nos animais por via intraperitoneal uma vez por dia durante 10 dias consecutivos. Depois de 21 dias (10 dias do implante das células de melanoma + 11 dias de tratamento) os animais foram sacrificados e foram retirados os seguintes órgãos: Cérebro, Fígado, Pulmão e Baço.

Para a análise do peso corporal, os grupos testados foram comparados ao grupo controle.

4.8.6 Análise Histológica

Após o sacrifício dos animais foram retirados os órgãos (cérebro, fígado, baço e pulmão) e o tumor para a análise histológica. Todas as amostras foram imediatamente acondicionadas em recipientes de vidro contendo o fixador Alfac (composto por 85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético) elas permaneceram nessa solução por um período de 12 horas para que ocorresse a insolubilização das proteínas e para manter os tecidos com uma estrutura semelhante a observada no organismo vivo. Logo após as amostras foram transferidas para um recipiente contendo álcool 70%.

Em seguida foi realizada a desidratação das amostras, passando por soluções alcoólicas crescentes que foram de 70% a absoluto. Após essa etapa foram realizados dois banhos em xilol por 30 minutos para que ocorresse o clareamento do material a ser analisado.

Seguido do clareamento foi realizada a inclusão das amostras em parafina, o material foi mergulhado em parafina fundida em estufa a 60° C para que ocorresse a evaporação do xilol e os espaços fossem preenchidos pela parafina. Na sequência foram montados pequenos blocos.

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo com espessura de 5 µm, em seguida os cortes foram colocados em lâminas e levados à estufa a 37° C para secagem. Após a secagem foi realizada a desparafinização em xilol, seguido da hidratação com lavagens em soluções alcoólicas decrescentes, procedendo então a coloração convencional com hematoxilina-Eosina (HE).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente através do teste ANOVA de 1 via, com análise posterior pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os testes foram realizados utilizando o programa Graph Pad - Prism Stat, versão 3.0 (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanocápsulas contendo resveratrol foram obtidas com sucesso pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. A escolha do método de preparação das nanocápsulas a partir do método de polímeros pré-formados foi motivada por possibilitar uma maior reprodutibilidade, maior segurança e ser um método que apresenta maior facilidade de transposição em larga escala (COUVREUR *et al.*, 2002).

Após o preparo as partículas apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, leitoso, brancas opalescentes e sem odor.

5.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão estão entre as análises indispensáveis no processo de caracterização das nanopartículas, podendo também ser válidas para estudos de estabilidade. Os resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanocápsulas de PCL encontram-se na tabela 4.

As formulações revelaram a presença de partículas com diâmetro médio variando entre 129,60 nm (NR-5) e 136,10 nm (NR-3), o que pode ser considerado satisfatório. Não foi observada diferença significativa entre o diâmetro da nanocápsula controle e as formulações que continham resveratrol, assim sendo pode-se dizer que a incorporação de resveratrol não altera significativamente o tamanho das partículas.

Os resultados obtidos apresentaram valores menores de tamanho de partícula quando comparado com o estudo realizado por Figueiró *et al.* (2013) que utilizaram o mesmo método de preparação e o mesmo polímero, o valor obtido para as partículas foi de 240 nm. E segundo Ober e Gupta (2011), quando se produzem nanopartículas com o intuito de carreamento de fármacos, essas partículas devem apresentar diâmetros menores que 250 nm para que exerçam o máximo da sua eficácia.

Tabela 4- Tamanho de partícula e Índice de polidispersão* (PDL) para as nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10

Formulação	Índice de polidispersão (PDL)	Tamanho de partícula (nm)
NR-0	0,20 ± 0,01	130,60 ± 4,79
NR-3	0,19 ± 0,04	136,10 ± 4,23
NR-5	0,16 ± 0,03	129,60 ± 5,38
NR-10	0,17 ± 0,01	132,80 ± 3,66

* Média (n = 3) ± desvio padrão

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade da amostra, de modo que os resultados para essa análise devem sempre variar entre 0 e 1. As amostras monodispersas são assim classificadas quando apresentam valores próximos a 0. Quando os valores encontrados são maiores ou próximos a 0,5, indicam que a amostra possui dispersão heterogênea (AVADI *et al.*, 2010).

As suspensões apresentaram valores de índice de polidispersão variando entre 0,16 (NR-5) e 0,2 (NR-0) podendo ser caracterizada como uma dispersão monomodal. Demonstrando assim, que houve pouca variação de tamanho entre as partículas já que o resultado encontrado foi baixo considerando uma escala com valores entre 0,0 e 1,0.

5.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é um importante indicador de estabilidade de partículas em suspensão, podendo-se dizer que quanto maior for o seu valor absoluto, mais estável será o sistema formado (JAIN; SARAF, 2009).

Grande parte das partículas obtêm cargas elétricas quando entram em contato com um líquido, essas cargas são causadas pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula e do meio dispersante (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), a característica de estabilidade da formulação está relacionada com a repulsão eletrostática entre as partículas, sendo que, quanto maior o potencial zeta mais interações repulsivas ocorrem entre as

partículas, isso leva à formação de nanopartículas mais estáveis (FROZZA *et al*, 2010; JAIN; SARAF, 2009).

As nanocápsulas apresentaram valores de potencial zeta que variaram de -39,13 (NR-0) a -40,60 (NR-3) como demonstrado na tabela 5. Todas as amostras apresentaram valores negativos, o que pode estar relacionado com a PCL, pois poliésteres conferem potencial negativo à interface devido a presença de grupos carboxílicos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

De uma maneira geral as partículas são declaradas estáveis quando apresentam valor absoluto de potencial zeta próximo a 30 mV, ao mesmo tempo que potenciais próximos a 0 mV podem levar à floculação da amostra mais facilmente (NEVES *et al*, 2013).

Tabela 5 – Valores de Potencial zeta* para as nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10

Formulação	Potencial Zeta
NR-0	-39,13 ± 7,02
NR-3	-40,60 ± 0,69
NR-5	-40,20 ± 1,73
NR-10	-39,63 ± 5,22

* Média (n = 3) ± desvio padrão

Todas as formulações apresentaram valores iguais ou próximos a -40 mV, demonstrando que as partículas possuem estabilidade em suspensão, os resultados também sugerem que o resveratrol não alterou de forma significativa o potencial das partículas.

5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para obtenção desses resultados primeiramente foi realizada uma curva de calibração no intervalo de 10 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de resveratrol. A curva encontrada foi linear, a equação da reta representativa da linearidade foi $y = 1,87 \times 10^5 x - 2,37 \times 10^5$ (n = 3, $r = 0,993080$).

A eficiência de encapsulação do resveratrol nas nanocápsulas foi determinada pelo método indireto, e os resultados obtidos estão descritos na tabela 6. Os resultados obtidos para eficiência de encapsulação foram bastante adequados, apresentando valores maiores que 97% para todas as

formulações. Esses resultados comprovam que a maior parte do fármaco se encontra associada a nanopartícula.

Estes valores podem ser justificados, principalmente, pela polaridade do resveratrol, que resultou em um aumento da concentração de fármaco no interior na nanocápsula.

As partículas não apresentaram variação significativa de eficiência de encapsulação entre as formulações, sugerindo que podem ser utilizadas concentrações mais elevadas de resveratrol na formulação, sem que haja perda de fármaco.

Tabela 6- Eficiência de encapsulação* do Resveratrol nas nanocápsulas

Formulação	Eficiência de Encapsulação (EE%)
NR-0	-
NR-3	98,46 ± 0,14
NR-5	97,37 ± 0,35
NR-10	98,44± 0,35

* Média (n = 3) ± desvio padrão

Jose *et al.* (2014) citaram valores de eficiência de encapsulação para nanopartículas lipídicas sólidas contendo resveratrol que variaram de 3,68% a 37,21%, as partículas foram preparadas pelo método de evaporação do solvente empregando homogeneização em alta velocidade.

Nemen e Lemos-Senna (2011) obtiveram suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol, e relataram valores de eficiência de encapsulação que variaram de 20,63% a 85,28%. Já Figueiró *et al.* (2013) ao elaborarem nanocápsulas contendo resveratrol pelo processo de deposição interfacial de polímero pré-formado, obtiveram valores de eficiência de encapsulação de 99%.

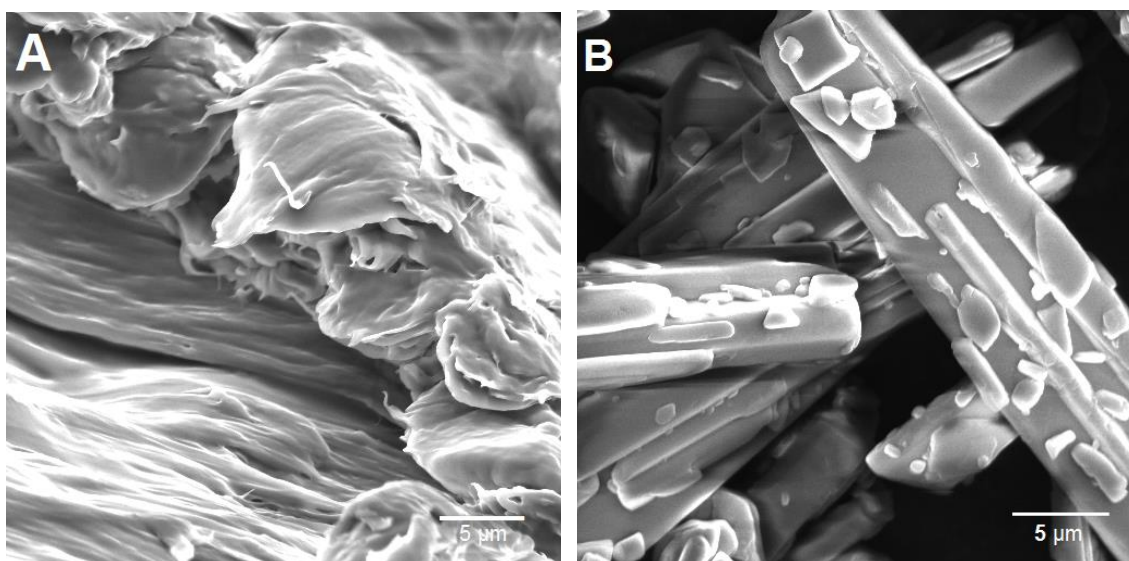
Dessa forma, as nanocápsulas em estudo apresentam valores condizentes com a literatura, considerando as características físico-químicas do fármaco e o método de obtenção empregado. Também, comparando-se os métodos de preparação, o de deposição interfacial do polímero pré-formado resulta em uma maior porcentagem de fármaco encapsulado, quando avaliado frente aos outros descritos na literatura.

Com base nos resultados encontrados para tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação, a formulação de escolha para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foi a NR-10, por apresentar uma maior concentração do fármaco o que possibilitou a utilização de volumes menores da suspensão tanto no tratamento *in vitro*, como nas doses administradas no experimento *in vivo*.

5.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE

Os resultados obtidos por FEG para o polímero (PCL) e para o resveratrol estão indicados na Figura 4. Foi observado que o fármaco (Figura 4 B) apresentou uma morfologia cristalina, já os péletes de PCL (Figura 4 A) apresentaram superfície levemente irregular.

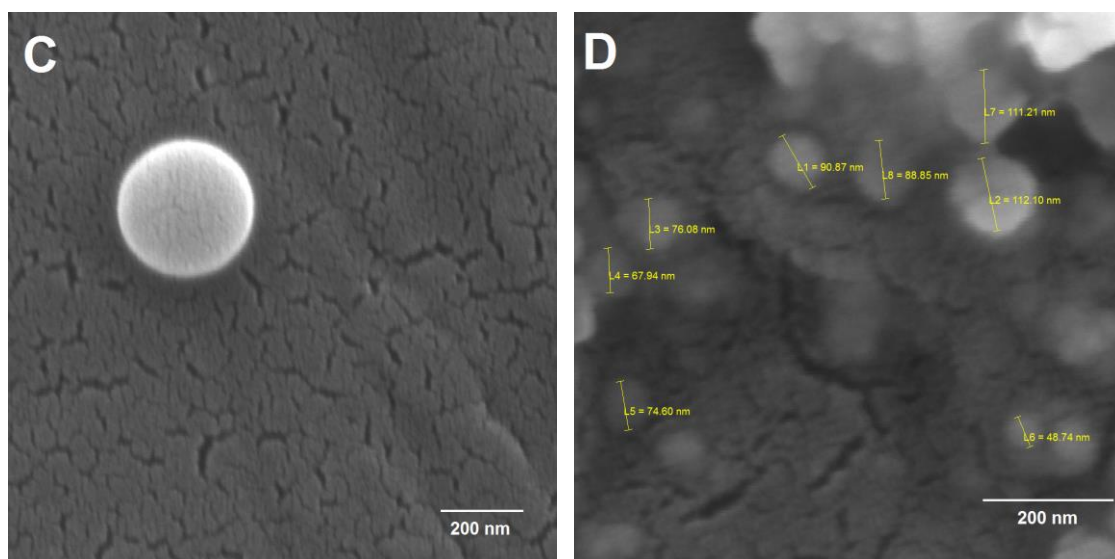
Figura 4 – Aspectos morfológicos da PCL (A) e do Resveratrol puro (B) por FEG, aumento de 4 kx



As fotomicrografias obtidas das nanocápsulas estão apresentadas na Figura 5. As imagens obtidas revelaram que as partículas formadas possuem formato esférico, com superfície lisa e regular, sem a presença de poros (Figura 5 C).

Não foi observada a presença de cristais de resveratrol na superfície das partículas, confirmando também que a maior concentração de fármaco encontra-se associado à estrutura da nanocápsula.

Figura 5- Fotomicrografias das nanocápsulas obtidas por FEG nos aumentos de 200 kx (C) e 330 kx (D)

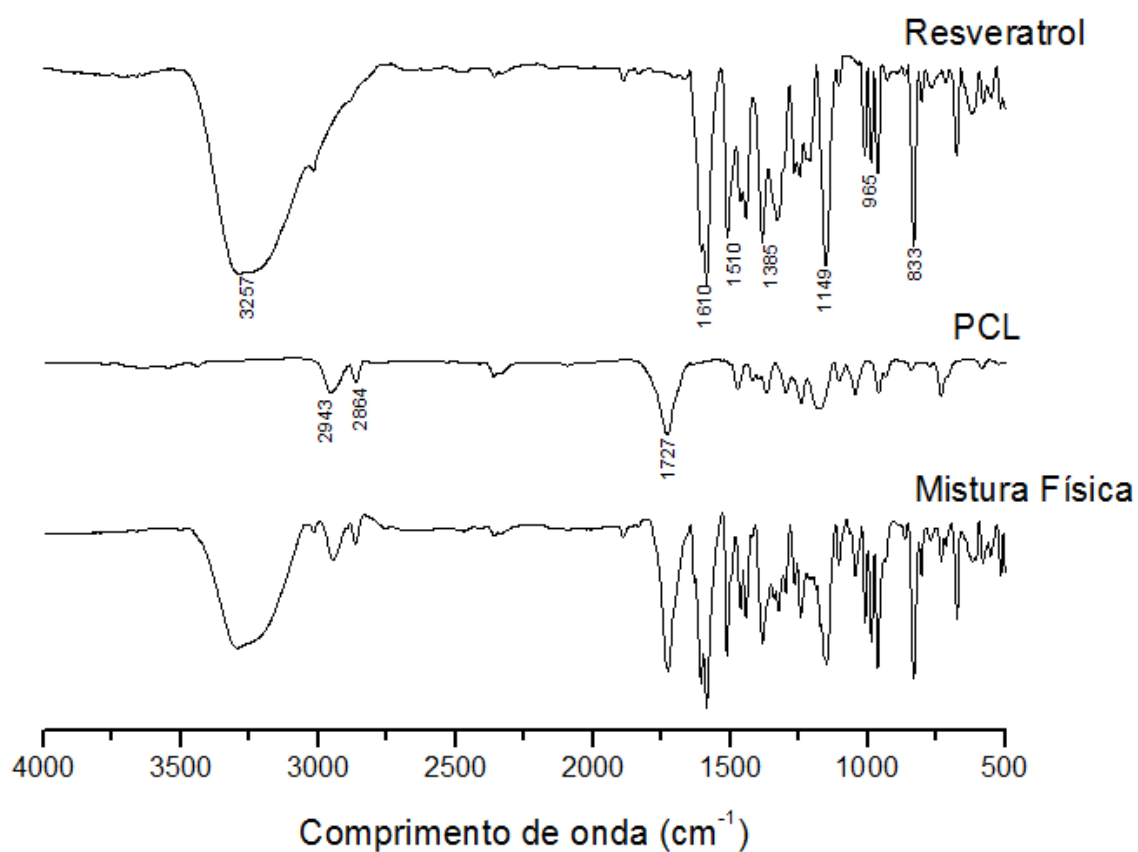


5.5 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV-TF)

Os espectros de IV-TF do resveratrol puro, da PCL, da mistura física (resveratrol:PCL) e das formulações NR-3, NR-5, NR-10 e NR-0 estão apresentados nas Figuras 6 e 7. O espectro de IV-TF do fármaco indicou uma banda larga típica referente à vibração de deformação axial do grupamento OH em 3257 cm^{-1} e três bandas de intensidade alta em 1385 , 1510 e 1610 cm^{-1} decorrentes das vibrações de deformação axial das ligações duplas C=C aromáticas, de C-C e de C-O. A banda típica dos carbonos olefínicos *trans* foi observada em 965 cm^{-1} , o que comprova que o fármaco se encontra na sua forma ativa da molécula (SHI *et al.*, 2008).

O espectro infravermelho da PCL exibiu 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 variações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$, respectivamente (POLETTTO *et al.*, 2007). O espectro da mistura física, como esperado, revelou a sobreposição das bandas características para o fármaco e para o polímero puro.

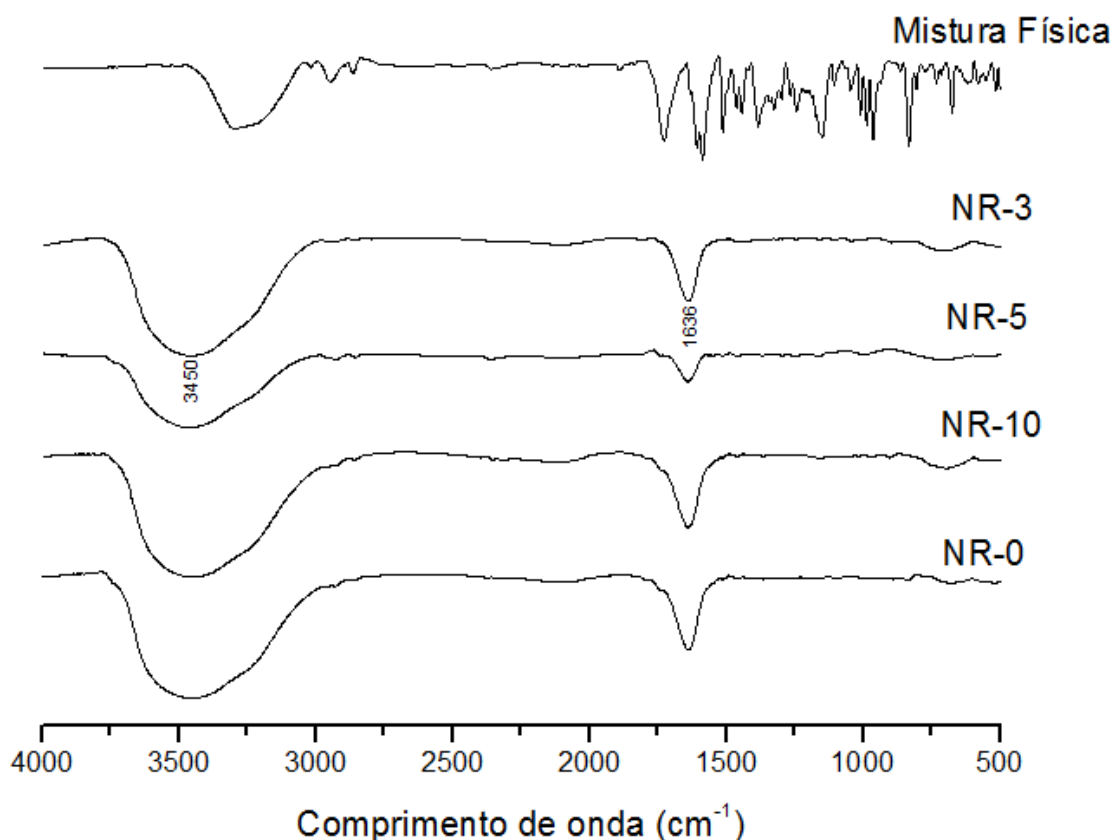
Figura 6- Espectros IV-TF do resveratrol, da PCL e da mistura física (resveratrol:PCL)



Os espectros obtidos para as nanocápsulas de PCL apresentaram duas bandas de absorção, uma em 3450 cm^{-1} referente à vibração de deformação axial do grupamento OH e uma banda em 1636 cm^{-1} correspondente a vibração de deformação axial do grupamento C=O.

Portanto, é possível estabelecer que nenhuma interação química entre o fármaco e o polímero foi formada durante o processo de nanoencapsulação.

Figura 7- Espectros IV-TF da mistura física (resveratrol:PCL) e das nanocápsulas NR-3, NR-5, NR-10 e NR-0

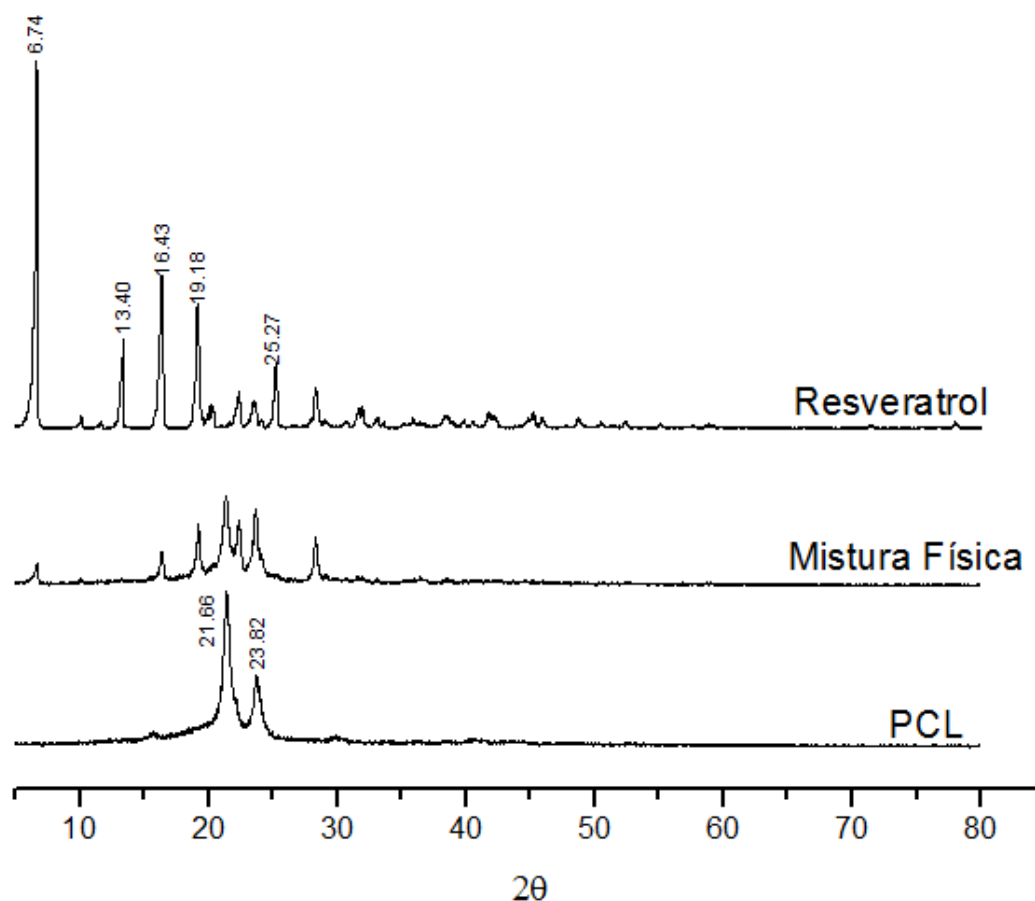


5.6 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

As Figuras 8 e 9 revelam os resultados obtidos por difração de raios X para o resveratrol puro, para PCL, para a mistura física e para as nanocápsulas (NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10). No caso do fármaco puro, foram observados diferentes picos relacionados com a sua estrutura cristalina, sendo que os picos principais aparecem em $2\theta = 6,74^\circ$, $13,40^\circ$, $16,46^\circ$, $19,18^\circ$ e $25,27^\circ$ confirmando a natureza cristalina do resveratrol.

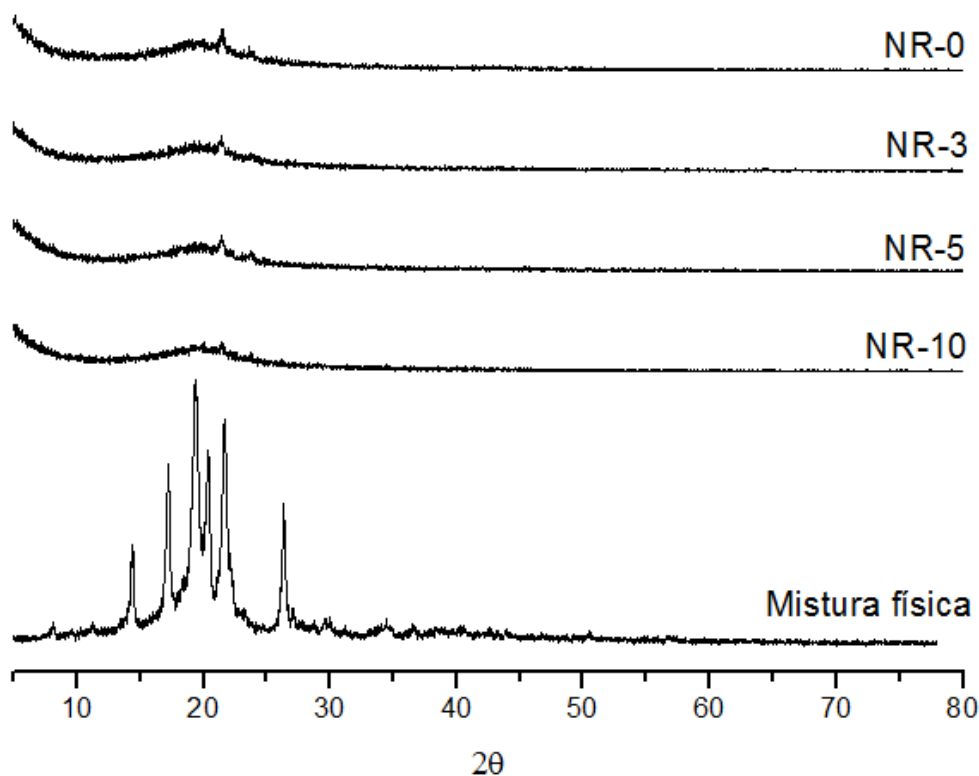
A PCL apresenta um comportamento relativamente menos cristalino, foram observados dois picos de difração em $21,4^\circ$ e $23,8^\circ$. A mistura física revelou um perfil de difração decorrente da sobreposição dos picos de difração cristalina do resveratrol e da PCL.

Figura 8 – Difratomogramas do resveratrol puro, da PCL e da mistura física resveratrol:PCL



Os resultados de DRX demonstraram que o procedimento de nanoencapsulação levou a uma redução expressiva da intensidade dos picos de difração cristalina do resveratrol e da PCL, caracterizando as formulações obtidas como amorfas (Figura 9). A obtenção de nanocápsulas contendo resveratrol na forma de suspensão amorfa, em comparação com as formas cristalinas encontradas no material de partida, pode contribuir com o processo de dissolução, especialmente porque o resveratrol possui baixa solubilidade em meio aquoso.

Figura 9 – Difratomogramas da mistura física resveratrol:PCL e das nanocápsulas NR-0, NR-3, NR-5 e NR-10



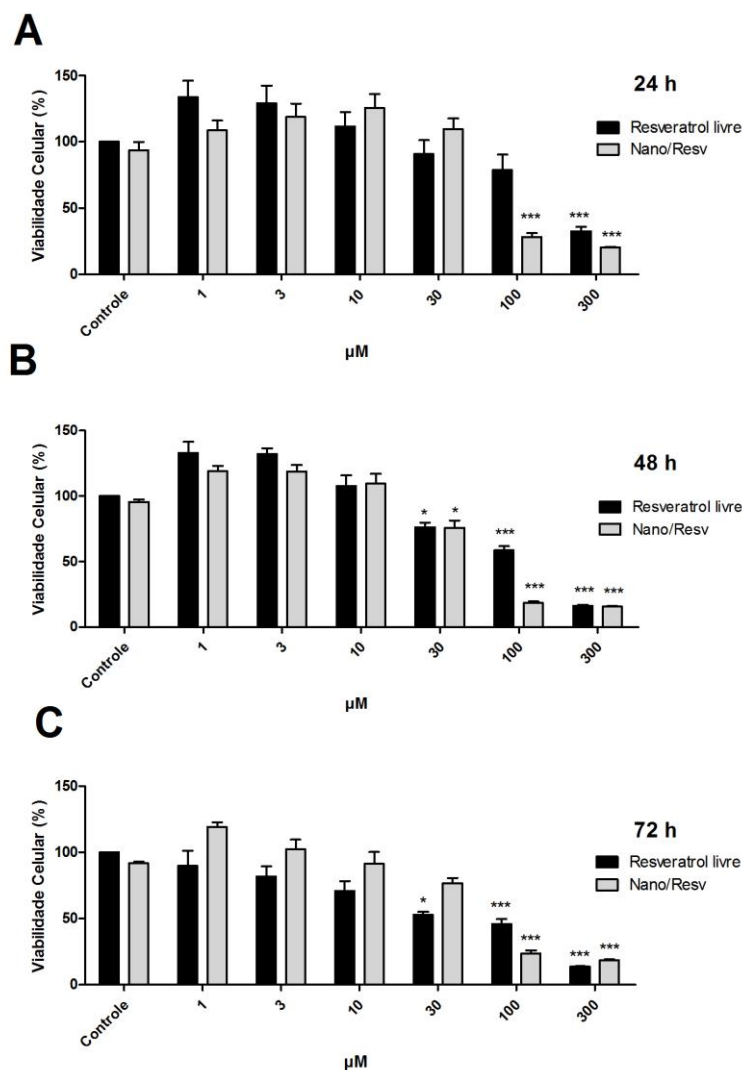
5.7 ESTUDO *IN VITRO*

5.7.1 Viabilidade celular pelo ensaio de MTT

Para avaliar o efeito do resveratrol livre e das nanocápsulas contendo resveratrol sobre a viabilidade das células de melanoma murino B16F10, foi realizado o ensaio de MTT nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a incubação com as amostras nas concentrações descritas no item 4.7.2 do material e métodos.

Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 10. A Figura 10 mostra que as concentrações de 300 μ M tanto do resveratrol livre como encapsulado diminuíram significativamente a viabilidade celular a partir de 24 horas, sendo que a maior redução ocorreu em 48 horas para as nanocápsulas com uma viabilidade de aproximadamente 15% e em 72 horas para o resveratrol livre com aproximadamente 13%.

Figura 10 – Efeito do resveratrol livre e das nanocápsulas contendo resveratrol na viabilidade celular de células de melanoma B16F10 pelo ensaio de MTT nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C)



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$) de três experimentos independentes e apresentam diferença significativa em relação ao controle * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Na concentração de 100 μM também foi observada diminuição da viabilidade com valores significativos em todos os tempos para as nanocápsulas contendo resveratrol e nos tempos de 48 e 72 para o fármaco livre, o tempo que apresentou maior redução nessa concentração foi de 48 horas para as nanocápsulas com uma porcentagem de aproximadamente 18% e 45% para o resveratrol livre no tempo de 72 horas.

A concentração de 30 μM apresentou redução significativa no tempo de 48 horas para os dois grupos com aproximadamente 75% da viabilidade e no tempo de 72 horas para o fármaco livre com aproximadamente 53%.

As nanocápsulas na concentração de 100 μM apresentaram diferença significativa quando comparada ao resveratrol livre na mesma concentração nos tempos de 24 e 48 horas, apresentando diferenças de aproximadamente 50,53% entre os grupos no tempo de 24 horas e em 48 horas aproximadamente 40,11%, o que demonstra que as nanocápsulas exercem maior efeito sobre viabilidade das células de melanoma na concentração de 100 μM quando comparado ao fármaco livre.

Com esses dados é possível observar que tanto o resveratrol livre quanto as nanocápsulas carregadas com resveratrol alteram a viabilidade das células B16F10, sendo que as concentrações de 300 μM e 100 μM foram as que apresentaram melhores resultados, ou seja o processo de nanoencapsulação mantém o efeito do fármaco, e o potencializa na concentração de 100 μM .

O efeito de nanopartículas contendo resveratrol foi avaliado por Figueiró *et al.* (2013), que estudou a ação das partículas sobre uma linhagem de glioma, e obteve resultados positivos apresentando redução significativa na viabilidade celular, nas concentrações de 15, 25 e 50 μM , com porcentagens de 71,06%, 39,49% e 28,26% respectivamente.

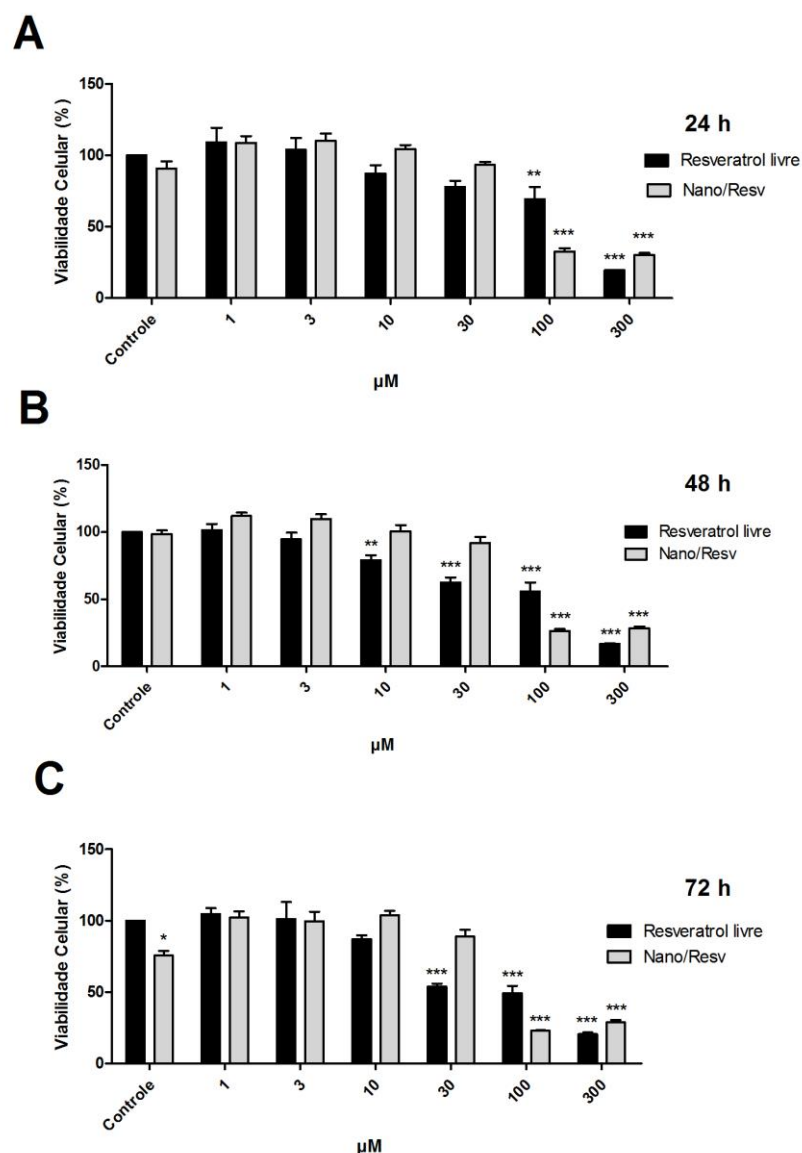
O resveratrol livre apresentou ação positiva em linhagens celulares de câncer de próstata LAPC4, CWR22, LNCaP, PC3 e DU145 segundo estudo realizado por Osmond *et al.* (2013). Já a linhagem Caco-2 não apresentou redução significativa da viabilidade celular quando tratada com nanoemulsão contendo resveratrol (SESSA *et al.*, 2014).

Células de melanoma da linhagem SK-Mel-5 apresentaram porcentagem de viabilidade de 56% quando tratadas com resveratrol livre (FANG *et al.*, 2013).

5.7.2 Viabilidade celular pelo ensaio de vermelho neutro

O teste de viabilidade celular por vermelho neutro, é um método largamente utilizado para avaliar a toxicidade de substâncias a nível lisossomal e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Efeito do resveratrol livre e das nanocápsulas contendo resveratrol na viabilidade celular de células de melanoma B16F10 pelo ensaio de vermelho neutro nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C).



Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$) de três experimentos independentes e apresentam diferença significativa em relação ao controle * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey.

Os resultados confirmaram que tanto o resveratrol livre como as nanocápsulas carregadas com resveratrol possuem efeito citotóxico

significativo nos três tempos estudados nas concentrações de 300 e 100 μM , a concentração de 30 μM da solução de resveratrol livre apresentou efeito citotóxico significativo nos tempos de 48 e 72 horas, e a concentração de 10 μM em 72 horas.

A concentração de 100 μM das nanocápsulas carregadas com resveratrol também apresentou um aumento da citotoxicidade quando comparada com a mesma concentração do fármaco livre.

Esses resultados confirmam os valores encontrados para o ensaio de MTT. Pode-se dizer então, que as nanocápsulas contendo resveratrol apresentam efeito citotóxico nas células de melanoma murino, reduzindo significativamente a sua viabilidade nas maiores concentrações testadas, apresentam redução na mesma faixa de concentração que o fármaco livre, porém na concentração de 100 μM sua atividade é mais pronunciada.

5.7.3 Análise morfológica

A análise morfológica ocorreu por meio de micrografias, que estão apresentadas na Figura 12 e revelam as alterações celulares encontradas nas células de melanoma murino quando tratadas com solução de resveratrol.

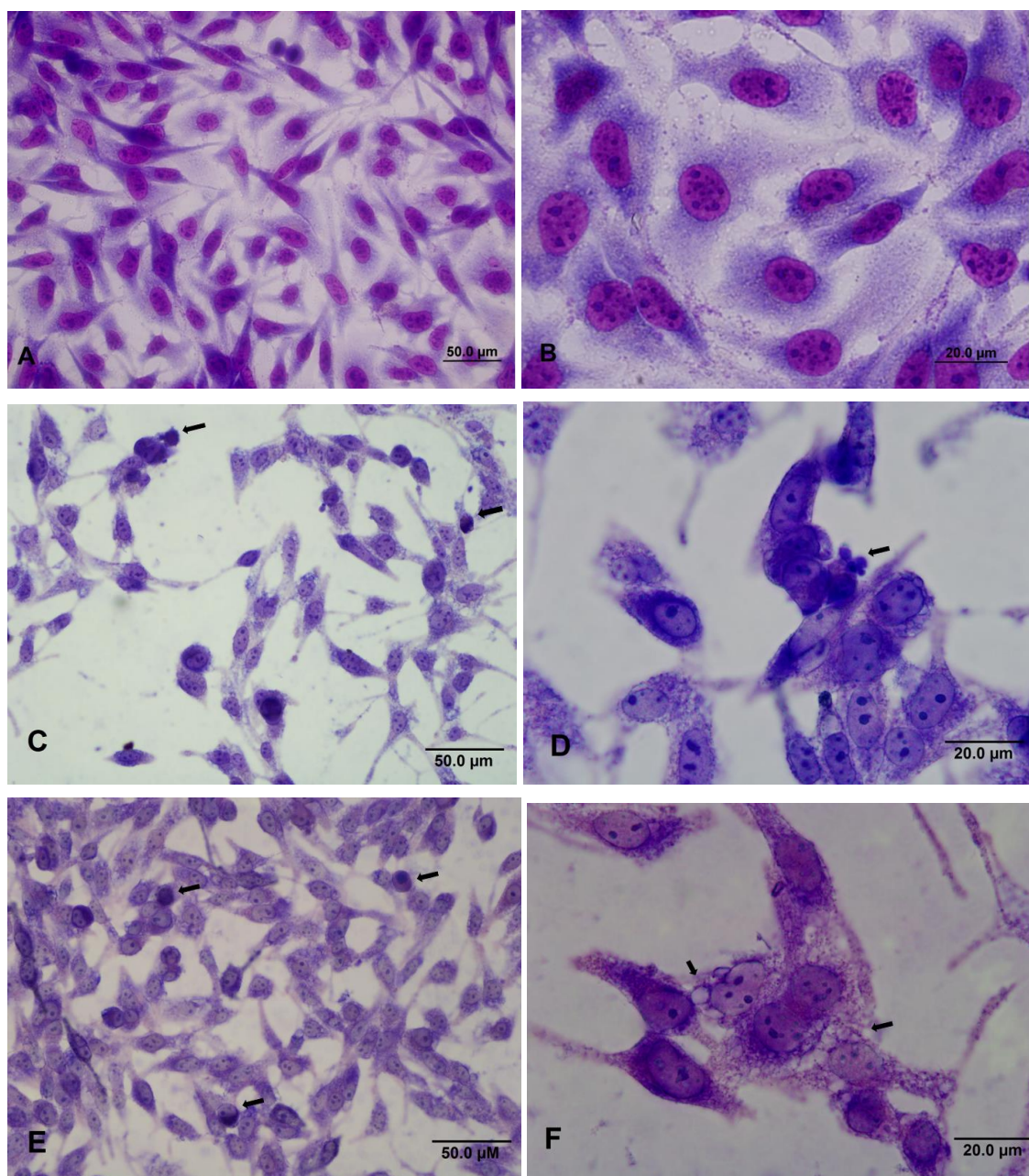
Verificou-se nas células tratadas retração do citoplasma, com a morfologia celular se tornando arredondada (Figura 12 imagens C, E, G, I, K e M) quando comparadas com as células controle (Figura 12 imagens A e B), esta é a alteração mais evidente encontrada nos tratamentos, o que pode sugerir que as células entraram em processo de morte celular por apoptose, por perda da adesão, uma vez que ocorre retração do citoplasma, com diminuição dos prolongamentos celulares, indicando perda dos pontos de adesão.

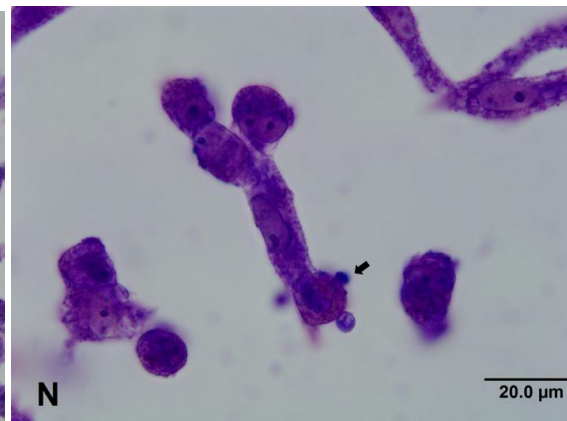
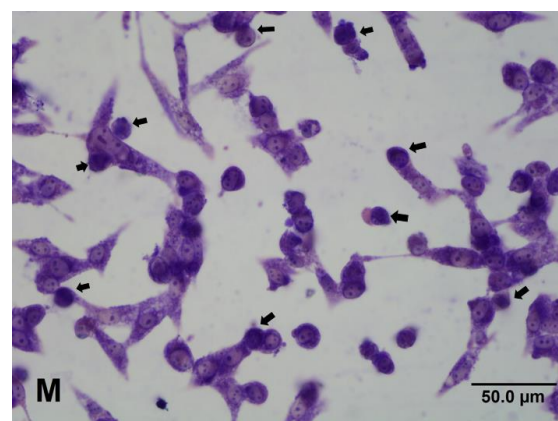
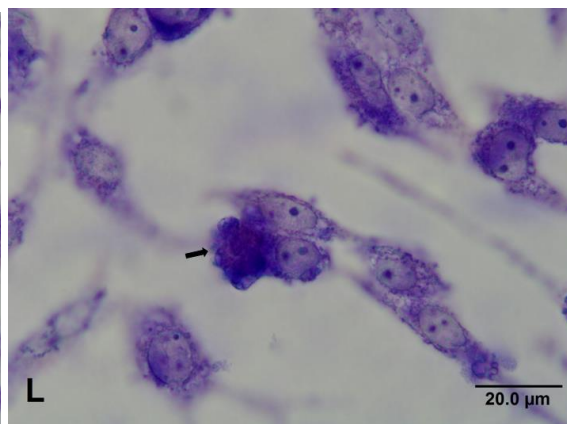
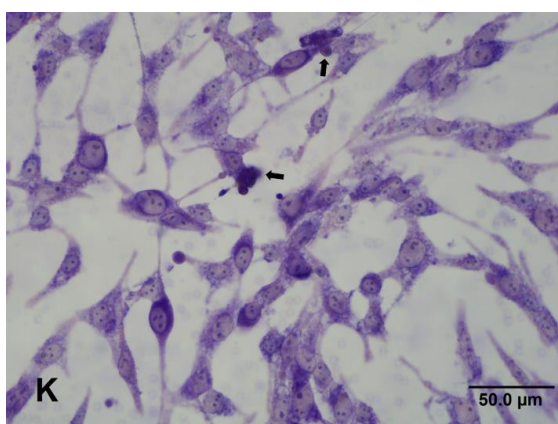
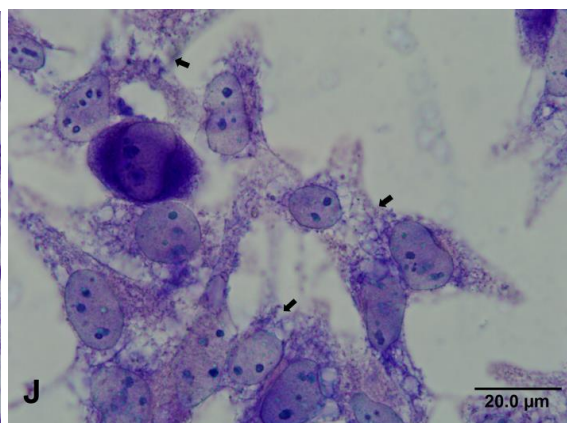
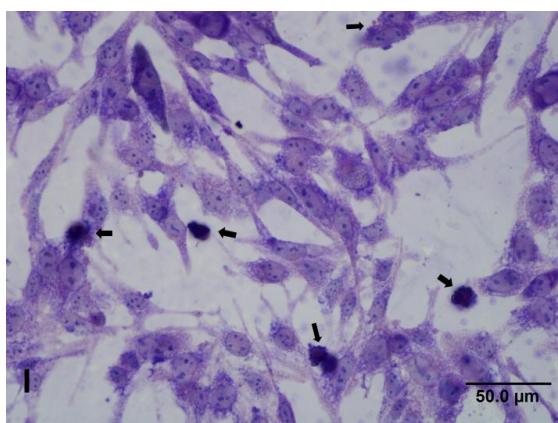
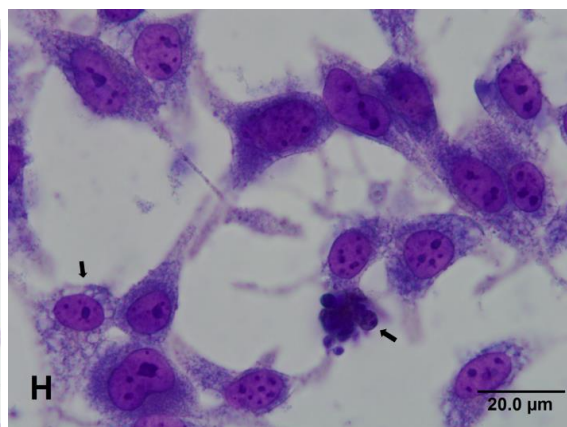
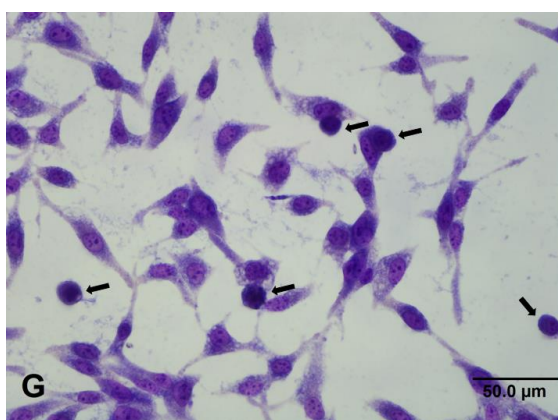
Pode-se observar também, vacúolos no citoplasma, sendo mais evidente nas células tratadas com a solução de resveratrol nas concentrações de 3, 10 e 30 μM (Figura 12 imagens F, H e J) e em menor intensidade nas células tratadas com 1 μM de resveratrol (Figura 12 imagens C e D).

Foram encontradas alterações celulares em todos os grupos tratados, mas essas alterações se tornaram mais evidentes a medida que a concentração de resveratrol foi aumentando, assim a concentração de 300 μM

da solução de resveratrol (Figura 12 imagens M e N) foi a que apresentou alterações mais significativas apresentando um elevado número de células arredondadas, processo característico de anoikis, sugerindo que são células em processo de morte celular.

Figura 12- Efeito do resveratrol livre na morfologia das células de melanoma murino B16F10. Micrografias das células controle nos aumentos de 40X (A) e 100X (B), células tratadas com 1 μ M nos aumentos de 40X (C) e 100X (D), células tratadas com 3 μ M nos aumentos de 40X (E) e 100X (F), células tratadas com 10 μ M nos aumentos de 40X (G) e 100X (H), células tratadas com 30 μ M nos aumentos de 40X (I) e 100X (J), células tratadas com 100 μ M nos aumentos de 40X (K) e 100X (L) e células tratadas com 300 μ M nos aumentos de 40X (M) e 100X (N)





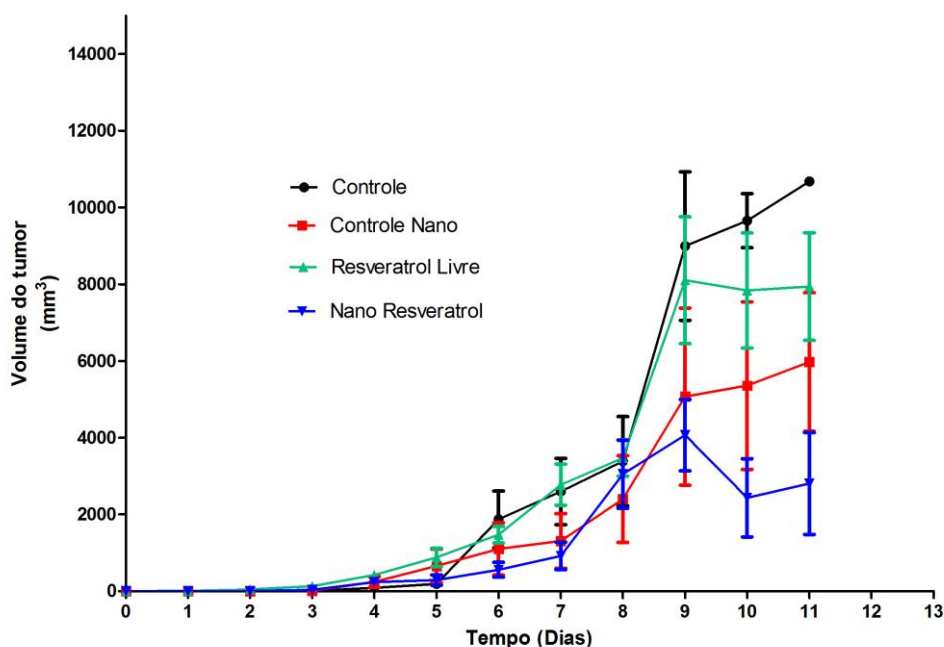
5.10 ESTUDO *IN VIVO*

5.10.1 Tamanho do tumor

Para avaliar o efeito do resveratrol livre e encapsulado sobre o crescimento tumoral do melanoma, camundongos C57BL/6J foram inoculados com 5×10^4 células de melanoma B16F10 por via subcutânea.

O crescimento tumoral durante o tratamento está apresentado na Figura 13. Os animais tratados com as nanocápsulas contendo resveratrol apresentaram uma redução significativa do volume do tumor (2807 mm^3) quando comparado ao grupo controle (9656 mm^3), mas não apresentaram diferença significativa na redução do volume tumoral nos grupos tratados com o resveratrol livre (7940 mm^3) e as nanocápsulas vazias (5971 mm^3) quando comparadas ao controle e com os grupos analisados.

Figura 13 – Gráfico do volume do tumor (mm^3) durante o tratamento com nanocápsulas contendo resveratrol, nanocápsulas vazias, resveratrol livre e controle

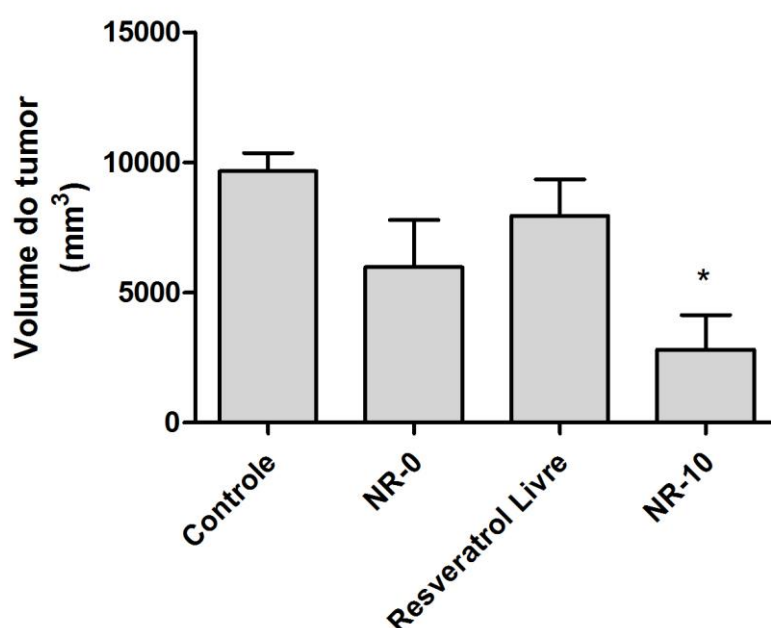


Na Figura 14 pode-se observar a comparação do volume tumoral dos animais no final do tratamento, os dados revelaram que os grupos tratados com as nanocápsulas carregadas com resveratrol apresentaram um menor aumento do volume tumoral em comparação com o controle e o grupo tratado com o resveratrol livre.

Alguns animais apresentaram crescimento interno do tumor, impossibilitando a medição do volume do tumor.

O crescimento de melanoma uveal foi avaliado em um estudo realizado por van Ginkel *et al.* (2008), que utilizou tratamento com resveratrol livre através de injeção peritumoral do fármaco, e observaram que houve morte celular e regressão tumoral. Enquanto nanopartículas, contendo resveratrol apresentaram uma redução significativa do tamanho tumoral de glioma quando comparada ao fármaco livre em estudo realizado por Figueiró *et al.* (2013).

Figura 14- Volume do tumor de camundongos C57Bl/6J portadores de melanoma, tratados com doses diárias de 5 mg/kg/dia de resveratrol livre, encapsulado e seus controles, no final do tratamento.



Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA “one-way” seguido por *post hoc* de Tukey. * Diferença significativa entre o grupo controle $p < 0,05$.

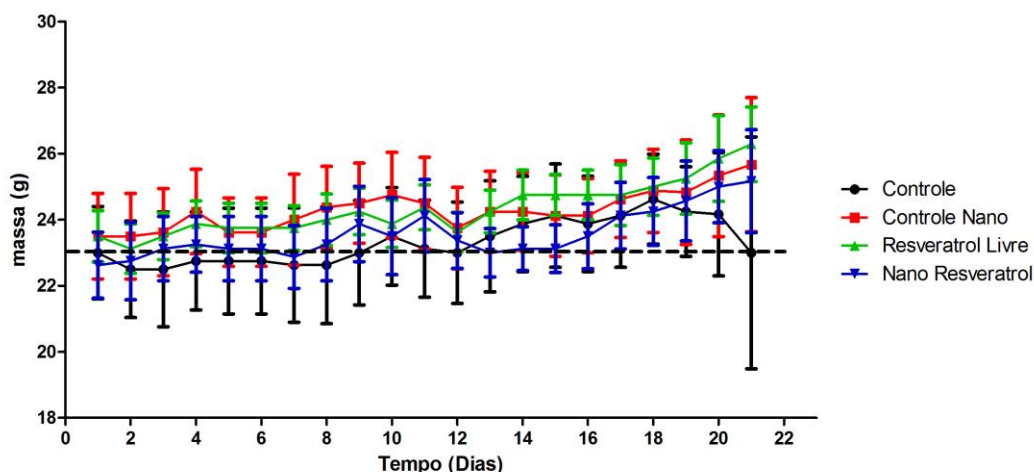
5.10.2 Massa corporal dos camundongos portadores de Melanoma

O peso dos animais durante o experimento estão apresentados na Figura 15. Esse resultado dá indícios se o animal entrou em estado de

caquexia, que é uma complicação frequente em pacientes que se apresentam em estágios avançados de neoplasias malignas (SILVA, 2006).

Pode-se observar que não ocorreu uma variação significativa de peso entre os grupos, sendo que o grupo tratado com o resveratrol livre foi o que apresentou peso final mais elevado com um aumento de 2,7 g do peso inicial, já o grupo tratado com as nanocápsulas contendo resveratrol apresentou aumento de 2,5 g seguido do grupo controle das nanocápsulas com um aumento de 2,1 g. O Grupo controle não apresentou ganho de peso.

Figura 15- Variação de massa corporal (g) dos camundongos durante a análise de crescimento tumoral



Para esta análise considerou-se o crescimento tumoral, pois dependendo do seu volume ele poderia interferir no peso do animal, e sendo que o grupo que apresentou maior crescimento tumoral foi o grupo controle e nesse grupo não houve ganho de peso, podemos deduzir que o animal emagreceu.

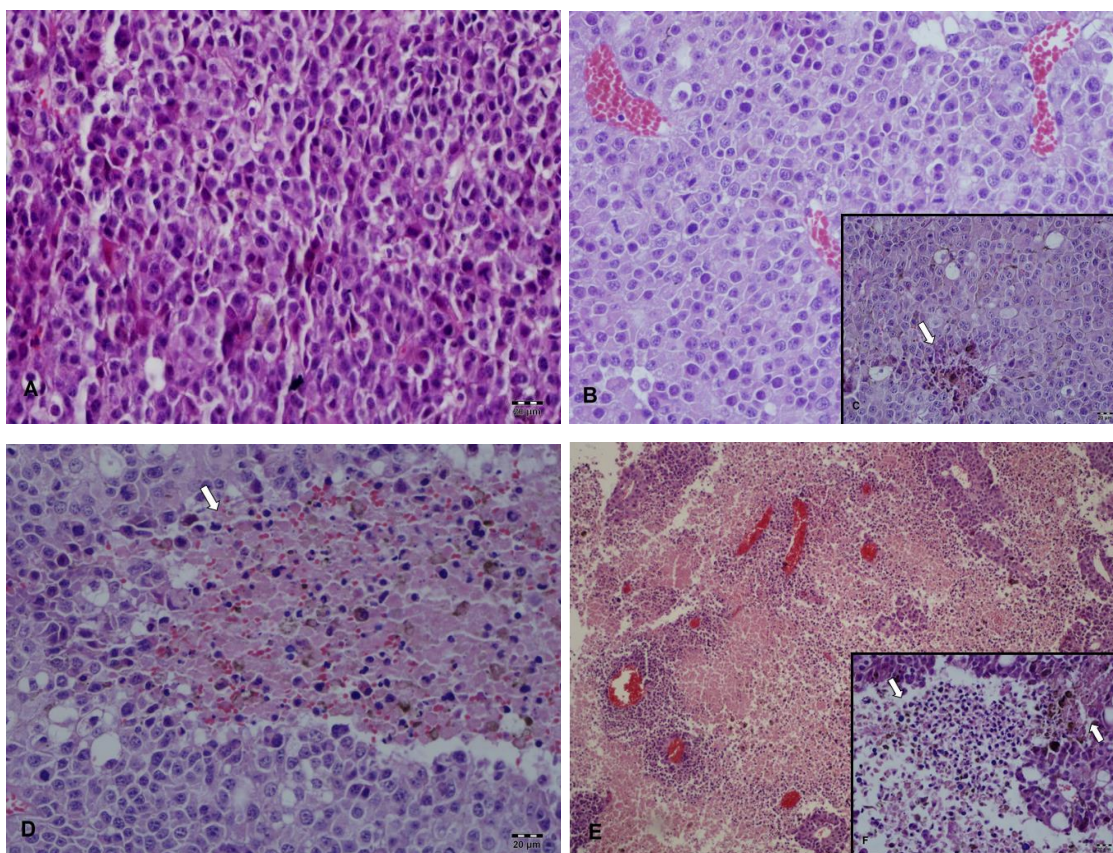
Já os grupos tratados com o resveratrol livre e as nanocápsulas contendo resveratrol apresentaram um aumento do peso o que pode ser considerado positivo, pois independente do crescimento tumoral os animais ganharam peso, o que pode sugerir que o animal estava menos suscetível às complicações geradas pela neoplasia, considerando que a perda de peso está relacionada com a redução da resposta ao tratamento, a fase em que se encontra a neoplasia e os órgãos afetados (SILVA, 2006).

5.10.3 Análise histológica

A avaliação histológica dos tumores foi realizada com o objetivo de visualizar possíveis alterações decorrentes dos tratamentos com o resveratrol livre e com as nanocápsulas contendo resveratrol (NR-10), também foram analisados o cérebro, fígado, baço e o pulmão na busca de possíveis metástases e depósitos de melanina.

Na Figura 16 pode-se observar os cortes histológicos dos tumores, nesses cortes foi avaliada a presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose, utilizando-se uma classificação para quantificação apresentada como leve, moderada ou intensa.

Figura 16- Micrografias de cortes histológicos de melanomas B16F10. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A) Controle portador de melanoma no aumento de 40X, (B e C), Controle tratado com NR-0 no aumento de 40X, (D), Tratado com resveratrol livre no aumento de 40X, (E e F), tratado com NR-10 no aumento de 10X (E) e 40X (F)



Na imagem C da Figura 16 foi observada a presença de uma pequena área necrótica no grupo tratado com as nanocápsulas controle (NR-0)

possuindo grau de inflamação leve, no grupo tratado com o resveratrol livre (Figura 16 - D) foi observado um aumento da área de necrose e inflamação podendo ser caracterizada como grau moderado, já o grupo tratado com as nanocápsulas contendo resveratrol (NR-10) apresentou um aumento expressivo das áreas necróticas como do infiltrado inflamatório sendo classificado como intenso.

Na literatura o significado tanto da necrose quanto do infiltrado inflamatório na análise histológica do melanoma é discutido entre os autores, sendo que alguns relatam que a existência de infiltração inflamatória no tumor é um bom prognóstico para o paciente e que a ausência dessas características então estaria associada a um pior prognóstico do melanoma (CLEMENTE, *et al.*, 1996).

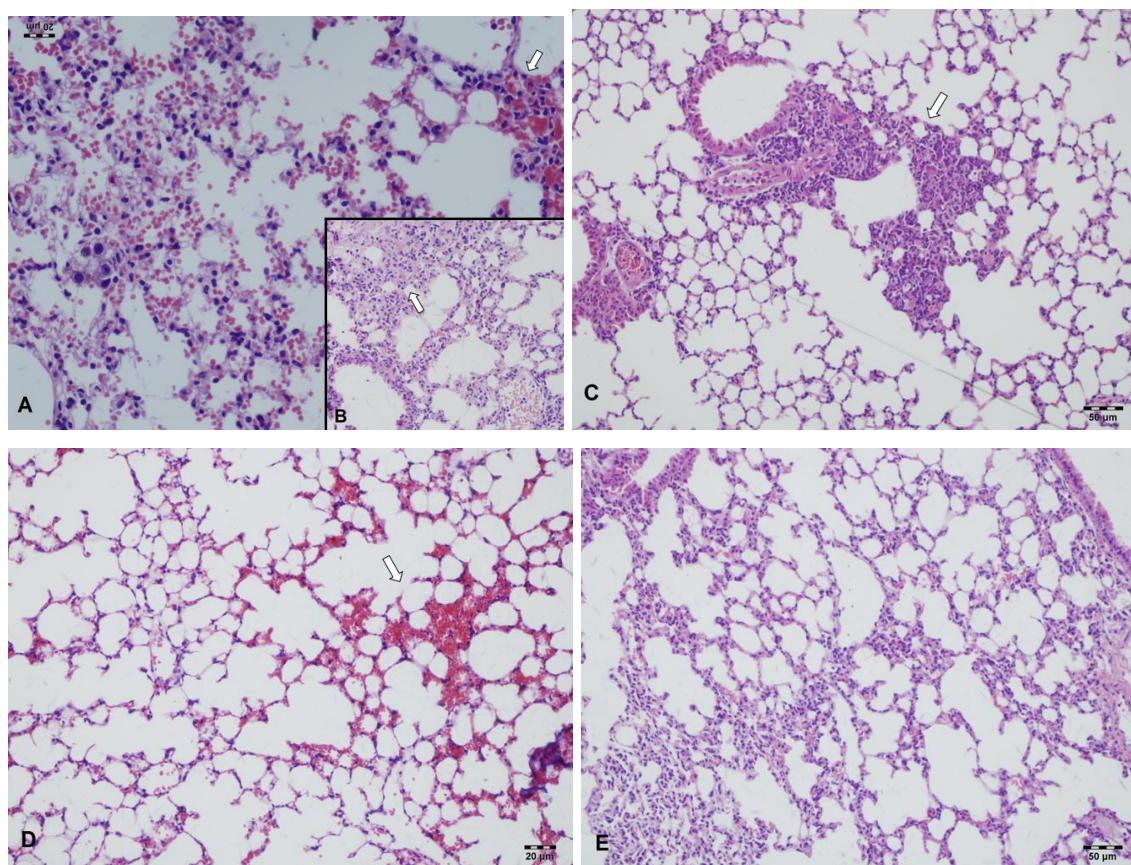
Estudos histopatológicos também revelam que a regressão tumoral do melanoma evolui do infiltrado inflamatório e que essa regressão está relacionada a um bom prognóstico para o paciente (FONTAINE, *et al.*, 2003).

A diminuição do crescimento tumoral pode ser explicada em partes pela maior área de necrose dos animais tratados com as nanocápsulas contendo resveratrol, essa morte tecidual provavelmente esteja associada à agressividade do resveratrol encapsulado direcionado e acumulado neste tumor, entretanto, Prasad *et al.* (2004) em seu estudo relata que o processo de necrose tumoral não tem influência significativa na sobrevida do paciente.

Figueiró *et al.* (2013) observou em seu estudo com modelo de glioma tratado com nanocápsulas contendo resveratrol uma redução da necrose coagulativa e edema cerebral indicando no seu estudo que o tratamento conduziu a um tumor menos invasivo com menor taxa de proliferação.

Na Figura 17 pode-se observar as alterações encontradas nos cortes histológicos de pulmão dos animais portadores de melanoma, nas imagens que são referentes ao grupo controle pode-se observar hemorragia pulmonar leve (A) e metástase (B), no grupo controle tratado com as nanocápsulas vazias (NR-0) também pode-se observar a presença de metástase pulmonar (C) mas não foi verificada a existência de hemorragia, a fotomicrografia do grupo tratado com o resveratrol livre (D) apresentou hemorragia pulmonar intensa e o grupo tratado com as nanocápsulas contendo resveratrol (E) não apresentou alterações significativas.

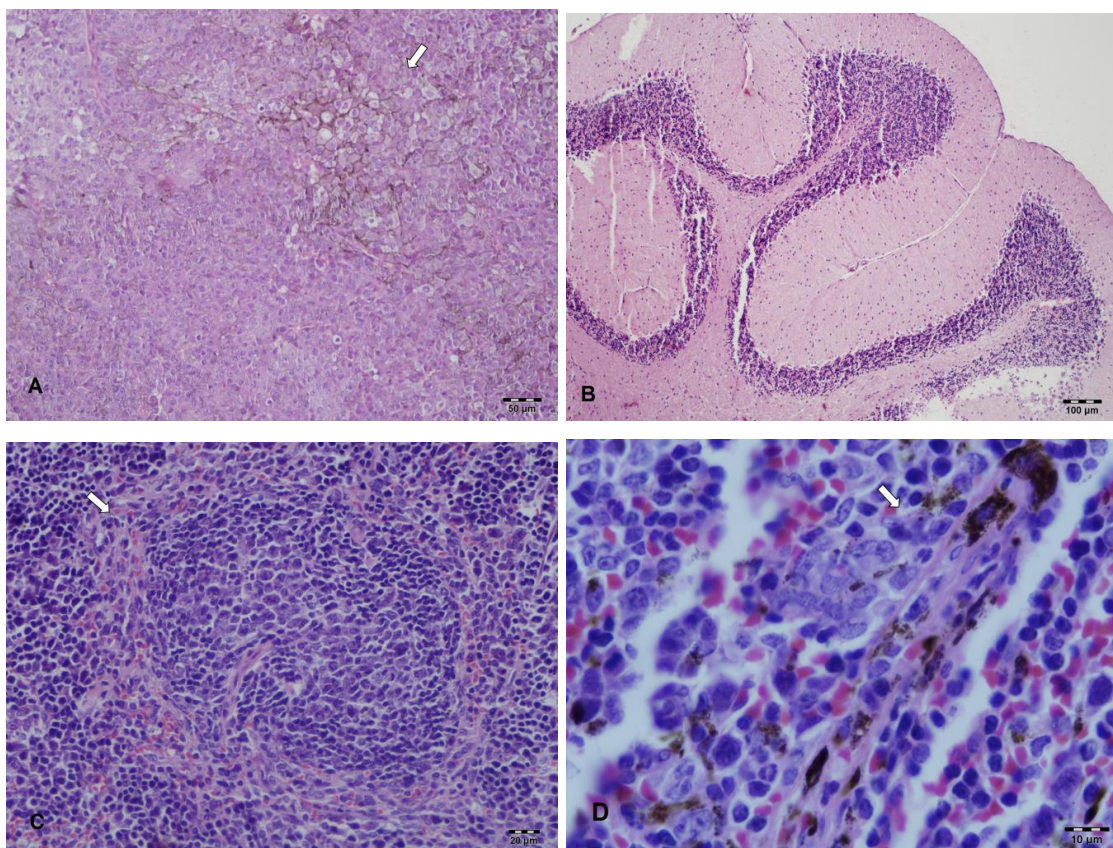
Figura 17– Micrografias de cortes histológicos de pulmões. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A e B) Controle portador de melanoma no aumento de 20X, (C) Controle tratado com NR-0 no aumento de 20X, (D) Tratado com resveratrol livre no aumento de 20X, (E) tratado com NR-10 no aumento de 20X



A ausência de hemorragia e de metástase no grupo tratado com as nanocápsulas contendo resveratrol sugere que o tratamento foi mais efetivo quando comparado aos controles e ao grupo tratado com o resveratrol livre.

Nos demais órgãos analisados foram observadas metástases em animais isolados não sendo uniforme aos tratamentos. Na imagem A da Figura 18 pode-se observar a fotomicrografia de fígado com presença de depósitos de melanina e metástase. Em nenhum animal estudado foi observada alterações significativas ou metástase encefálica (B). Nas imagens (C e D) foi observada a presença de metástase esplênica e também depósitos de melanina.

Figura 18 – Micrografias de cortes histológicos dos demais órgãos analisados. Coloração H.E. Exemplo obtido de várias amostras. (A) fígado no aumento de 20X, (B) cérebro no aumento de 10X, (C) baço no aumento de 40X, (D) baço no aumento de 100X



Diante dos resultados apresentados, pode-se afirmar que tanto o resveratrol livre, como as nanocápsulas contendo resveratrol apresentam ação positiva no tratamento *in vitro* e *in vivo* de melanoma murino, reduzindo *in vitro* a proliferação das células B16F10 e quando realizado o tratamento *in vivo* levando a uma diminuição do volume tumoral, com redução da ocorrência de metástases e também à ausência de hemorragia pulmonar.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- As nanocápsulas de PCL contendo resveratrol foram obtidas com êxito pelo método de deposição interfacial de polímero pré- formado;
- As análises realizadas para a caracterização das partículas demonstraram valores elevados de eficiência de encapsulação do resveratrol, apresentaram tamanho de partícula de 129 nm a 136 nm, com baixo índice de polidispersão e potencial zeta negativo com valores acima de 39;
- As nanocápsulas de PCL apresentaram morfologia adequada para liberação modificada de fármacos;
- O procedimento de nanoencapsulação não conduziu a formação de ligações químicas entre o resveratrol e o polímero e levou a amorfização do sistema;
- Através da análise da viabilidade celular por MTT e vermelho neutro, foi demonstrado que tanto as nanocápsulas como o fármaco livre reduzem a viabilidade das células B16F10 nas maiores concentrações e as nanocápsulas apresentam melhor resultado na concentração de 100 μ M;
- A análise morfológica das células B16F10 sugere que o resveratrol livre leva a morte celular por apoptose;
- O tratamento *in vivo* com as nanocápsulas contendo resveratrol reduziu o tamanho tumoral do melanoma e favoreceu ganho de peso dos animais quando comparado ao grupo controle.
- A análise histológica revelou que o tratamento com as nanocápsulas contendo resveratrol levou a um aumento das áreas necróticas e da infiltração inflamatória no tumor sendo a possível causa da redução do volume tumoral nesses animais, e levou a ausência de metástase e hemorragia pulmonar.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**. v.24, 2783-2840, 2004.

ALEXIS, F. et al. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, 74 – 85, 2008.

AMRI, A. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v.158, 182-193, 2012.

ANGELOVA, N.; Hunkeler, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends Biotechnol**, v.17, 409-421, 1999.

ARORA, A.; ATTWOOD, J. Common skin cancers and their precursors. **Surg Clin N Am**. v. 89, p703-712, 2009.

ATHAR, M. et al., Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.244, 274-283, 2007.

AVADI, M. R. et al., Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, v.6, 58-63, 2010.

BALCH C. M. et al., Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**. V. 27, 6199-6206. 2009.

BALIGA, M. S.; KATIYAR, S. K. chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. **Photochemistry photobiology Science**, v.5, 243-253, 2006.

BANERJEE, S.; BUESO-RAMOS, C.; AGGARWAL, B.B. Suppression of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappa B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9. **Cancer Research**. v. 62, 4945-4954, 2002.

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

BOOCK, D. J. et al. Phase I Dose Escalation Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers of Resveratrol, a Potential Cancer Chemopreventive Agent. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007, v. 16, 1246-1252, 2007.

BRIGGER, I; Dubernet, C; Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, 24- 36, 2012.

CHIELA, E. C. F. **A autofagia e o Ciclo celular Desempenham papel central no mecanismo de ação do resveratrol e do co-Tratamento com Temozolomida em células de linhagens de Glioblastoma Humano.** Dissertação (Mestrado) - Curso de PPGBMC, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CLEMENTE, C.G. et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v.77, 1303 - 1310, 1996.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule Technology: A review. **Critical review in therapeutic drug carrier system**, v.19, 99-134, 2002.

DA CRUZ, A. T. **Componentes do ciclo celular ao longo da gênese do melanoma e seus possíveis reguladores.** Dissertação (mestrado), Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2010.

DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation research**, 145-150. 2003.

DONSI, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 44, 1908-1914, 2011.

EGGERMONT, A.M.; KIRKWOOD, J.M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What we learned in 30 Years? **European Journal of Cancer**, v. 40, 1825- 1836. 2004.

EVANGELISTA, R.C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos.** Livre-docência em ciências farmaceuticas, Universidade estadual paulista, Araraquara, 2006.

FANG, Y. M. D, et al. A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. **Journal of Surgical Research**, v. 183, 645-653, 2013.

FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**. v. 1, 115-125. 2004.

FERNANDES, M. S. **Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 55, p. R1–R4, 1989.

FIGUEIRÓ, F. et al. Lípido-núcleo nanocápsulas tratamento carregados-resveratrol reduz in vitro e in vivo, o crescimento de glioma. **J Biomed Nanotechnol**, v. 3, 516-26, 2013.

FROZZA, R. L. et al., Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocápsulas and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, 694-703. 2010.

FONTAINE, D. et al. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there na association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? **Am J Dermatopathol** v.25, 371 - 376, 2003.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, 663-673. 2000.

FULDA, S., Resveratrol and derivatives for prevention and treatment of cancer. **Drug Discovery Today**, v. 15, 757-765. 2010.

GOSWAMI, S.K; DAS, D.K. Resveratrol and chemoprevention. **Cancer Letters**. v. 284, 1-6, 2009.

GOTO, P.L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por inversão de fases**. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, 851-857. 2007.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chem Phys Lipids**. v.165, 454-461, 2012.

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

HAASS, N. K.; SMALLEY, K.S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, 309-318, 2004.

HARIKUMAR, K.B; AGGARWAL, B.B. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**. v. 7, 1020-1035, 2008.

HOWELL, R. C. et al. Phage display library derived peptides that bind to human tumor melanin as potential vehicles for targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, 1739-1748, 2007.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G., molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** v. 4, 551-79, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/PRO-ONCO) – ministério da saúde. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Tipos de Câncer: Pele Melanoma**. Rio de Janeiro: INCA; 2014. Acesso em: 25 de setembro de 2014. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma >

IRACHE, J. M. et al., Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Vet. Parasitol.** v. 180, 47-71, 2011.

IRELAND A. et al., Genetic factors in metastatic progression of cutaneous melanoma: the future role of circulating melanoma cells in prognosis and management. **Clin Exp Metastasis**. v.28, 327-336, 2011.

JAIN, S.; SARAF, S. influence of processing viables and in vitro characterization of glipizide loaded biodegradable nanoparticles, **Diabetes e Metabolic syndrome: Clinical research e reviews**, v.3, 113-117, 2009.

JANG, M. et al. Cancer Chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Life Science**, v.275, 218-220, 1997.

JOSE, S. et al. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 474,6-13, 2014.

JUNG, T. et al., Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, 147-160, 2000.

KENNEDY C. et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **J Invest Dermatol**. v. 117, 294-300, 2001.

KING, R.E.; BOMSER, J.A.; MIN, D.B. Bioactivity of Resveratrol. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5 65-70. 2006.

KIM, S.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, 157-161, 2009.

LIM, S. M. et al., Improved biological half-live and anti-tumor activity of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) using peg-exposed nanoparticles. **Biomaterials**, v.32, 3538-3546, 2011.

LINDNER, G. R.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles: validation of an HPLC-PDA method to determine the drug entrapment and evaluation of its antioxidant activity. **Scientific World Journal**, v. 2013, 1-9, 2013.

LU, Z., et al., Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. **Journal of Fluorescence**, v.17, 580-587. 2007.

MACKIE, R. M; FREUDENBERGER, T.; AITCHISON T. C. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 2, 487-490, 1989.

MARKOVIC, S. N. et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. **Mayo Clin Proc**. v. 82, 490-513. 2007

MARSDEN J. R. et al. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**. 163, 238- 256, 2010

MARSILLAC, J.B.; REZENDE, J.F.N. Câncer de pele. In: MORAES, M.F. **Princípios da Cirurgia Oncológica**. São Paulo: Atheneu, 35-49. 1996.

MARTINS, D. et al., Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D,L-(lactide-coglycolide) nanoparticles containing violacein. **Int. J. Nanomedicine**, v. 5, 77-85, 2010.

MOMESSO, R.G.R.A.P. **Incorporação e liberação de resveratrol em hidrogéis poliméricos**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v.385, 113-142, 2010.

MOUAWAD, R.; SPANO, J. P.; KHAYAT, D. Old and new serological biomarkers in melanoma: Where we are in 2009. **Melanoma Research**, v. 20, 67-76, 2010.

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

NAKATA, R.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Recent Advances in the Study on Resveratrol. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, 273-279, 2012.

NARAYANAN, N. K. et al., Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. **International Journal of Cancer**, v. 125, 1-8, 2009.

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

NEVES, A.R. et al., Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, 1663-1681, 2012.

_____. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **Int jornal of nanomedicine**, v.8, 177-187, 2013.

OBER, C.A.; GUPTA, R. B. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. **Ide@s Concyteng**, v. 72, 714-726, 2011.

ORTUÑO, J. et al., Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans. **Food Chem**, v. 120, 1123–1130, 2010.

OSMOND, G. W. et al. In vitro and in vivo evaluation of resveratrol and 3,5-dihydroxy-4'-acetoxy-trans-stilbene in the treatment of human prostate carcinoma and melanoma. **J Surg Res**, v. 179,141-148, 2013.

OTAKE, A. H. et al., Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacolog**. v.66, 79-87, 2010.

OZTURK, K. et al., The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. **Pharmazie**, v. 65, 665 - 669, 2010.

PENG, H. L. et al., Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, 23-28. 2010.

PHO, L.; GROSSMAN, D.; LEACHMAN, S. A. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 18, 173-179, 2006.

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

POLETTI, F. S. et al., Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics** v. 345, 70-80, 2007.

POLLARD, J.W., Tumour-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. **Nature Reviews**, v. 4, 71-78, 2004.

POSTOVIT, L.M et al., influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. **Câncer res**, v. 66, 7833-7836, 2006.

PRASAD M.L. et al. Primary mucosal melanoma of the head and neck. A proposal for microstaging localized, stage 1 (lymph node-negative) tumors. **Câncer**. v.8, 1657-1664, 2004.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 24, 1113- 1128, 1998.

RAO, J. P.; GECKELERA, K. E. polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in polymer Science**, v. 3, 887- 913, 2011.

REIS, A.C.B.P. **Encapsulação de Fármacos Peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. Faculdade de Farmácia, Coimbra, 2007.

RESTANI, R. B. et al., Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **Journal of Supercritical Fluids**, v.55, 333-339, 2010.

ROGER, E. et al., Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v. 5, 287-306, 2010.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I. et al., The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites, **Biomaterials**, v. 31, 5498-5509. 2010.

SAIKO, P. et al., Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v.658, 69-94, 2008.

SANTOS, J. S. **Nanopartículas: Aplicações cosméticas e farmacêuticas**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

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

SCHWARTZ, M.A., Integrins, oncogenes, and Anchorage Independence. **J cell biol**, v.139, 575-578. 1997.

SEKULIC A. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. **Mayo Clin Proc.** v. 83, 825-846. 2008.

SESSA, M. et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 147, 42-50, 2014.

SEVERINO, P. et al., Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v.21, 361-368, 2011.

SLINGLUFF J. R. C. L. et al., CUTANEOUS MELANOMA. IN: DEVITA JR VT, LAWRENCE TS, ROSENBERG SA. **Cancer, Principles and Practice of Oncology**. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

SHI, G. et al., Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics** v. 349, 83-93, 2008.

SIEGEL, R; NAISHADHAM, D; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2013. **Ca Cancer J Clin**, v. 63, 11-30, 2013.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 16, 449-466. 2005.

SILVA, M. P. N. da. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, 59-77, 2006.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, 3138-3151, 2003.

SOLOMÃO, Z. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de Poli(episolon-caprolactona) (PCL) e Beta-Fosfato Tricálcico (Beta-TCP) para uso em biomateriais**. Campinas, UNICAMP, 2011.

SONAJE, K. et al., Biodistribution Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Insulin analogues in a rat model: oral delivery using ph-responsive nanoparticles vs. Subcutaneous injection. **Biomaterials**, v.31,6849-6858, 2010.

TAHARA, K. et al., Hybrid-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. **Int. J. Pharm.** v.392, 311 – 313, 2010.

TESKAC, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, 61-69. 2010.

UDENIGWE, C. C. et al., Potential of Resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition reviews**, v.66, 445-454, 2008.

VAN GINKEL, P. R. et al. Resveratrol Inhibits Uveal Melanoma Tumor Growth via Early Mitochondrial Dysfunction. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 49, 1299-1306, 2008.

WADE, T. R.; WHITE, C. R. The histology of malignant melanoma. **Medical Clinics of North America**. 57-70, 1986.

WALLE, T. et al., High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, 1377-1382. 2004.

WARGO, J. A; TANABE, K. Surgical management of melanoma. **Hematol oncol clin north am**, v. 23,565-581, 2009.

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

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II Review of 93 intervention studies. **American Journal of Clinical Nutrition**., v. 81, 243S-55S, 2005.

WOODRUFF, M, A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: polycaprolactone in 21st century. **Progress in polymer Science**, v.35, 1217-1256, 2010.

YU, C. et al., Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm res**, v.19, 1907-1914, 2002.

ZAMIN, L.L. **Resveratrol e Quercetina: Avaliação da atividade antitumoral e dos mecanismos de ação em linhagens de gliomas in vitro e em um modelo de implante de gliomas in vivo**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2010.

ZHANG, P. c-Myc Downregulation: a critical molecular event in resveratrol induced cell cycle arrest and apoptosis of human medulloblastoma cells. **Journal of Neuro-Oncology**. v, 80, 123-131. 2006.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética

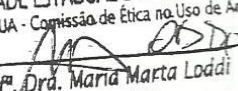
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 038 B/2014****Protocolo UEPG – 10504/2014****Título –** Projeto de mestrado – Potencial antitumoral de nanocarreadores contendo resveratrol em melanoma murino”.**Data de Entrada – 14/07/2014****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – 14/07/2014 a 14/07/2016****Considerações****Prezado Professor Dr. Giovani Marino Favero:**

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 40 (quarenta) camundongos de 6 a 8 semanas.

APROVADO.

Ponta Grossa, 26 de agosto de 2014.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof.ª Dr.ª Maria Marta Lodi
Coordenadora