



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JULIANA ARAÚJO DINIZ**

---

---

**Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina**

---

---

**Goiânia  
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

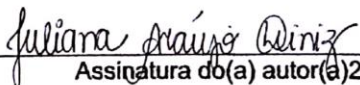
Nome completo do autor: Juliana Araújo Diniz

Título do trabalho: Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina

**3. Informações de acesso ao documento:**


Concorda com a liberação total do documento  **SIM**     **NÃO**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

*Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha*  
Faculdade Farmácia - UFG  
C.F.P. Nº 3267  
S/Nº 2158

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 29 / 08 / 2019

1 Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

2 A assinatura deve ser escaneada.

**JULIANA ARAUJO DINIZ**

---

---

**Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina**

---

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Goiânia  
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Araújo Diniz, Juliana

Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina [manuscrito] / Juliana Araújo Diniz. - .

60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, .

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. resveratrol. 2. biodisponibilidade. 3. hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina. I. Carlos da Cunha, Luiz, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Juliana Araújo Diniz. Na data de 28 de maio de 2019, às 08:00 horas, na sala de aula do Programa/Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG), Prof. Dr. Ricardo Menegatti (FF/UFG), Profa. Dra. Cristiane Effting (UEG) e Dr. James Oluwagbamigbe Fajemiroye (UniEvangélica) como suplente. Sob a Presidência do Orientador, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: "Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina", de autoria de Juliana Araújo Diniz, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de Mestrado. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca, Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à pós-graduanda que, em 30 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arquivou a Mestranda, tendo-se adotado o sistema de cômulo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A Dissertação foi considerada APROVADA pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/JFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, a pós-graduanda poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às 9 horas e 40 minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Fernanda Maura Ferreira Bellato, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

#### Parecer Detalhado da Banca Examinadora

| Membro                                                        | Aprovado /Reprovado | Assinatura |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|------------|
| Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG) - Presidente          | Aprovado            |            |
| Prof. Dr. Ricardo Menegatti (FF/UFG)                          | Aprovado            |            |
| Profa. Dra. Cristiane Effting (UEG)                           | Aprovado            |            |
| Dr. James Oluwagbamigbe Fajemiroye (UniEvangélica) - Suplente | Aprovado            |            |
| Parecer Final                                                 | Aprovado/Reprovado  | APROVADA   |


Alteração do título:

Juliana Araújo Diniz

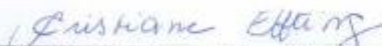
## Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 28 de maio de 2019, pela mestranda Juliana Araújo Diniz.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)  
*Presidente*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Menegatti (FF/UFG)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristiane Effting (UEG)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

**Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação**

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

**Goiânia-GO**  
**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluna: JULIANA ARAÚJO DINIZ**

**Orientador: PROF. DR. LUIZ CARLOS DA CUNHA**

**Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha / Presidente**

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Prof. Dr. Ricardo Menegatti / Membro Titular**

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Prof. Dra. Cristiane Effting/ Membro Titular**

Universidade Estadual de Goiás - UEG.

**Prof. Dr. James Oluwagbamigbe Fajemiroye/ Membro Suplente**

Universidade Federal de Goiás, UFG

**Data: 28/05/2019**

*E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração!*

*Colossenses 3:23*

## AGRADECIMENTOS

---

Inicio meus agradecimentos por *Deus*, minha fonte de fé, esperança e tranquilidade, quando todo o resto está fora de ordem.

Ao meu eterno professor e orientador *Luiz Carlos* pela paciência, confiança e pela sua postura mais de líder do que de chefe, deixando todo o dia a dia nesse trabalho muito mais leve e compensatório.

Agradeço também aos demais membros do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio e ensinamentos em todas as etapas.

Um obrigado especial ao *Jerônimo* pelas suas explicações sempre tão competentes e pelas “quebradas de dentes” sem nunca perder o bom humor. Sem você e a sua imensa ajuda, esse trabalho não existiria. “Tudo de bom!”

Um imenso obrigado ao professor *Ricardo Menegatti* por não ter desistido dessa empreitada mesmo nos piores momentos. A dedicação do senhor é encorajadora! Aproveito para gratular todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Farmacêuticas da UFG pelo auxílio prestado.

À secretária *Fernanda Belatto* por todos os e-mails esclarecedores e por toda a sua solicitude sempre ajudando os alunos com um sorriso no rosto.

Agradeço aos meus pais *Antônio e Silvânia*, por me possibilitarem estudar e crescer, fazendo tudo o que podem e não podem por essa família.

A minha irmã *Fernanda* por estar sempre ao meu lado independente da distância e por todas as piadas idiotas que só ela sabe contar.

Ao meu namorado *Adriano* pela paciência, preocupação diária e incentivo, me apoiando e acreditando em mim, mesmo quando eu mesma não mais acreditava. Obrigada por ter o melhor abraço do mundo!

Ao meu primo *Gustavo* por sempre ter algum comentário “descortês” sobre meus problemas cotidianos, me fazendo rir nos piores dias. Obrigada pelos conselhos e pela sensatez.

Aos meus diversos amigos por estarem comigo durante todo esse trajeto. Ao citar nomes, poderia incorrer na injustiça. Então apenas digo: vocês sabem quem são e sou muito grata por tê-los em minha vida!

Um muito obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa durante esse período e pelo apoio sempre constante ao NEPET.

E as minhas babies *Sol* e *Uly*. Sei que elas nunca lerão isso, mas preciso deixar registrado como elas são essenciais na minha vida e como me ajudaram nesse processo!

Obrigada a todos vocês por serem para mim um meio de encontrar paz na guerra!

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>SUMÁRIO</b>                                                              | <b>12</b> |
| <b>FIGURAS</b>                                                              | <b>13</b> |
| <b>TABELAS E QUADROS</b>                                                    | <b>15</b> |
| <b>RESUMO</b>                                                               | <b>16</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                                             | <b>17</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                        | <b>18</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>                                             | <b>22</b> |
| 2.1. RESVERATROL                                                            | 22        |
| 2.2. CICLODEXTRINAS                                                         | 25        |
| 2.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA                               | 27        |
| 2.4. FARMACOCINÉTICA                                                        | 31        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                         | <b>35</b> |
| 3.1. GERAL                                                                  | 35        |
| 3.2. ESPECIFICOS                                                            | 35        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>                                                 | <b>36</b> |
| 4.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES                                               | 36        |
| 4.2. PREPARO DO POLÍMERO                                                    | 36        |
| 4.3. ENSAIOS DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE DO RESVERATROL EM MATERIAL BIOLÓGICO | 39        |
| 4.4. FARMACOCINÉTICA                                                        | 41        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                            | <b>44</b> |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA                                                 | 44        |
| 5.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X                                                    | 44        |
| 5.3. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMÉTRICA                        | 46        |
| 5.4. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA ANALÍTICA EM HPLC-PDA                             | 47        |
| 5.6. FARMACOCINÉTICA                                                        | 48        |
| 5.6.1 VIA INTRAVENOSA                                                       | 48        |
| 5.6.2.VIA ORAL                                                              | 53        |
| 5.6.3.BIODISPONILIDADE ABSOLUTA E RELATIVA                                  | 57        |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>                                                         | <b>59</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b>                                                       | <b>60</b> |

---

| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                                                                                                                                                                                                                       | <b>PÁGINA</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1: (A) Foto da planta <i>Veratrum grandiflorum</i> e (B) estruturas químicas do <i>trans</i> -resveratrol e do <i>cis</i> -resveratrol.                                                                                                                | 19            |
| Figura 2: Estrutura esquematizada de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.                                                                                                                                                                              | 25            |
| Figura 3: Preparação do complexo de inclusão do resveratrol em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina – etapas iniciais.                                                                                                                                            | 33            |
| Figura 4: Preparação do complexo de inclusão do resveratrol em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina – etapas finais.                                                                                                                                              | 34            |
| Figura 5: Comparação das características físico-químicas de 25mg do resveratrol (A) e 25mg do complexo RES-Y-CD (B) ambos diluídos em 0,5 mL de água.                                                                                                         | 34            |
| Figura 6: Resultado de difração de raios-x do resveratrol puro.                                                                                                                                                                                               | 41            |
| Figura 7: Resultado de difração de raios-X do complexo RES-Y-CD.                                                                                                                                                                                              | 41            |
| Figura 8: Análise térmica diferencial e termogravimétrica do complexo RES- $\gamma$ -CD.                                                                                                                                                                      | 42            |
| Figura 9: Curva de calibração em plasma humano para quantificação de resveratrol utilizando HPLC-PDA.                                                                                                                                                         | 44            |
| Figura 10: Análise da meia-vida de eliminação e tempo para atingir concentração na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3). | 46            |

|                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11: Análise da concentração máxima observada na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3).                           | 47 |
| Figura 12: Análise das áreas sob as curvas observadas na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3).                         | 48 |
| Figura 13: Análise do volume de distribuição e do <i>clearance</i> observados na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3). | 48 |
| Figura 14: Análise da meia-vida de eliminação e tempo para atingir concentração máxima para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).           | 50 |
| Figura 15: Análise da concentração máxima para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).                                                        | 51 |
| Figura 16: Análise das áreas sob as curvas para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).                                                       | 52 |
| Figura 17: Análise do volume de distribuição e do <i>clearance</i> para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).                               | 52 |

| LISTA DE TABELAS E QUADROS                                                                                                                                                                       | PÁGINA |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Quadro 1: Tipos de alimentos e as respectivas concentrações do resveratrol.                                                                                                                      | 20     |
| Quadro 2: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.                                                                                                                              | 22     |
| Quadro 3: Metodologia dos ensaios de validação para análise do resveratrol puro e do RES- $\gamma$ -CD em material biológico                                                                     | 35     |
| Tabela 1: Parâmetros analíticos de validação (precisão e exatidão intra e interdia), em HPLC-PDA, para quantificação do resveratrol em plasma humano.                                            | 43     |
| Tabela 2: Perfil de estabilidade do analito resveratrol sob diferentes condições de processamento do plasma humano adicionado, em análise por HPLC-PDA.                                          | 44     |
| Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3). | 45     |
| Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3). | 49     |

### ***Estudo de farmacocinética comparativa entre o resveratrol e o seu complexo em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina.***

O resveratrol é um polifenol que expressa atividades vasodilatadoras, antineoplásicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e de antiagregante plaquetário. Apesar desses efeitos benéficos, o resveratrol se caracteriza por apresentar atuação terapêutica limitada, devido à sua baixa estabilidade frente à oxidação e a solubilidade aquosa reduzida. Dentre as soluções propostas após revisão bibliográfica, determinou-se que a melhora na biodisponibilidade pode ser uma saída interessante para tais limitações. Visando aumentar a biodisponibilidade oral, incorporou-se o resveratrol à hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina, obtendo como produto final o complexo resveratrol-hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD). Para verificar a eficiência da complexação, comparou-se em ratos o resveratrol (resveratrol + DMSO) ao seu complexo (RES- $\gamma$ -CD), determinando os parâmetros farmacocinéticos ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_T$ ,  $t_{1/2}$ ,  $V_d$  e  $CL_T$ ), pelas vias p.o. e i.v., com a obtenção dos valores e biodisponibilidade absoluta (F%) e de biodisponibilidade relativa (FR%). A técnica analítica em HPLC-PDA foi validada e os parâmetros farmacocinéticos se apresentaram estatisticamente iguais, à exceção de  $C_{max}$  do RES- $\gamma$ -CD, bastante superior. Os valores de F% e FR% do resveratrol foram superiores para formulação RES- $\gamma$ -CD, demonstrando melhor biodisponibilidade absoluta e relativa do que o resveratrol dissolvido em DMSO. Em conclusão, a incorporação do resveratrol em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina é promissora para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol, o que poderá melhorar a sua eficácia.

**Palavras-Chave:** resveratrol, biodisponibilidade, hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina.

**Agradecimentos:** NEPET, LCQM, FAPEG e CNPq.

***Comparative pharmacokinetic study of resveratrol  
and resveratrol-hydroxy- $\gamma$ -cyclodextrin complex.***

Resveratrol is a polyphenol that induces vasodilation, antineoplastic, anti-inflammatory, antioxidant and antiplatelet activities. Despite these beneficial effects, resveratrol is characterized by limited therapeutic performance due to its low oxidation stability and low aqueous solubility. Hence, an improvement in bioavailability may be an interesting outlet for such limitations. In order to increase oral bioavailability, resveratrol was incorporated into hydroxy- $\gamma$ -cyclodextrin, resulting in resveratrol-hydroxy- $\gamma$ -cyclodextrin complex (RES- $\gamma$ -CD). In order to verify the efficiency of the complexation, resveratrol (resveratrol + DMSO) was compared to its complex (RES- $\gamma$ -CD), determining the pharmacokinetic parameters ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_T$ ,  $t_{1/2}$ ,  $V_d$  e  $CL_T$ ), by the oral and intravenous routes, with absolute values (F%) and relative bioavailability (FR%) being obtained. The HPLC-PDA analytical technique was validated and the pharmacokinetic parameters were statistically the same, except for a much higher  $C_{max}$  of RES- $\gamma$ -CD. The F% and FR% values of resveratrol were higher for RES- $\gamma$ -CD formulation, demonstrating better absolute and relative bioavailability than the administered resveratrol dissolved in DMSO. In conclusion, the incorporation of resveratrol into hydroxy- $\gamma$ -cyclodextrin is promising to increase the bioavailability of resveratrol, which may improve its efficacy.

**Key words:** Resveratrol, bioavailability, hydroxy- $\gamma$ -cyclodextrin.

**Acknowledgments:** NEPET, LCQM, FAPEG and CNPq.

# 1. INTRODUÇÃO

---

O interesse por um princípio ativo e seu possível uso terapêutico se inicia muitas vezes graças a usos populares disseminados no vasto conhecimento social. Protótipos de origem animal, vegetal e mineral são diariamente desenvolvidos. Consistentes esforços, pesquisas científicas e averiguações farmacológicas são embasados a partir de amostras que podem ou não sustentar a motivação inicial depois de findadas as avaliações. Em meio a uma realidade tão abundante, encontra-se o resveratrol e o seu “*Paradoxo Francês*” (BROWNSON et al., 2002; LUCERI et al., 2002; RIFICI, SCHNEIDER e KHACHADURIAN, 2002). Esse termo é utilizado por nutricionistas para se referir à contradição existente entre a alimentação francesa rica em gordura saturada e o aparecimento inversamente proporcional de aterosclerose coronariana nessa população. A principal justificativa para tal incoerência está relacionada à ingestão diária de alimentos derivados da uva, atividade arraigada ao cotidiano e que possui como principal componente ativo o resveratrol (PROVIDENCIA et al., 2006; ALI, Kashif. 2010; LIU, LIANG e QIANG, 2013).

Apesar de ter o vinho como representante nobre dentre esses derivados, a presença de álcool é fator restritivo para o seu consumo. Um estudo publicado em 2018 no “The Lancet” analisa sistematicamente dados sobre o consumo de álcool coletados em 195 países por um período de 30 anos. Os resultados são categóricos: o álcool é um dos principais fatores para o aparecimento de doenças e causa perda substancial de saúde, desmistificando assim o mito das benesses proporcionadas pelo seu “uso moderado”. Entretanto, o consumo de sucos integrais, vinagres, geleias, óleos e farinhas derivados da uva se firmam como alternativas acessíveis e não alcólicas para a ingestão de resveratrol (GBD ALCOHOL COLLABORATORS, 2018).

Sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina pela enzima triidoseestilbeno sintase em resposta a agressões ambientais como o ataque de fungos e radiação UV, o resveratrol é comumente encontrado em sementes e cascas de uvas vermelhas, amendoim, mirtilo, cacau em pó, chocolate amargo, amora, morango, açaí, eucalipto, vinho tinto e pistache. Possui também outra fonte pouco conhecida: um vegetal cultivado comercialmente na China, o *Polygonum cuspidatum*, popularmente conhecido como *knotweed* japonês ou bambu mexicano, que se caracteriza por ser uma fonte comestível e

não alcoólica deste polifenol (FRÉMONT, 2000; DORNAS, OLIVEIRA e RODRIGUES-DAS-DORES, 2009; LIU, LIANG e QIANG, 2013).

Os polifenóis são compostos naturais com estruturas diversas e de biossíntese exclusiva por plantas e alguns tipos de fungos, consumidos a partir da incorporação em alimentos como chás, vinho, frutas, legumes e verduras. Com sua biodisponibilidade sempre sob discussão, é certo que fatores como gênero, idade, composição da microflora intestinal e interações com proteínas salivares e enzimas digestivas influenciam diretamente no aproveitamento dessa substância *in vivo* (PAIXÃO et al., 2014).

No artigo publicado em 2010 por Daiane Nemen e Elenara L. Senna evidencia-se a baixa estabilidade frente à oxidação e baixa solubilidade aquosa do resveratrol como os principais motivos para o limitado aproveitamento terapêutico do produto, principalmente após a administração oral. De modo geral, as concentrações de resveratrol chegam em baixas concentrações nos potenciais sítios de ação não demonstrando a eficácia que se espera (RAWAT e JAIN, 2004). De acordo com a Farmacopeia Europeia, este polifenol não flavonoide possui uma solubilidade de aproximadamente 50mg.mL em etanol, 16mg.mL em DMSO, apresentando solubilidade limitada em água - aproximadamente 3mg.100mL (FARMACOPEIA EUROPÉIA, 2017). Essa indissolubilidade aquosa afeta diretamente a permeabilidade da substância, possibilitando campo interessante e promissor de estudo.

Apesar de apresentar dois tipos de isômeros, a forma estável e mais ativa do composto é a *trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno*, intensamente estudado por sua capacidade de prevenir ou retardar a progressão de doenças como câncer, diabetes, arteriosclerose, doenças inflamatórias e alérgicas (GAMBINI et al., 2015). Isso só é viável devido às suas propriedades de antiagregantes plaquetárias, vasodilatadoras, antineoplásicas, além de ser um protetor renal que contribui no manejo da obesidade e da diabetes. Já foi relatado também que o resveratrol modula a função mitocondrial, atenuando os efeitos que essas estruturas sofrem pela ação de agentes estressores (FRÉMONT et al., 2000; LIU et al., 2013; PAIXÃO et al., 2014).

Por possuir propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o resveratrol é importante na prevenção e no tratamento do envelhecimento cutâneo, como um despigmentante que bloqueia a produção de melanina e aumenta a degradação dos melanossomos que a armazenam. Alguns polifenóis como o resveratrol podem atuar diretamente contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) prevenindo ou reduzindo o estresse oxidativo. Isso ocorre pela capacidade de transformar um radical livre em outro menos reativo, ação denominada de “scavenger” (BELLÓ, 2002; RIFICI,

SCHNEIDER e KHACHADURIAN, 2002). Nesse âmbito, o resveratrol atua como quelante, onde suas propriedades de óxido-redução neutralizam radicais livres, retardando e inibindo a oxidação de diversas substâncias. Isso evita o início e propagação das reações em cadeia e produz uma ação protetora efetiva contra os diversos processos oxidativos que ocorrem naturalmente no organismo (PAULO et al., 2011; SOUZA et al., 2017).

Frente a tantas propriedades e mesmo sendo relativamente acessível, o resveratrol não é utilizado em larga escala. Estudos *in vitro*, realizados em células de ratos, mesangiais, cardiomiócitos, adipócitos viscerais humanos, modelos de tecidos ou frações subcelulares, demonstraram os efeitos protetivos do resveratrol, principalmente na fisiopatologia de doenças renais, cardiovasculares e no câncer. Contudo, quando expandidos para modelos *in vivo*, é difícil observar a conservação dessas respostas uma vez que o composto é amplamente metabolizado e excretado (LIANG et al., 2013). Uma justificativa para essa condição em animais e humanos se dá pela sua baixa permeabilidade graças ao seu rápido e extenso metabolismo pré-sistêmico, resultando somente na presença de traços da substância não modificada na circulação (UDENIGWE, ROTIMI E JONES, 2008; BASTOS, 2009).

Na tentativa de otimizar o uso do resveratrol e realizando um levantamento sobre as soluções já propostas no meio científico, encontra-se as ciclodextrinas (CDs). A complexação de fitoquímicos solúveis em água com ciclodextrinas tem se mostrado uma promissora abordagem para melhorar a permeabilidade, estabilidade e taxa de dissolução, a fim de transpor as barreiras impostas pelo organismo, melhorando a sua biodisponibilidade e atividade nos sítios de ação (LASTRA E VILLEGAS, 2007; VALLIANOU, 2013). As CDs são oligossacarídeos cíclicos derivados de amido contendo a partir de seis unidades de *D*-Glicopiranosose, que apresentam grandes aplicações industriais devido ao seu arranjo tridimensional criando uma cavidade interna apolar. Esse espaço no interior da molécula permite que as CDs formem complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos (CERQUEIRA et al., 2007; PRATA, 2015).

A utilização desses complexos revela-se como alternativa viável e interessante por melhorar as propriedades biofarmacêuticas, disponibilizando o princípio ativo no local de ação e modificando a sua taxa de liberação, possibilitando o aumento da permeabilidade de formulações e a absorção destas através de barreiras biológicas (RAMIREZ, 2008). Essa estrutura visa ampliar também a duração dos efeitos farmacológicos; melhorando a especificidade, a seletividade para o sítio de ação desejado; diminuindo a toxicidade e aperfeiçoando a formulação farmacêutica (RAMIREZ, 2008; DRUNKLER, 2009).

Neste contexto, a realização do estudo se torna relevante por possibilitar a formação do complexo de inclusão entre o resveratrol e as hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrinas e a consequente verificação *in vivo* desse complexo frente à estrutura original

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

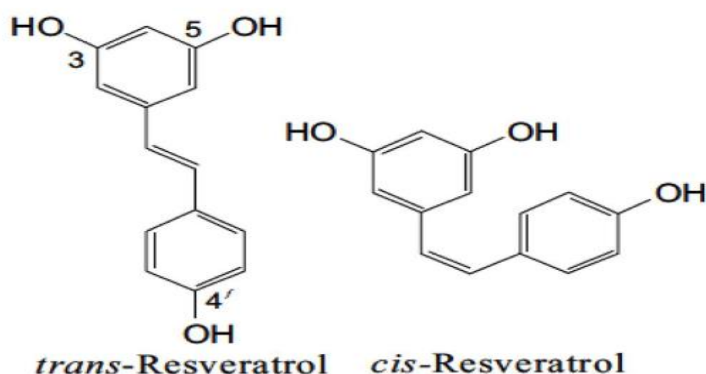
---

O levantamento do referencial teórico ocorreu nas bases de dados Google Acadêmico, Periódicos Capes, Pubmed, Science Direct, Scielo, World Wide Science e Biblioteca Virtual de Saúde (BVS). A pesquisa se embasou nas palavras-chave: resveratrol, hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina, biodisponibilidade, fitoalexina, fotoproteção, HPLC, farmacocinética, polifenol e concentração plasmática, sempre em combinações de duas e três palavras. A busca foi realizada no período de Julho de 2018 à Maio de 2019. O processo e os termos foram replicados durante as pesquisas realizadas em língua inglesa.

### 2.1. RESVERATROL

De origem latina, a palavra “resveratrol” surge como acrônimo das palavras “res” que significa “procede de”, “veratrum” advindo da planta onde o composto foi inicialmente descrito e “ol” indicando a presença de grupos álcool em sua estrutura (BASTOS, ROGERO E ARÊAS, 2009). Caracterizado em 1940 por Michio Takaoka ao analisar a planta *Veratrum grandiflorum*, um tipo de lírio apresentado na Figura 1, o resveratrol – 3,5,4'-trihidroxiestilbeno – possui como estrutura básica dois anéis fenólicos ligados por um duplo estireno e peso molecular de 228,25 g/mol (GUEDES et al., 2008; OLIVEIRA, 2009). Essa dupla ligação inclusive possibilita a diastereoisomeria observada no composto também apresentado na Figura 1: a subunidade *trans*-resveratrol a qual é interconvertida em *cis*-resveratrol na presença de radiação ultravioleta (BASTOS, ROGERO E ARÊAS, 2009; PAULO, 2011). Devido a essa fotossensibilidade, o produto deve sempre ser armazenado protegido da luz. Sob a forma de cristal de cor branca e fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$ , o resveratrol é um ácido que possui ponto de fusão entre 253°C e 255°C, sendo solúvel em determinados solventes orgânicos e praticamente insolúvel em água (0,03 mg/L) (CERQUEIRA, 2007). Por ser produzida naturalmente em diversas plantas após o ataque de fungos, estresse ou radiação ultravioleta, a substância é considerada uma fitoalexina polifenólica – composto químico de baixo peso molecular, produzido apenas no local da infecção – o que representa para as plantas, do ponto de vista energético, uma forma mais simples e econômica de defesa (BROWNSON et al., 2002). Conseqüentemente, a concentração do resveratrol depende principalmente do tipo, duração e intensidade do stress ao qual a planta foi submetida (PAULO, 2011).

Figura 1: (A) Foto da planta *Veratrum grandiflorum* (The Plant List Org, 2010) e (B) estruturas químicas do *trans*-resveratrol e do *cis*-resveratrol (Rege, et al., 2014).



No que se referem à aplicabilidade, diversos trabalhos são publicados anualmente sobre o tema. Dentre os pontos comumente debatidos, o resveratrol se destaca por sua capacidade de prevenir ou diminuir a progressão de várias doenças, como cânceres, diabetes, doenças degenerativas e cardiovasculares, além de possuir propriedades antioxidantes, antiagregantes plaquetária, anti-inflamatórias e antimicrobianas (LUCERI et al., 2002; PAULO, 2011; LIU, XIA E KONG, 2013). A ação anticancerígena se dá principalmente pela indução de apoptose e alteração de expressões gênicas, acarretando em uma diminuição na iniciação, promoção e progressão do tumor. A absorção do resveratrol ocorre no intestino delgado, mas para que a sua excreção ocorra, são formados dois compostos auxiliares: o resveratrol sulfato, formado no rim pela conjugação do composto com o sulfato e o resveratrol glucoronídeo formado no fígado. Aproximadamente 97% do resveratrol excretado pelo organismo ocorre pela conjugação com o ácido glicurônico. Esse ácido é importante no processo de excreção de xenobióticos (GUEDES et al., 2008; RAMIREZ, 2008).

Embora os mecanismos ainda não sejam totalmente elucidados, estudos indicam que o resveratrol desempenha o papel de um antioxidante na forma de um sequestrante de radicais livres (atividade sequestrante), quelando os íons metálicos (como ferro e cobre), inibindo ou retardando assim a oxidação. Preserva a atividade da enzima paraoxonase, neutralizando os radicais livres e ativando fatores de transcrição, levando ao aumento da expressão de genes que codificam proteínas importantes na atividade antioxidante, como a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase. Essa atividade

melhora também complicações crônicas causadas por doenças como diabetes mellitus, arteriosclerose e hipertensão (SEFORA-SOUSA, 2013; MARTINS, 2016).

O efeito anti-hiperglicêmico está associado à atividade estimulatória no transporte de glicose intracelular (VALLIANOU, 2013). Já a proteção cardiovascular é decorrente da inibição da agregação plaquetária, vasodilatação, estimulação da angiogênese e indução da expressão proteica cardioprotetora, reduzindo a síntese de lipídios que promovem a inflamação e a aterosclerose (GUEDES et al., 2008). As doenças degenerativas e o envelhecimento celular são causados, dentre outros motivos, pelos efeitos tóxicos do oxigênio e nitrogênio, levando à inativação enzimática, ruptura de membrana, mutação, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e, conseqüentemente, à morte celular (RAMIREZ, 2008). Nesse contexto, o resveratrol e sua ação antioxidante – atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático – auxiliam na eliminação de radicais livres interrompendo as reações em cadeias (CERQUEIRA et al., 2007). De modo geral, os resultados dos estudos sobre o resveratrol destacam as suas atuações funcionais com potencial aplicação farmacológica, exercendo efeitos positivos na prevenção e tratamento de desordens metabólicas e degenerativas. A dose média varia entre 15 a 20 mg por dia em forma de cápsula ou 250 mL através do consumo de suco ou vinho tinto (LEAL et al., 2017). O Quadro 1 exhibe uma percepção geral dos principais alimentos que contêm resveratrol e suas concentrações aproximadas.

Quadro 1: Tipos de alimentos e as respectivas concentrações do resveratrol.

| <b>Alimento</b> | <b>Concentração de trans-resveratrol</b> | <b>Fonte</b>                       |
|-----------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| Amendoim        | ≈ 0,00192 mg/g                           | (KIM et al., 2011)                 |
| Chocolate       | ≈ 0,0004 mg/g                            | (COUNET, CALLEMIEN e COLLIN, 2006) |
| Groselha        | ≈ 0,0019 mg/g                            | (DJOKO, et al., 2007)              |
| Mirtilo         | ≈ 0,00003 mg/g                           | (LYONS, M., 2003)                  |
| Morango         | ≈ 0,00011 mg/g                           | (WANG, et al., 2015)               |
| Pistache        | ≈ 0,00167 mg/g                           | (TOKUŞOĞLU, et al., 2005)          |
| Uva             | ≈ 0,00029 mg/g                           | (WENZEL, O., 2015)                 |
| Vinho branco    | ≈ 0,0028 mg/mL                           | (WENZEL, O., 2015)                 |
| Vinho tinto     | ≈ 0,0036 mg/mL                           | (SARUBBO, et al., 2017)            |
| Suco de uva     | ≈ 0,0009 mg/mL                           | (SAUTTER, C. et al., 2005)         |

Dentre os produtos disponíveis no mercado que empregam o resveratrol como componente principal, encontram-se aproximadamente três tipos de cremes para uso dérmico, que se utilizam de nanotecnologia para favorecer suas ações. Todos os demais produtos se apresentam para consumo oral através de cápsulas com dose de resveratrol

variando entre 100 mg e 500 mg. Considerando-se estes aspectos e a necessidade de aumentar a biodisponibilidade oral do resveratrol, ressalta-se a importância de pesquisar para tal finalidade. Na tentativa de otimizar a aplicabilidade dos fármacos e levando em consideração a fundamental importância que a solubilidade em água possui nesse contexto, numerosos estudos são realizados a fim de alterar a estrutura lipofílica de potenciais princípios ativos (ARANGO, PONCHEL e DUCHÊNE, 2000; COIMBRA et al., 2011). Neste âmbito, surgem as ciclodextrinas.

## 2.2. CICLODEXTRINAS

Isoladas inicialmente por Villiers em 1891 como oligossacarídeos advindos da degradação enzimática de bactérias do amido, as ciclodextrinas são polímeros de estrutura cíclica de unidades de *D*-glucopiranosose (SEGUIN et al., 2013). Também conhecidas como cicloamiloses, cicloglucanos ou dextrinas de Schardinger, a complexação com as ciclodextrinas visa transpor limitações como reduzida extensão de alcance, velocidade de dissolução e baixa solubilidade aquosa (VANAJA, MARTIN E BUKARICA, 2013). Graças à sua cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica – resultado de um ambiente rico em elétrons e grupos OH – é moldada uma estrutura que permite a formação de complexos de inclusão estáveis com diversos sais, substâncias halogênicas e orgânicas, tornando assim a complexação promissora (COIMBRA et al., 2011; SEGUIN et al., 2013).

A forma associada às ciclodextrinas denominada tronco-cônica ocorre graças à conformação em cadeira das unidades de glicose e à ausência de rotação livre das ligações glicosídicas, não reproduzindo um cilindro perfeito (BROWNSON et al., 2002; SEFORA-SOUSA, 2013). Dentre as estruturas naturais existentes, as que apresentam maior rendimento são  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD e  $\gamma$ CD, que possuem propriedades distintas e cuja denominação é definida pela quantidade de unidades de glicose presentes em seu arcabouço, conforme exemplificado no Quadro 2 (PAULO, 2011).

Quadro 2: Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais (Adaptação de Oliveira, 2009).

| CD          | Nº de unidades de glicose | Peso molecular (g/mol) | Diâmetro da cavidade (Å) | Volume da cavidade (Å <sup>3</sup> ) | Solubilidade aquosa a 25°C (g/L) |
|-------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| $\alpha$ CD | 6                         | 972                    | 4,7 – 5,3                | 174                                  | 14,5                             |
| $\beta$ CD  | 7                         | 1.135                  | 6,0 – 6,5                | 262                                  | 1,85                             |
| $\gamma$ CD | 8                         | 1.297                  | 7,5 – 8,3                | 427                                  | 23,2                             |

Os tamanhos das cavidades dessas CDs definem os tipos de moléculas que podem ou não ser complexadas. A  $\gamma$ CD, por ser uma molécula não coplanar e de estrutura mais flexível, é a mais solúvel e de maior capacidade de encapsulação dentre as três, conseguindo agregar até mesmo esteroides e antibióticos (SEGUIN et al., 2013; VANAJA et al., 2013). Vale ressaltar, entretanto, que nem todas as substâncias apresentam características adequadas que viabilizem essa modificação. Elas precisam possuir diâmetro menor que o da cavidade da ciclodextrina escolhida para o uso além possuir grupos funcionais que viabilizem a complexação (OLIVEIRA, 2009). A utilização de ciclodextrinas tende a modificar a taxa de liberação dos fármacos complexados, aprimorando a absorção através de membranas biológicas e criando um sistema de liberação. Normalmente, quanto menor a solubilidade aquosa da substância, maior é o aumento relativo da solubilidade alcançado com a complexação (OLIVEIRA, 2009; MACEDO, BATTESTIN e MATSUDA, 2016).

Considerada uma substância não tóxica, uma vantagem de destaque das CDs é a de encapsular um grande número de compostos, agregando a estes propriedades físico-químicas através de um método simples e barato. Entretanto, há relatos de toxicidade para as células quando administradas pela via intravenosa, já que não são hidrolisadas pelas amilases humanas, o que leva a uma excreção direta através do rim (SUVARNA, GUJAR e MURAHARI, 2017). Na indústria farmacêutica o uso das CDs visa basicamente aumentar a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis, aumentando sua biodisponibilidade e estabilidade. Objetiva-se também diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos, eliminando odores ou sabores desagradáveis além de prevenir interações entre diferentes fármacos ou entre fármacos e excipientes (SANTOS, 2011).

Além das CDs naturais já conhecidas, alguns derivados químicos têm sido desenvolvidos no intuito de melhorar as propriedades físico-químicas e aumentar as opções para uso. Como exemplo, existem as CDs amorfas que são utilizadas como inibidoras do polimorfismo e da taxa de cristalinização de fármacos pouco hidrossolúveis e as CDs hidrófilas que modificam as taxas de liberação de fármacos, melhorando a absorção através das membranas biológicas. Existem também as CDs ionizáveis que promovem a ligação dos fármacos às superfícies das membranas celulares e a consequente absorção pelas barreiras biológicas. Outros exemplos de derivados são as CDs metiladas, hidroxialquiladas, ramificadas, etiladas, aciladas, aniônicas, variando entre elas os substituintes adicionados às estruturas naturais e a consequente aplicabilidade (SEFORA-SOUSA, 2013).

Cabe esclarecer que independente da funcionalidade, a maioria dessas derivatizações se originaram das  $\beta$ CD, visto que esta, apesar de não apresentar a maior capacidade de solubilidade aquosa, possui uma excelente propensão de se complexar com numerosos fármacos hidrofóbicos, além de ser a mais viável economicamente e já estar aprovada como excipiente em preparações farmacêuticas (SALIPARA et al., 2006; OLIVEIRA, 2009). Entretanto, após a realizar a etapa de complexação, haverá a necessidade de comprovar a eficiência da incorporação e se a mesma consegue modificar, por exemplo, parâmetros farmacocinéticos obtidos in vivo, cujos estudos dependem da utilização de métodos analíticos, especialmente cromatográficos.

### **2.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA**

Os historiadores creditam a invenção da cromatografia ao botânico russo Mikhail Semenovich Tswett devido a um relatório seu publicado no ano de 1903, onde ele descreve a separação de compostos extraídos de plantas utilizando solvente em uma coluna empacotada com partículas de carbono de cálcio. O início da utilização dos sistemas cromatográficos de alta eficiência se deu por volta dos anos 60, onde partículas de sílica porosa irregulares de 40 a 50  $\mu\text{m}$  com grande distribuição de tamanho eram utilizadas como fases estacionárias (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010). Já na década de 70, o surgimento de partículas de sílica com aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  e da técnica de modificação química das fases estacionárias, em especial as fases octil (C8) e octadecilsilano (C18), permitiram a construção de colunas robustas e de grande seletividade, denominadas de colunas de fase reversa. A padronização e o alto grau de pureza da superfície da sílica juntamente com a evolução das modificações químicas viabilizaram a produção de sistemas de fase reversa robustos com excelente estabilidade e eficiência (SADOVOY et al., 2011).

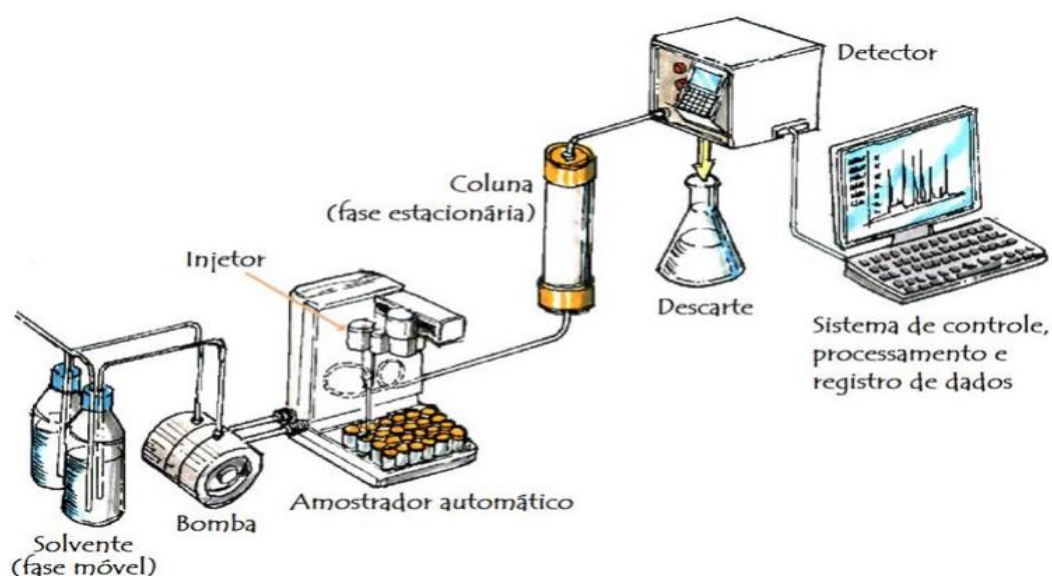
Nessa linha, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) se apresenta como um método eficaz, possibilitando a verificação de princípios ativos, quantificação de impurezas, além do estudo de degradação de determinado produto, sendo usada também como ferramenta analítica na descoberta de novos medicamentos ou em estudos de bioequivalência. A importância desses estudos se alicerça principalmente em seu arrojado poder de resolução, na velocidade das análises, em técnicas relativamente simples e no manuseio de pequenas quantidades de amostra ( $10^{-9}$  –  $10^{-15}$  g). Contudo, a operação e a instrumentação de alto custo, a necessidade de mão de obra treinada para o manuseio do

equipamento e a difícil análise qualitativa se tornam fatores limitantes (SANTOS, 2011; SUVARNA, GUJAR e MURAHARI, 2017).

O HPLC consiste na separação dos componentes distribuindo-os em duas fases, sendo uma fixa denominada fase estacionária, também conhecida como colunas cromatográficas, responsável pela retenção dos elementos e outra móvel que conduz a mistura por meio de um soluto através da Fase Estacionária (SALIPIRA et al., 2006). O desempenho do HPLC requer a utilização de equipamentos que possam resistir às altas pressões necessárias para eluir à fase móvel e com grande capacidade de separação como bombas, detector, registrador e colunas específicas (OLIVEIRA, 2009; GAMBINI et al., 2015; ZIKA et al., 2015).

A Figura 2 demonstra de maneira simplificada as etapas pertencentes a um HPLC e qual o caminho percorrido por toda a substância. Ao final desse processo de análise, pode-se acoplar um detector PDA de matriz de fotodiodo (HPLC-PDA) ou espectrometria de massa em tandem (LC/MS-MS). O Detector de Arranjo de Diodos proporciona quantificação e identificação de traços de impurezas, com alta sensibilidade cromatográfica e espectral, possibilitando o desenvolvimento de métodos de análise. Já na Espectrometria de Massas, as amostras são convertidas em íons em fase gasosa, sendo na sequência separados de acordo com a sua razão massa ( $m$ )/ carga ( $z$ ). (VANAJA, MARTIN E BUKARICA, 2013; ZIKA et al., 2015).

Figura 2: Estrutura esquematizada adaptada de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CZAPLICKI, 2014).



A principal vantagem do HPLC-PDA frente aos outros métodos ocorre devido à possibilidade de detecção de concentrações mais baixas do resveratrol e seus metabólitos além de outros compostos utilizados na extração (SANTOS, 2011). Esse método também fornece análises espectrais rápidas e com baixo ruído, viabilizando o processamento de espectros, utilizando bibliotecas espectrais para identificação de componentes e múltiplas exibições espectrais (SALIPIRA et al., 2006; RAUF et al., 2017).

O uso da cromatografia em larga escala permitiu não só obter resultados em um curto espaço de tempo como possibilitou a realização de separações e análises quantitativas com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Vale frisar que, para a correta utilização e aceitabilidade de um método, é necessário a sua validação, compreendendo todos os parâmetros exigidos de confiabilidade como seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão, estabilidade do analito e matriz biológica, estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta e longa duração, estabilidade de pós-processamento, estabilidade do analito e padrão interno em solução (RIFICI, SCHNEIDER e KHACHADURIAN 2004; RDC ANVISA Nº 27 DE MAIO DE 2012; MARTINS, 2016).

A validação do método bioanalítico ocorre de acordo com as exigências da ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RDC ANVISA Nº 27 DE MAIO DE 2012; BRASIL, 2012). Esta RDC 27/2012 dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Ela preconiza que sejam realizados os seguintes testes:

**a) Seletividade:** Essa etapa visa certificar a capacidade que o método possui em detectar o analito de interesse, mesmo quando esse se encontra na presença de impurezas ou quaisquer componentes da matriz que possam impossibilitar a análise. Para a realização do teste de seletividade, utilizam-se seis amostras distintas conforme preconiza a legislação, sendo que todas as curvas não apresentaram diferenças significativas ao nível de confiança de 95%.

**b) Limites:** O limite inferior de quantificação (LIQ) se caracteriza por representar a menor concentração do analito na curva de calibração passível de detecção nas condições experimentais estabelecidas. Já o limite de detecção (LD) corresponde à capacidade de identificação do analito na amostra sem necessariamente quantificá-lo.

**c) Linearidade:** Esse parâmetro se refere à capacidade que o método possui de apresentar resultados proporcionais em diferentes concentrações analisadas do analito.

**d) Curva de Calibração:** Esse dado se caracteriza por ser uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de analito e o sinal correspondente observado. No mínimo cinco pontos são selecionados para a obtenção desta curva devendo apresentar, sempre que possível, valores próximos a rotina de trabalho no laboratório.

**e) Precisão e exatidão:** Garantir a precisão significa afirmar que os resultados obtidos nos ensaios da validação são próximos garantindo a repetibilidade e reprodutibilidade de todo o processo. Já a exatidão refere-se à capacidade de se obter respostas próximas ao valor verdadeiro mensurado.

**f) Estabilidade do analito em matriz biológica:** Os estudos de estabilidade de curta e longa duração, ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento se enquadraram nos padrões determinados pela resolução, não apresentando variações superiores a 15 % em relação à solução. Visa assegurar que a concentração do analito, a ser determinada na amostra, permaneça estável durante o decorrer do estudo, respeitando as mesmas condições de armazenamento, preparo e análise. Analisam-se os seguintes parâmetros:

**I. Estabilidade de curta duração:** As amostras são processadas após permanecerem por 24 horas em temperatura ambiente, tempo esse muito superior ao que as amostras são mantidas no decorrer do estudo.

**II. Estabilidade de longa duração:** As amostras são analisadas após seu armazenamento que se iniciou entre a primeira coleta de amostra e as últimas análises. Esse armazenamento se deu na mesma temperatura das demais amostras em estudo.

**III. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento:** As amostras são congeladas por no mínimo 12 horas e posteriormente descongeladas à temperatura ambiente. Esse ciclo repete-se por pelo menos três vezes, sendo o analito quantificado após o último ciclo.

Assim, após o desenvolvimento do processo de validação, a técnica analítica já estará adequada para ser aplicada aos estudos de farmacocinética.

## 2.4. FARMACOCINÉTICA

A natureza dinâmica dos fatores que afetam a capacidade de um fármaco em atuar em determinado paciente no decorrer do tempo depende tanto de aspectos relacionados ao próprio paciente como os intrínsecos às propriedades físico-químicas do composto. Entende-se farmacocinética como a distribuição dos xenobióticos no organismo após sua administração e farmacodinâmica como a relação entre a concentração do composto e a magnitude da resposta farmacológica observada (BAUR e SINCLAIR, 2006). Deste modo, podemos definir mais especificamente a Farmacocinética como sendo o estudo do movimento, em especial dos fármacos, dentro, através e fora de um determinado local de ação mediante a análise de sua absorção, distribuição, biotransformação, excreção e biodisponibilidade (VANAJA et al., 2013).

Ao longo da história, produtos naturais possibilitaram a análise de compostos com aplicações nos campos da biologia, medicina e farmácia. Nesse sentido, a busca por novas fontes de fármacos continua sendo linha importante de estudo. Dados disponibilizados pela Convenção da Diversidade Biológica (CDB) colocam o Brasil como detentor de aproximadamente 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o país com maior número de espécies endêmicas. Apesar disso, muitos são completamente desconhecidos, fazendo desse nicho uma imensurável fonte de estudo (GONCALVES et al.; 2016).

Até a mais promissora das terapias está fadada ao fracasso se o fármaco for incapaz de alcançar o seu órgão-alvo em uma concentração que possibilite o efeito terapêutico desejado. Por muitas vezes essencial, as características que tornam o corpo humano resistente a danos causados por invasores estranhos e substâncias tóxicas acabam se tornando também fatores que limitam a capacidade dos fármacos de combater processos patológicos (OLIVEIRA, 2009; MACEDO, BATTESTIN e MATSUDA 2016). Entretanto, os metabólitos são usualmente complexos para uso em escala industrial, sendo que o rendimento dos metabólitos secundários pode ser altamente variável, dependendo da origem da planta, sua localização, época de colheita e condições ambientais. Outra preocupação do uso de compostos de origem natural é a frequente depleção dramática da população destas plantas (LUCERI et al., 2002; JIANGHONG FAN, 2013; LEWANDOWSKA et al., 2013).

O reconhecimento dos numerosos fatores que afetam a atuação de um fármaco bem como o estudo desses aspectos, é de suma importância para a prática clínica das diversas áreas da saúde. Os processos farmacocinéticos se subdividem em absorção, distribuição, metabolização e excreção. Basicamente, a absorção é definida como a

transferência de um fármaco do seu local de administração até a circulação sanguínea, sendo que a velocidade e a eficiência da absorção dependem, entre outros fatores, da via de administração escolhida. Já a distribuição está diretamente ligada à concentração do fármaco livre, sua afinidade pelos locais de ligação e pela quantidade das proteínas de transporte. Denominamos metabolização os processos metabólicos dos fármacos que ocorrem geralmente através de sistemas enzimáticos especializados visando sua modificação bioquímica ou degradação. E por último, qualificamos a excreção como o ato de expelir produtos residuais do metabolismo eliminando-os do organismo (ARANGO, RENEDO e IRACHE 2000; DORNAS et al., 2009; SADOVOY et al., 2011).

Para a verificação analítica desses processos, os estudos farmacocinéticos exigem a análise de certos parâmetros básicos, a ver:

**a)** Meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ): representa o tempo gasto para que a concentração plasmática ou a quantidade original de um fármaco se reduza a metade.

**b)** Concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ): A  $C_{max}$  do fármaco é estimada a partir da curva de concentração pelo tempo e varia de acordo com a via de administração, dose utilizada, tempo decorrido do início da exposição, sua distribuição e eliminação. Na maioria dos fármacos, o perfil cinético é diretamente proporcional à velocidade de transporte, quantidade de fármaco a ser transportado e de uma constante de velocidade, chamada cinética de primeira ordem.

**c)** Tempo para atingir a concentração plasmática máxima ( $T_{max}$ ): é definido como o tempo de maior concentração no sangue após administração.

**d)** Área sob a curva de concentração *versus* tempo ( $AUC_T$ ): é considerada representativa da quantidade total de fármaco absorvido na circulação sistêmica.

**e)** *Clearance* ( $CL_T$ ): define-se como o volume de plasma no qual o fármaco é completamente removido por unidade de tempo. O clearance total de um fármaco é igual à soma dos *clearances* efetuados por cada órgão envolvido na eliminação, como, por exemplo, o fígado e os rins.

**f)** Volume aparente de distribuição ( $V_d$ ): é um volume hipotético de fluido corporal, extra ou intracelular, no qual o fármaco está dissolvido e é distribuído, podendo ser expresso como um simples volume ou como percentagem do peso corporal

**g)** Biodisponibilidades absoluta e relativa: Se relacionam diretamente com a velocidade e extensão que uma substância é absorvida, tornando-se disponível em

um determinado local de ação a partir de uma determinada forma farmacêutica,.  
Devemos considerar:

• **Biodisponibilidade Absoluta**, como sendo a biodisponibilidade de uma preparação farmacêutica administrada por uma determinada via de administração, comparada com a biodisponibilidade da mesma preparação administrada por via endovenosa (nesta dissertação: via peroral x via intravenosa).

• **Biodisponibilidade Relativa**, como sendo a biodisponibilidade de duas preparações farmacêuticas diferentes, administradas pela mesma via, que não a endovenosa (nesta dissertação: via peroral).

Os principais desafios dos estudos de farmacocinética são obter acesso aos órgãos e tecidos relevantes e o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos com sensibilidade suficiente para o composto de estudo. A abordagem compartimental vê o corpo como uma série de compartimentos, cada um representando uma combinação de vários tecidos e órgãos que estão em equilíbrio dinâmico um com o outro com respeito às concentrações do composto. A farmacocinética visa prever uma relação entre dados pré-clínicos obtidos através de estudos em espécies animais com a espécie humana. Para tanto, a escala alométrica e fisiológica são modelos que auxiliam nessa avaliação (LANNON, 2007; SEFORA-SOUSA, 2013).

A primeira é baseada unicamente em diferenças de tamanhos do corpo, sem necessariamente analisar os mecanismos subjacentes. Já a fisiológica se baseia em fatores fisiológicos, anatômicos e bioquímicos importantes, incluindo taxas de fluxo sanguíneo de órgãos, no tamanho, volume e fluidez dos tecidos, concentração dos compostos no plasma, ligações de proteínas e metabolização por enzimas e atividades transportadoras. Apesar de interessante devido à quantidade de dados, a aplicabilidade desse modelo tem sido limitada graças à sua complexidade matemática e as exigências da grande quantidade de dados pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) (SEFORA-SOUSA, 2013; SUVARNA, GUJAR e MURAHARI, 2017).

Para que todas essas referências sejam coerentes com a realidade, faz-se necessário rememorar alguns fatores que alteram os parâmetros farmacocinéticos, tais como o consumo desmedido de álcool, o tabagismo, uma nutrição insuficiente ou desregulada. A idade, os fatores genéticos, o estado físico do fármaco, a presença de

excipientes e a sua capacidade de dissolução também são grandes influenciadores desses dados (LAMATTINA e GOLAN, 2009).

Após todas essas reflexões, acredita-se que a complexação às CDs possibilitaria otimizar o uso do resveratrol. Frente à viabilidade dos métodos que serão propostos e das possíveis aplicações do produto final obtido, o estudo não só se faz relevante como se firma como mais uma etapa importante para ampliar o acesso e conseqüente aumento da eficiência do resveratrol em formulações farmacêuticas.

### 3.1. GERAL

- Otimizar as utilizações *in vivo* do resveratrol através da elaboração de um complexo resveratrol-hidroxi- $\gamma$ -ciclodextrina (RES-Y-CD), visando melhorar a solubilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade.

### 3.2. ESPECIFICOS

- Planejar e realizar a complexação analisando parâmetros de sua estabilidade e estrutura.
- Validar técnica analítica para quantificar o resveratrol na matéria-prima e no complexo RES-Y-CD.
- Determinar o perfil cinético e os valores de biodisponibilidade absoluta e relativa do complexo RES-Y-CD em roedores.

### 4.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

- Acetato de Etila grau HPLC adquirido do JTBaker™
- Acetonitrila (ACN) grau HPLC adquirida do JTBaker™
- Ácido 3-metil-hipúrico adquirido pela Sigma™
- Ácido acético PA adquirido da Vetec™
- Ácido clorídrico PA adquirido da Vetec™
- Balança AY220 Shimadzu™
- Coluna C-8 (150 x 40 mm), partícula de 5 µm adquirida da ACE™
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector PDA SPDM-20AT (HPLC-PDA) Shimadzu™
- Dimetilsulfóxido grau HPLC adquirida do JTBaker™
- Hidroxipropil-γ-ciclodextrina Ashland™
- Lavadora Ultrassônica Unique®
- Micro-centrifuga CF16RN Hitachi™
- Resveratrol – Florian (China; Lote: 20170608)
- Tween 80 grau HPLC adquirida do JTBaker™
- Ultrapurificador de água OS10 LZ Gehaka™

O padrão interno de escolha foi o ácido 3-metil-hipúrico da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). Essa seleção se baseia nas suas propriedades físico-químicas compatíveis com a substância em análise, possuindo uma concentração conhecida, ao mesmo tempo em que se caracteriza por não ser substância endógena e não constar na matriz estudada. A produção se deu com 500 µL do ácido transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e volume total restante preenchido com Água Ultra Purificada.

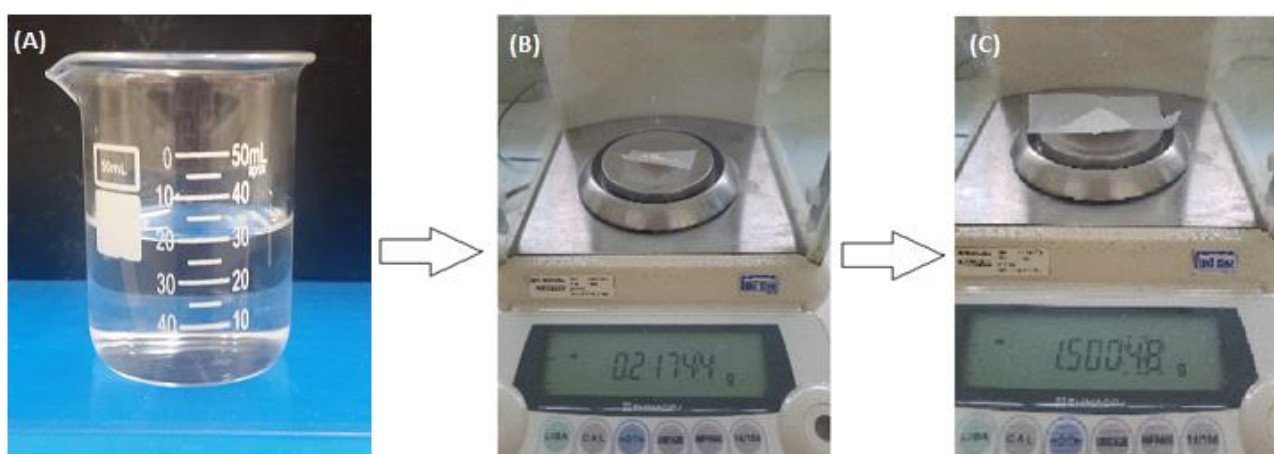
### 4.2. PREPARO DO POLÍMERO

A matéria prima resveratrol foi adquirida em parceria com a Farmácia Escola da Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Goiás, Brasil). De origem chinesa, o resveratrol utilizado tem validade de 06/2019 e lote de referência nº 20170608, apresentando teor do

princípio ativo superior a 99%. A hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (ASHLAND; Lote: 6008013) foi gentilmente cedida pelo Professor Dr<sup>o</sup>. Ricardo Neves Marreto responsável pelo NANOSYS – Laboratório de Nanosistemas e Dispositivos de Liberação Modificada de Fármacos da Universidade Federal de Goiás. A fase móvel utilizada foi água ultra purificada, acidificada com ácido acético 0,2% (p/v) ph 3,0 e acetonitrila (62:38, v/v), degaseificada por sonicação em banho ultrassônico por no mínimo 15 minutos antes da sua utilização. Utilizou-se Coluna C8 ACE (150 x 4,0 mm, com partículas de 5  $\mu$ m), submetida à temperatura de 30 °C com um fluxo de 1 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 50  $\mu$ L. Todos os analitos foram monitorados no comprimento de onda de 306 nm.

A técnica para a elaboração do complexo RES-Y-CD foi retirada de ERNEST SOO et. al., 2015, adaptada sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Marreto. A Figura 3 contém fotos das primeiras etapas para a elaboração deste complexo. No método, pesou-se 15 mL de água ultrapurificada e 15 mL de etanol absoluto em um béquer de 50 mL (A), criando assim uma solução hidroetanólica de relação molar 1:1 (v/v). Dessa mistura final, retirou-se 15 mL, transferindo-os para um recipiente de vidro devidamente revestido em papel alumínio, a fim de evitar a entrada de luz durante todo o processo. Depois, pesou-se 217 mg de resveratrol (B) e 1,5 g de hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina (C) em balança calibrada, adicionando-os a este recipiente.

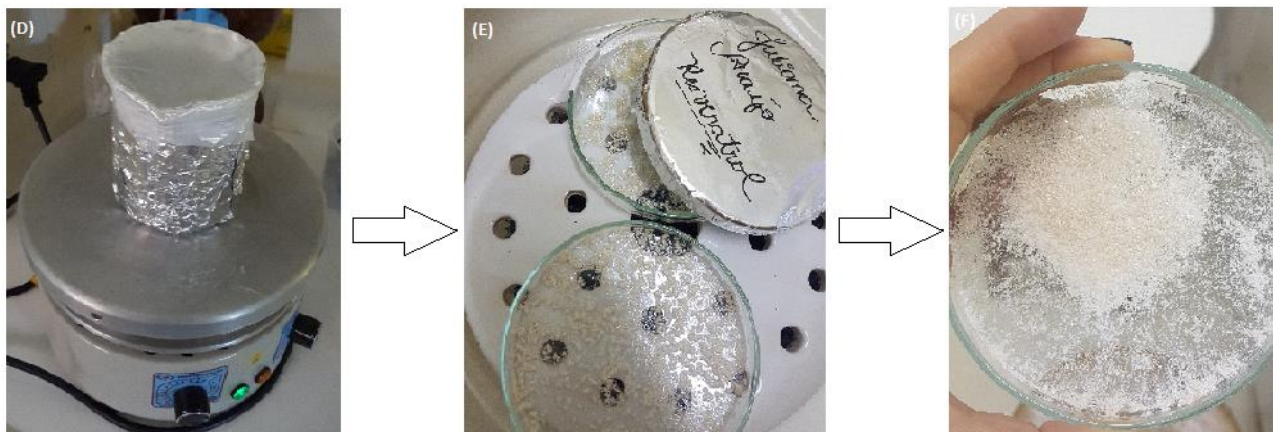
Figura 3: Preparação do complexo de inclusão do resveratrol em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina – etapas iniciais com pesagem e preparação da solução (arquivo pessoal).



Submeteu-se toda a mistura a uma agitação constante em Agitador Magnético (Modelo Q261-22) pelo período de 24h (D) sem variações de temperatura e com vedação com Parafilm M., conforme fotos da Figura 4. Após esse período, transferiu-se a mistura

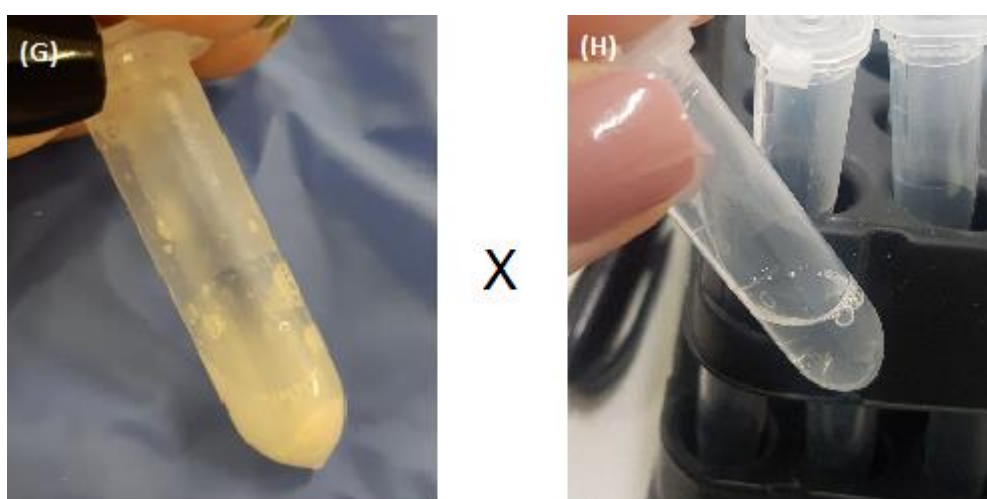
para uma placa de petri (E), deixando-a em dessecador até completa secagem (F). (Todas as imagens foram registradas pelo autor durante o processo).

Figura 4: Preparação do complexo de inclusão do resveratrol em hidroxí- $\gamma$ -ciclodextrina – etapas finais com a agitação e a dessecagem do complexo de inclusão (arquivo pessoal).



No que tange a sua solubilidade, podemos observar na Figura 5 como o RES-Y-CD se apresenta diluído e límpido após a adição de 2  $\mu$ L Dimetilsulfóxido (DMSO) e uma gota de Tween 80. Tal aspecto não é observado quando repetimos esse processo com o resveratrol puro, no qual observamos um grumo no fundo do *ependorf*, totalmente insolúvel mesmo após agitação e aquecimento.

Figura 5: Comparação das características físico-químicas de 25mg do resveratrol (G) e 25mg do complexo RES-Y-CD (H) ambos diluídos em 0,5 mL de água (arquivo pessoal).



Todo o pó obtido ao final do processo foi transferido e armazenado em um tubo *falcon* revestido em papel alumínio devidamente protegido da luz.

### 4.3. ENSAIOS DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE DO RESVERATROL EM MATERIAL BIOLÓGICO

A validação do método bioanalítico realizada ocorreu de acordo com as exigências da ANVISA, RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2012). Para a análise das soluções-padrão, preparou-se o resveratrol na concentração de 1 mg/mL em Acetonitrila, realizando diluições e obtendo os sucessivos pontos utilizados na curva de calibração, a ver: 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL. Os pontos escolhidos para os controles de qualidade de diluição (CQD), alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB) e para o limite inferior de quantificação (LIQ) foram respectivamente: 7,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 0,15 µg/mL e 0,05 µg/mL. O Quadro 3 abaixo resume todos os etapas que foram seguidas para a obtenção de todos esses parâmetros.

Quadro 3: Procedimento dos ensaios de validação para análise do resveratrol puro e do RES-Y-CD em material biológico.

| Ensaio                                    | Técnica                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Seletividade</b>                       | Para o teste de seletividade foi utilizado o plasma de seis ratos. Conforme exigido em legislação, foram avaliadas amostras em plasma branco e plasma hemolisado utilizadas para a construção das curvas de adição padrão sendo também construída uma curva em solução. Os coeficientes angulares das curvas foram comparados com intuito de verificar se há diferenças significativas, no nível de 95 % de confiança. |
| <b>Limite de Detecção e Quantificação</b> | Os Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LIQ) foram obtidos injetando concentrações decrescentes das amostras. Estabeleceu-se o LIQ ao se atingir o menor nível determinável com precisão e exatidão e o LD foi estipulado ao se atingir o menor nível detectável do analito. Após diversas tentativas, o LD utilizado no método foi de 0,015 µg/ml enquanto o LIQ estabelecido foi o de 0,05 µg/ml.               |
| <b>Linearidade e Curva de Calibração</b>  | Para determinação da curva de calibração foram analisadas amostras extraídas da matriz biológica, sendo duas amostras brancas (matriz isenta de padrão do analito e do padrão interno), duas amostras zero (matriz isenta de padrão do analito) e dez amostras de concentrações diferentes (0,05 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5,0 µg/ml; 4,0 µg/ml;                                  |

---

2,0 µg/ml; 0,15 µg/ml), sendo esses três últimos referentes à CQA, CQM e CQB. A linearidade do método se manteve observando a proporcionalidade da razão de área dos picos no cromatograma. Todos os pontos foram analisados em plasma sempre em duplicata, sendo posteriormente comparados ao mesmo teste em solução. Essas concentrações foram definidas levando-se em consideração a sensibilidade da técnica bioanalítica e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas.

---

#### **Precisão e Exatidão**

Nesses testes, todos os pontos de controles foram analisados, sendo o **LIQ** (0,05 µg/ml) o ponto inicial da curva de calibração; **CQB** (0,15 µg/ml) - Controle de Qualidade de Baixa concentração: matriz adicionada do analito em concentração até três vezes superior ao LIQ; **CQM** (2,0 µg/ml) - Controle de Qualidade de Média concentração, matriz adicionada do analito em concentração próxima a média entre os limites inferior e superior de quantificação; **CQA** (4,0 µg/ml) - Controle de Qualidade de Alta concentração: matriz adicionada do analito que corresponde de 75-85% da maior concentração da curva de calibração e **CQD** (7,0 µg/ml) - Controle de Qualidade de Diluição: matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração, sendo realizado posteriormente processo de diluição pré-definido pelo laboratório de análise. A exatidão foi determinada em uma mesma corrida, chamada de exatidão intracorrída e em outras três corridas diferentes (exatidão intercorridas). Essas últimas ocorreram em dias distintos entre si. Em cada processo, foram analisadas cinco replicatas referente às cinco concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Conforme especifica a resolução, o método se mostrou preciso e exato, onde o LIQ não pode variar mais de 20% e os controles (CQB, CQM, CQA E CQD) não mais de 15%.

---

#### **Estabilidade de longa duração**

Para todos os testes de estabilidade, o desvio padrão deve apresentar valores inferiores a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. As amostras da matriz foram contaminadas com as concentrações dos controles (CQB e CQA) em triplicata e armazenadas em freezer a -20°C por 21 dias. Ao final deste tempo, essas amostras foram analisadas em HPLC juntamente com curva de calibração e controles recentes.

---

#### **Estabilidade de curta duração**

Para verificar a estabilidade do analito em matriz biológica, foi utilizada uma curva de calibração recém-preparada e a matriz contaminada com as concentrações de CQB e CQA, sendo feita

---

---

uma triplicata para cada concentração. A matriz contaminada permaneceu sobre a bancada a temperatura ambiente por quatro horas, antes do processamento da amostra.

---

**Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Os controles de qualidade em triplicata foram armazenados em freezer -20°C por 24 horas e então retirados, permanecendo a temperatura ambiente até completo descongelamento. Posteriormente foram novamente congelados por mais 24 horas. Esse processo foi repetido por 3 ciclos. Ao final, estas amostras foram processadas juntamente com a curva de calibração e controles recém-contaminados.

---

#### **4.4. FARMACOCINÉTICA**

Os ensaios de farmacocinética foram realizados em ratos *Wistar* machos com peso aproximado de 300 g. Estes permaneceram acondicionados no biotério da Faculdade de Farmácia - UFG à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com umidade relativa do ar entre 50 a 70% e monitoramento do ciclo claro-escuro a cada 12 horas. Durante todo o experimento os animais receberam água filtrada e ração *ad libitum*. Utilizaram-se três animais para avaliação farmacocinética em cada via de administração proposta. Para a via intravenosa, a dose de administração escolhida foi de 10 mg/kg, com adição de 25  $\mu\text{L}$  de DMSO, 10  $\mu\text{L}$  de Tween 80 e o restante sendo completado com solução fisiológica. Já para a via oral, a dose de administração estabelecida foi de 60 mg/kg. Para obtenção de solubilidade adequada, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de DMSO, 80  $\mu\text{L}$  de Tween 80 e o restante de solução fisiológica. Após administração do preparado, os tempos de coleta de amostra estabelecidos em ambas as vias foram: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, e 24h. Tais pontos foram escolhidos com base na rotina do laboratório responsável pela análise dos animais, possibilitando a verificação farmacocinética. Os procedimentos de manejo e cuidado foram realizados com base no *Niehs Handbook for Investigators and Technicians*, do *National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)*, Estados Unidos da América, de setembro de 2007, visando minimizar o sofrimento dos animais. A experimentação ocorreu no Núcleo Integrado de Neurociências e Fisiologia Cardiovascular (CPNFC) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino e sua aluna de doutorado Lara Marques Naves. Todos os experimentos seguiram criteriosamente o exigido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 065/18).

A obtenção dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada observando-se os perfis individuais dos animais pertencentes aos grupos experimentais, divididos em **tratamento 1** – ocorrendo a administração do resveratrol sem modificações e **tratamento 2** –

administrou-se o complexo RES-Y-CD. As médias dos parâmetros farmacocinéticos foram calculadas após obtenção das concentrações nos respectivos tempos de coleta de amostra, sendo os valores posteriormente plotados no *software* Winnolin Phoenix 64-8.1.

A fim de determinar qual o teste mais adequado para a análise estatística, uma verificação de normalidade foi realizada no software GraphPad Prism 5, utilizando as médias das concentrações obtidas na via oral e na intravenosa e as respectivas curvas de concentração plasmática x tempo. Em ambos os tratamentos, os resultados não passaram no teste de normalidade se encaixando no grupo dos não paramétricos. Diante disso e levando em consideração que o projeto dispõe de uma pequena amostra ( $n = 3$ ) com variação anormal, o modelo compartimental que melhor se adequou ao experimento foi o Mann-Whitney (BOROUJERDI, 2002; AMORIM et al., 2006). Foram mensurados os seguintes parâmetros:

**a) Meia Vida de Eliminação ( $t_{1/2}$ ):** representa o tempo gasto para que a Concentração Plasmática se reduza a metade. Foi obtido a partir da equação:

$$k = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

Onde  $k$  = representa as constantes de velocidade em geral.

**b) Concentração Plasmática Máxima ( $C_{max}$ ):** é estimada a partir da curva de concentração pelo tempo, onde ( $V$ ) é a velocidade de transporte das substâncias, expressa em mg/min ou ml/min; ( $A$ ) a quantidade do fármaco a ser transportado e ( $K$ ) a constante de velocidade:

$$V = K \times A$$

**c) Tempo para atingir a Concentração Plasmática Máxima ( $T_{max}$ ):** A taxa ou velocidade a que um fármaco é absorvido determina o  $T_{max}$ , caracterizado por ser o tempo de maior concentração no sangue após administração. Assim sendo, quanto mais rápida a taxa de absorção, mais cedo será atingido o  $T_{max}$ .

**d) Área Sob a Curva ( $AUC_T$ ):** Num gráfico de concentração plasmática versus tempo, a área sob a curva é considerada representativa da quantidade total de

fármaco absorvido na circulação sistêmica. É calculada através do método dos trapezoides.

**e) Volume Aparente de Distribuição (Vd):** É obtido através da razão entre a concentração de fármaco administrada intravenosamente (dose administrada - D) e a concentração de fármaco no sangue ou plasma (CP):

$$V_d = D/CP$$

**f) Clearance (CL<sub>T</sub>):** A partir do conhecimento do t<sub>1/2</sub> e do Vd, o *clearance* pode ser determinado da seguinte forma:

$$CL_T = \frac{0,693 \times Vd}{t_{1/2}}$$

**g) Biodisponibilidade Absoluta e Relativa:** A biodisponibilidade de uma substância deve ser conhecida e reprodutível. Como a atividade farmacológica se relaciona melhor com a quantidade de fármaco que atinge a circulação sanguínea do que com a dose administrada, as concentrações plasmáticas constituem um bom índice de avaliação do efeito terapêutico. Por definição, a biodisponibilidade de um medicamento administrado por via intravenosa é de 100%, com a dose estando totalmente disponível no organismo. Para a obtenção da biodisponibilidade absoluta, utilizam-se os dados obtidos de área sob a curva na via oral ( $AUC_{PO}$ ) e na via intravenosa ( $AUC_{IV}$ ) bem como as doses administradas tanto na via oral ( $DOSE_{PO}$ ) quanto intravenosa ( $DOSE_{IV}$ ), conforme a seguinte expressão:

$$\frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \times \frac{DOSE_{IV}}{DOSE_{PO}}$$

Já para a obtenção da biodisponibilidade relativa, a expressão de uso é:

$$\frac{AUC_{RES-Y-CD}}{AUC_{RES}} \times 100\%$$

Onde  $AUC_{RES-Y-CD}$  é a área sob a curva do complexo obtida na administração oral e  $AUC_{RES}$  área sob a curva do produto sem modificações, também obtida pela via oral.

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA

As análises ocorreram no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – CRTI.

### 5.2. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As medidas de difração de raios-X (DRX) para o resveratrol (Figura 5) e para o RES- $\gamma$ -CD (Figura 6) foram realizadas em um difratômetro Bruker D8 Discover. Utilizou-se radiação monocromática de um tubo com anodo de cobre acoplado a um monocromador Johansson para  $K\alpha_1$  operando em 40kV e 40mA, configuração Bragg-Brentano  $\theta$ - $2\theta$ , detector unidimensional Lynxeye, intervalo de  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $50^\circ$ , com passo de  $0,01^\circ$ , em rotação de 15 rpm durante a medida. Obteve-se o resultado a partir da soma de dezoito medidas.

Analisando os difratogramas abaixo (Figuras 6 e 7), podemos observar que as amostras apresentaram características cristalográficas muito diferentes: o resveratrol puro está cristalizado, enquanto o complexo possui uma fase amorfa bem predominante. Na Figura 6 o RES possui intensos picos de difração com intensidade de sinais superiores a 3000 counts.

Esses valores não se mantêm quando se observam os picos obtidos pelo DRX do RES- $\gamma$ -CD da Figura 7, que possuem valores máximos próximos a 1000 counts. Essa redução da intensidade dos sinais, o aspecto amorfo do complexo e a consequente redução do grau cristalino podem ser considerados provas indiretas de complexação, sugerindo uma maior quantidade de compostos de inclusão frente ao fármaco livre no produto obtido (BERTACCHE et al., 2006).

Figura 6: Difratoograma de raios-X do resveratrol.

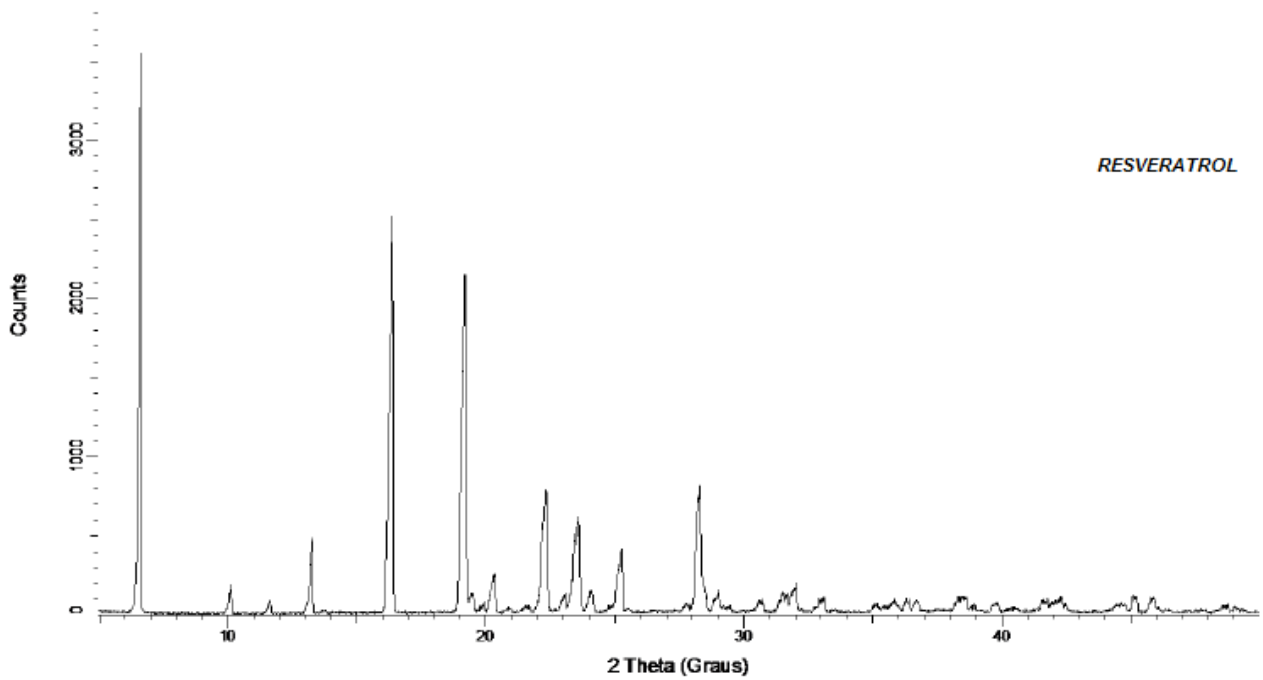
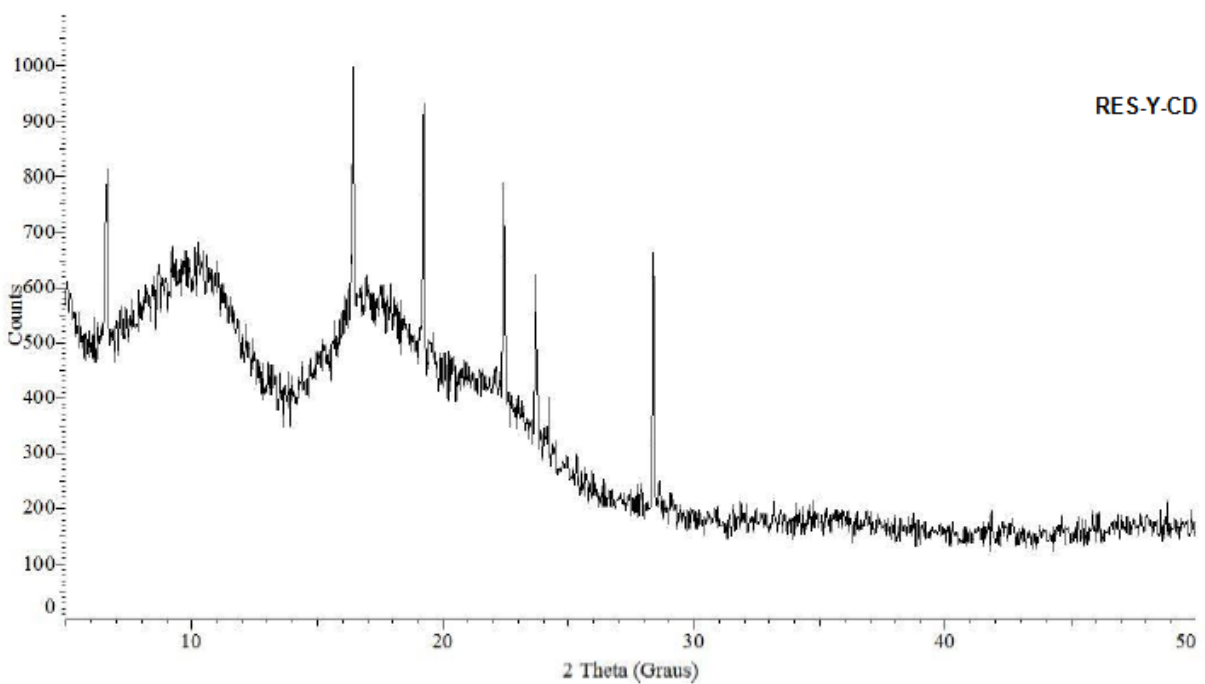


Figura 7: Difratoograma de raios-X do resveratrol complexado com ciclodextrina (RES-γ-CD).



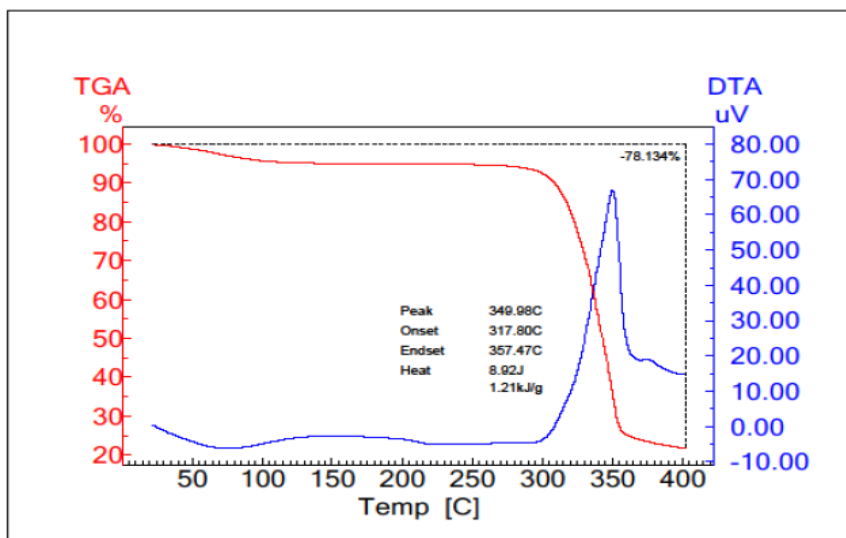
### 5.3. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMÉTRICA

O termograma foi obtido pela análise térmica diferencial e termogravimétrica (DTA-TG), usando um equipamento Shimadzu DTG-60H. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura de 25 a 400 °C, usando taxa de aquecimento de 10°C/min, fluxo de nitrogênio de 100 mL/min e ar sintético 100 mL/min com cadinhos de platina de 70 µL.

É relatado em literatura que o resveratrol se mostra termicamente estável até 240°C com um pico endotérmico acentuado em aproximadamente 267°C, apresentando 50% de perda de massa associada à sua fusão (MENDES, 2011). Já no complexo estudado, observamos que a amostra se mantém estável até 317,8 °C, atingindo seu ápice em 349,98 °C e apresentando uma degradação de massa de 78,13% a uma temperatura de 400°C.

No que tange à perda de massa, apesar de favorecer a complexação, o aumento de temperatura também pode desestabilizá-la, com sua estabilidade térmica variando de acordo com a molécula hospedeira. Observamos que a estrutura complexada (Figura 8) apresentou uma degradação proporcionalmente maior dentro dos parâmetros analisados, mostrando que, apesar da proteção térmica da ciclodextrina se estender por uma faixa mais extensa de temperatura, após o rompimento desta barreira, a degradação ocorre de maneira acentuada. A complexação às ciclodextrinas representa um aumento significativo na estabilidade térmica, permitindo se necessário, a utilização do complexo em condições drásticas de temperatura (SALTÃO e VEIGA, 2011). As modificações relatadas sugerem a complexo de inclusão conforme metodologia proposta.

Figura 8: Análise térmica diferencial e termogravimétrica do resveratrol complexado com ciclodextrina (RES-γ-CD).



#### 5.4. VALIDAÇÃO DA TÉCNICA ANALÍTICA EM HPLC-PDA

Para estabelecimento da exatidão do método, deve-se obter o limite de variação e da especificidade do mesmo além da sua linearidade. Para isso utiliza-se no mínimo 9 (nove) determinações contemplando o limite de variação do procedimento, sendo: 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada .

Os ensaios devem ser realizados um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias diferentes (exatidão inter-dias). Na Tabela 1 encontram-se os valores para cada ponto e suas triplicatas, mostrando a precisão e exatidão obtidas dos controles de qualidade de diluição (CQD), alto (CQA), médio (CQM), baixo (CQB) e para o limite inferior de quantificação (LIQ). Todos os resultados ficaram dentro do que a legislação preconiza, garantindo que o método seja preciso e exato.

Tabela 1: Parâmetros analíticos de validação (precisão e exatidão intra e interdia), em HPLC-PDA, para quantificação do resveratrol em plasma humano.

| Nível | [ ] µg/mL | Lote | Intradia<br>(n=5) |                 | Interdia<br>(n=5) |                 |
|-------|-----------|------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
|       |           |      | Precisão<br>(CV%) | Exatidão<br>(%) | Precisão<br>(CV%) | Exatidão<br>(%) |
| LIQ   | 0,05      | 1    | 6,42              | 96,00           | 2,64              | 111,73          |
|       |           | 2    | 0,75              | 119,60          |                   |                 |
|       |           | 3    | 0,75              | 119,60          |                   |                 |
| CQB   | 0,15      | 1    | 9,99              | 106,67          | 9,76              | 100,58          |
|       |           | 2    | 11,54             | 95,60           |                   |                 |
|       |           | 3    | 7,76              | 99,47           |                   |                 |
| CQM   | 2,0       | 1    | 14,57             | 94,77           | 9,80              | 98,03           |
|       |           | 2    | 7,42              | 99,66           |                   |                 |
|       |           | 3    | 7,42              | 99,66           |                   |                 |
| CQA   | 4,0       | 1    | 13,44             | 90,33           | 9,37              | 97,51           |
|       |           | 2    | 5,99              | 100,85          |                   |                 |
|       |           | 3    | 8,68              | 101,36          |                   |                 |
| CQD   | 7,0       | 1    | 9,09              | 94,88           | 6,99              | 101,58          |
|       |           | 2    | 6,16              | 111,67          |                   |                 |
|       |           | 3    | 5,72              | 98,21           |                   |                 |

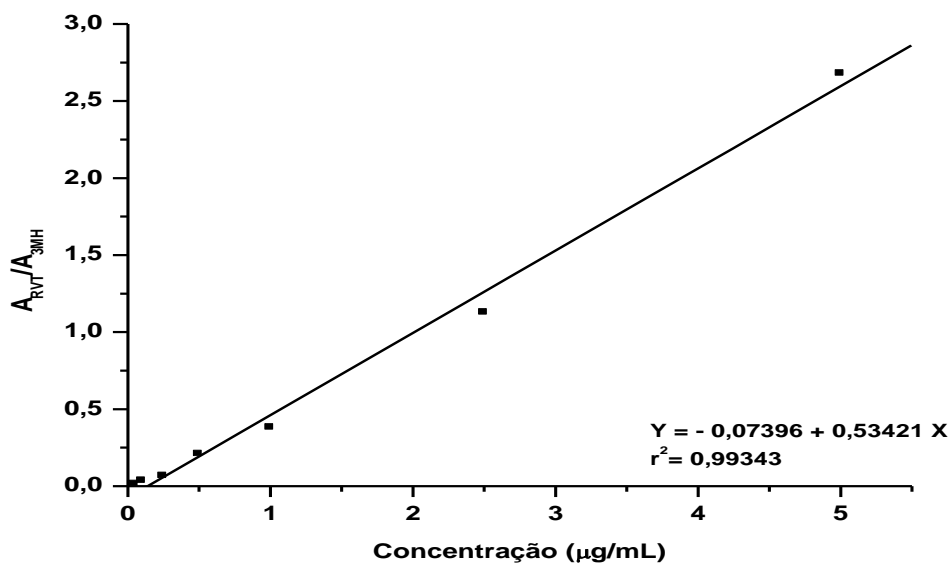
A fim de garantir a estabilidade no decorrer de todo o estudo, calculou-se o desvio entre o valor teórico e o experimental encontrado em diferentes processamentos. Após secagem, o aspecto do produto voltou a ser um pó fino e branco. Observou-se que em 100% do pó obtido na complexação, apenas 14,49% de resveratrol se encontrava complexado, sendo essa proporcionalidade considerada para os testes de RES-Y-CD. Nota-se na Tabela 2 que a estabilidade foi garantida e permaneceu dentro dos critérios exigidos.

Tabela 2: Perfil de estabilidade do analito resveratrol sob diferentes condições de processamento do plasma humano adicionado, em análise por HPLC-PDA.

| Estabilidade                           | [ ] Nominal<br>µg/mL | [ ] Experimental<br>µg/mL | Desvio (%) |
|----------------------------------------|----------------------|---------------------------|------------|
| Curta duração                          | 0,15                 | 0,14                      | -8,17      |
|                                        | 4                    | 3,77                      | -5,68      |
| Longa duração                          | 0,15                 | 0,15                      | 0,0        |
|                                        | 4                    | 4,30                      | 7,55       |
| Ciclos de congelamento/descongelamento | 0,15                 | 0,16                      | 6,08       |
|                                        | 4                    | 4,01                      | 0,02       |

A Figura 9 apresenta a curva de calibração para a análise do resveratrol, que se mostrou satisfatória com coeficiente linear ( $r^2= 0,99343$ ).

Figura 9: Curva de calibração em plasma humano para quantificação de resveratrol utilizando HPLC-PDA.



## 5.5. FARMACOCINÉTICA

### 5.6. VIA INTRAVENOSA

Para o estudo intravenoso (IV), o volume administrado foi de 0,1 mL com uma dose de 10 mg/kg por animal. Logo após administração, o fármaco começou a ser prontamente absorvido e metabolizado, possibilitando a determinação do seu perfil de concentração pelo tempo. Devido à característica lipossolúvel e elevada afinidade pela proteína albumina, o processo de distribuição do resveratrol pelos tecidos ocorre por transporte

passivo e proteína carreadora, com eliminação sendo auxiliada potencialmente pela bile e urina (ZHONG LU et al., 2009).

Na Tabela 3, se encontram listados todos os parâmetros farmacocinéticos submetidos à avaliação juntamente com seus erros padrões da média e o *P* valor para verificação de relevância estatística.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração IV em ratos Wistar machos (n = 3).

Legenda:  $t_{1/2}$  – Meia vida de eliminação;  $T_{max}$  – Tempo de máxima concentração;  $C_{max}$  – Concentração

| <b>ADMINISTRAÇÃO<br/>INTRAVENOSA</b>                    | <b>RES<br/>Média <math>\pm</math> EPM</b> | <b>RES-Y-CD<br/>Média <math>\pm</math> EPM</b> | <b><i>P</i> valor</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|
| <b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>                       | 6,74 $\pm$ 3,02                           | 0,95 $\pm$ 0,27                                | 0,1797                |
| <b><math>T_{max}</math> (min)</b>                       | 8,33 $\pm$ 3,33                           | 5,0 $\pm$ 0,0                                  | 0,9350                |
| <b><math>C_{max}</math> (<math>\mu</math>g/mL)</b>      | 0,96 $\pm$ 0,48                           | 7,54 $\pm$ 1,3                                 | <b>0,0260*</b>        |
| <b>AUC<sub>all</sub> (hr*<math>\{\mu</math>g/mL)}</b>   | 1,79 $\pm$ 0,24                           | 2,51 $\pm$ 0,78                                | 0,4699                |
| <b>AUC<sub>inf</sub> (hr*<math>\{\mu</math>g/mL)}</b>   | 1,88 $\pm$ 0,61                           | 2,4 $\pm$ 0,82                                 | 0,5887                |
| <b>VZ<sub>obs</sub> (mg/<math>\{\mu</math>g/mL)/kg)</b> | 46,01 $\pm$ 8,79                          | 7,99 $\pm$ 3,43                                | 0,4848                |
| <b>CL<sub>obs</sub> (mg/<math>\{\mu</math>g/mL)/kg)</b> | 6,95 $\pm$ 2,66                           | 5,06 $\pm$ 1,31                                | 0,8182                |

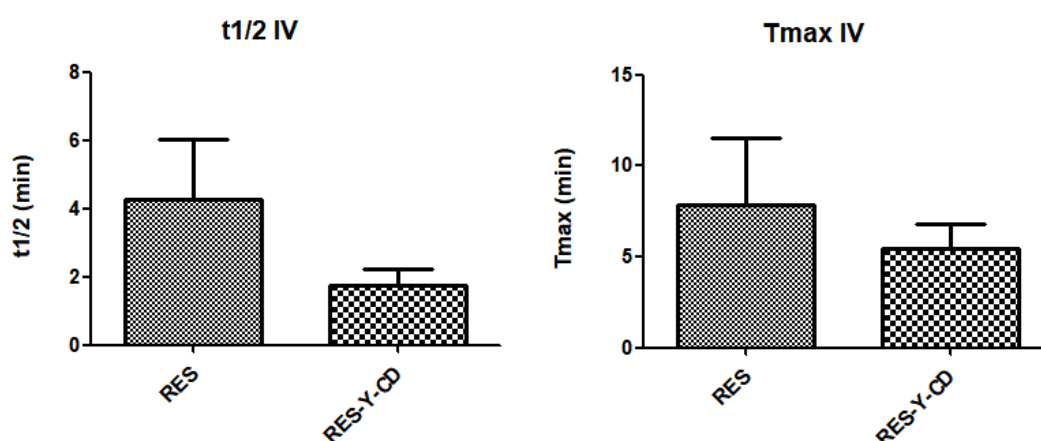
plasmática máxima obtida ( $C_{max}$ ); AUC<sub>all</sub> – Área sob a curva total; AUC<sub>inf</sub> – Área sob a curva de concentração vs tempo total; VZ<sub>obs</sub> – Volume de distribuição; CL<sub>obs</sub> – Clearance total.

Estudos farmacocinéticos têm sido realizados visando fornecer informações sobre a absorção, metabolismo e biodisponibilidade do resveratrol. São unânimes os relatos de como a forma inalterada se distribui na circulação sistêmica, resultando apenas em traços no plasma, sendo rapidamente eliminado do sangue. Após essas características e analisando os modelos farmacocinéticos disponíveis, o que melhor caracterizou as análises foi o monocompartimental, que evidencia distribuições instantâneas seguidas por uma rápida queda da concentração (BREWSTER E LOFTSSON, 2007). Por apresentar uma meia vida de eliminação no organismo muito curta ( $\pm$  8 a 14 min) e ser extensivamente metabolizado pelo organismo, a análise dos parâmetros farmacocinéticos quando potenciais soluções são propostas se tornam essenciais para verificação de resultado. Dos parâmetros farmacocinéticos básicos que caracterizam a exposição sistêmica total, destaca-se a concentração plasmática máxima obtida ( $C_{max}$ ), o tempo de meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) e a área sob a curva (AUC), auxiliando na representação

da biodisponibilidade do produto, seu volume de distribuição e a taxa de eliminação no organismo em estudo. Tais informações também auxiliam na determinação da frequência e aplicabilidade da dosagem e via de administração escolhidos (VILLANO, TRONCOSO E MOYÁ 2007; ZHONG et al., 2009). Partindo desse parâmetro e frente às análises estatísticas obtidas, podemos observar que apesar do cuidado no manejo dos animais, elaboração do conjugado e realização dos testes, os desvios padrões se mostraram muito consideráveis, motivando valores estatísticos tão variáveis. Na Figura 10 observamos que a  $t_{1/2}$  apresentou uma tendência de alteração e atribui-se tal mudança ao aumento da solubilidade proporcionado pelo complexo de inclusão, o que conseqüentemente melhora a distribuição e eliminação da substância, diminuindo o tempo dessas etapas no organismo. Seguindo a mesma argumentação, justifica-se a diminuição no tempo de máxima concentração apresentado pelo complexo.

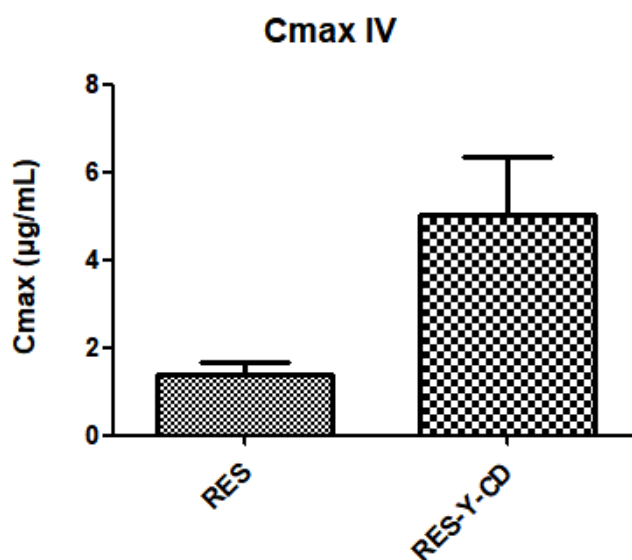
Apesar de não relevância estatística, observa-se a propensão de alteração nos tempos de meia-vidas de eliminação obtidos. Enquanto o tempo do resveratrol *in natura* corrobora com o encontrado em artigos, o complexado passa pelo mesmo processo em metade desse período. De acordo com a literatura, as ciclodextrinas melhoram a capacidade de absorção e solubilidade do fármaco hóspede. Isso se deve à presença de hidroxilas livres na parte externa das CDs conferindo às estruturadas caráter hidrofílico e possivelmente fundamentando a diferença de  $t_{1/2}$  encontrado entre as formulações (CALABRÓ, DONATO e RANERI, 2004). É interessante observar que o erro padrão da média foi menos proeminente na estrutura complexada, demonstrando a uniformidade da metodologia de complexação.

Figura 10: Análise da meia-vida de eliminação e tempo para atingir concentração na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração IV em ratos Wistar machos (n = 3).



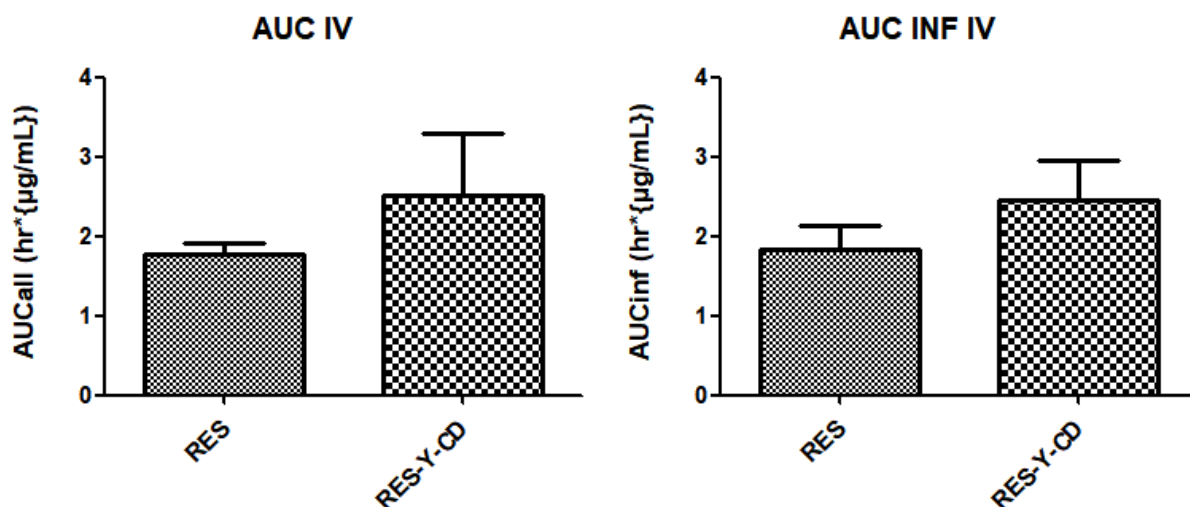
Único item com relevância estatística, a concentração máxima apresentada na Figura 11 apresentada pelo RES-Y-CD foi seis vezes maior do que o melhor resultado exibido pelo resveratrol *in natura*. A cinética de liberação confirma que o perfil farmacocinético é modificado pela presença da ciclodextrina no meio. Tal resultado se mostra positivo confirmando a capacidade que a metodologia possui de intensificar de maneira expressiva a quantidade de resveratrol disponível para aplicação e consequente atividade *in vivo*.

Figura 11: Análise da concentração máxima observada na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3).



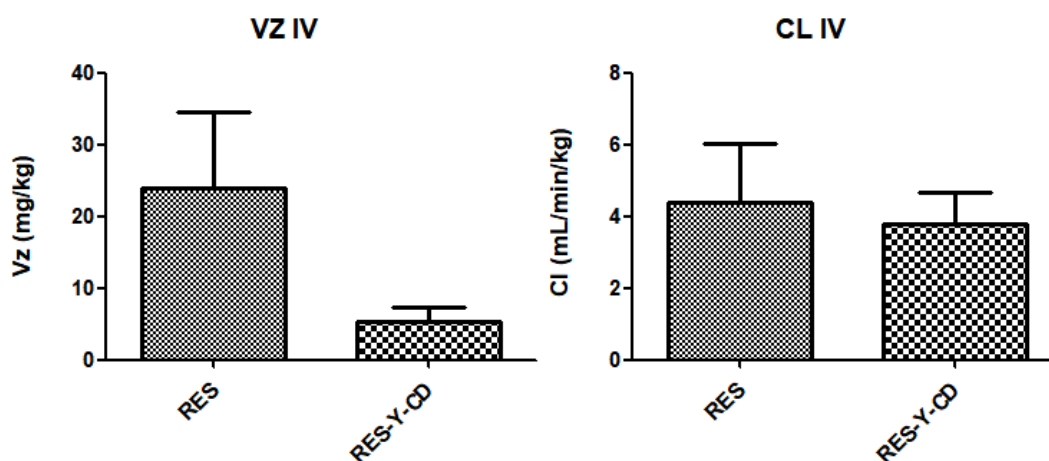
Parâmetro de grande relevância frente à atividade cinética, a área sob a curva funciona como um indicador da biodisponibilidade de um fármaco ou da quantidade total de metabólitos presentes no organismo. TOZER e ROWLAND, 2009 definem que área sob a curva nada mais é do que a concentração total do fármaco obtida a partir das concentrações médias de cada tempo avaliado. O que difere as análises observadas na Figura 12 é que a primeira (AUC) leva em consideração as concentrações obtidas somente nos pontos de coleta enquanto a segunda (AUCinf) calcula a concentração até a completa eliminação da droga. Em ambos os casos, apesar da não relevância estatística, a tendência é de melhora na biodisponibilidade do produto complexado, se apresentando em ambos os casos superior ao resveratrol. A partir das características de migração dos fármacos observa-se uma tendência em uma biodisponibilidade aumentada com a utilização do complexo, efetivando a relação entre sua dose e a intensidade de ação (RANG et al., 2012).

Figura 12: Análise das áreas sob as curvas observadas na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração i.v. em ratos Wistar machos (n = 3).



O volume de distribuição ( $V_z$ ) observado em estudo demonstrou a capacidade que o resveratrol não complexado possui de permanecer distribuído no organismo por um maior período, devido ao sua lipossolubilidade mais acentuada. Fármacos com características lipossolúveis tendem a sofrer melhor absorção enquanto os hidrossolúveis são facilmente excretados. Apesar do uso de ciclodextrina agir de maneira tão acentuada no volume de distribuição, o mesmo não ocorre ao analisarmos o clearance (CL) das amostras. Com depuração extremamente próxima em ambos os casos, o uso não ciclodextrina não apresentou potencial benefício nesse parâmetro como demonstrado na Figura 13 abaixo.

Figura 13: Análise do volume de distribuição e do *clearance* observados na via intravenosa para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração IV em ratos Wistar machos (n = 3).



Vale ressaltar que a absorção das CDs pelas membranas celulares é quase insignificante, graças à sua elevada massa molecular e à limitada absorção gastrointestinal nesses casos, não influenciando nos resultados. Existe considerável variabilidade interindividual na biodisponibilidade do resveratrol, o que pode causar respostas fisiológicas inconsistentes entre indivíduos e limitar a aplicabilidade da proposta.

### 5.6.1. VIA ORAL

Para o estudo por via oral, o volume administrado foi de 1 mL com uma dose de 60 mg/kg por animal. O resveratrol é relativamente bem absorvido através do intestino delgado, com o seu caráter não polar permitindo que a absorção ocorra por difusão, sendo transportado através do epitélio intestinal. O metabolismo do resveratrol resulta em quantidades relativamente pequenas no plasma dificultando a entrega a outros tecidos. Entretanto, quando complexado de maneira a melhorar a sua dissolução, a área de superfície para a absorção intestinal aumenta, melhorando também suas propriedades de ação que são dose-dependentes (CALABRÓ et al., 2004). Na Tabela 4, se encontram listados todos os parâmetros farmacocinéticos submetidos à avaliação juntamente com seus erros padrões da média e o *P valor* para verificação de relevância estatística.

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).

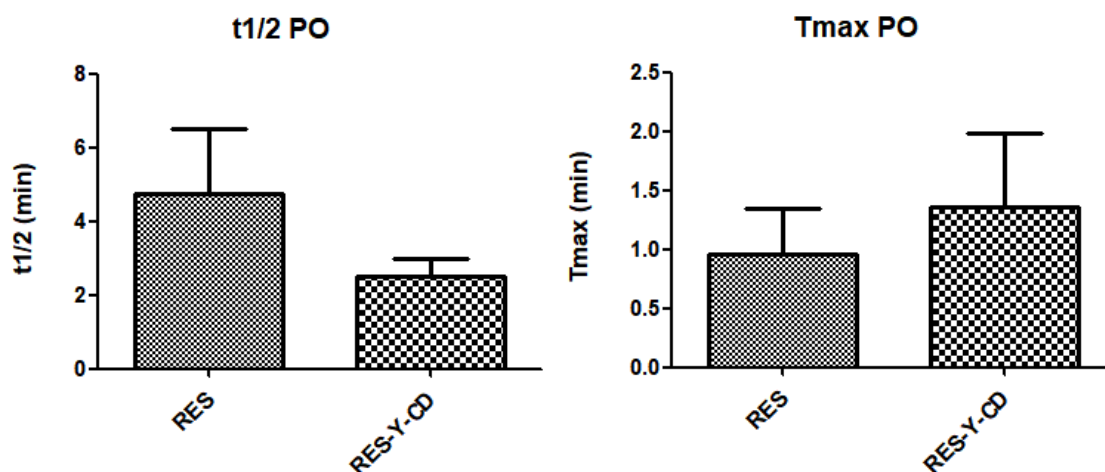
| ADMINISTRAÇÃO                                       | RES                 | RES-Y-CD           | <i>P valor</i> |
|-----------------------------------------------------|---------------------|--------------------|----------------|
| ORAL                                                | Média $\pm$ EPM     | Média $\pm$ EPM    |                |
| <b>t<sub>1/2</sub></b> (min)                        | 7,73 $\pm$ 2,49     | 2,52 $\pm$ 0,71    | 0,4848         |
| <b>T<sub>max</sub></b> (min)                        | 8,33 $\pm$ 3,33     | 13,33 $\pm$ 3,33   | 0,8068         |
| <b>C<sub>max</sub></b> ( $\mu$ g/mL)                | 5,34 $\pm$ 2,73     | 9,08 $\pm$ 7,65    | 0,9372         |
| <b>AUC<sub>all</sub></b> (hr* $\{\mu$ g/mL $\}$ )   | 1,96 $\pm$ 0,31     | 3,74 $\pm$ 2,13    | 0,4848         |
| <b>AUC<sub>inf</sub></b> (hr* $\{\mu$ g/mL $\}$ )   | 2,06 $\pm$ 0,29     | 3,57 $\pm$ 2,05    | 0,5887         |
| <b>VZ<sub>obs</sub></b> (mg/ $\{\mu$ g/mL $\}$ /kg) | 349,69 $\pm$ 127,57 | 120,99 $\pm$ 72,16 | 0,8182         |
| <b>CL<sub>obs</sub></b> (mg/ $\{\mu$ g/mL $\}$ /kg) | 30,18 $\pm$ 3,95    | 39,00 $\pm$ 23,34  | 0,9372         |

Legenda: t<sub>1/2</sub> – Meia vida de eliminação; T<sub>max</sub> – Tempo de máxima concentração; C<sub>max</sub> – Concentração plasmática máxima obtida (C<sub>max</sub>); AUC<sub>all</sub> – Área sob a curva total; AUC<sub>inf</sub> – Área sob a curva de concentração vs tempo total; VZ<sub>obs</sub> – Volume de distribuição; CL<sub>obs</sub> – Clearance total.

Observa-se que a formação dos complexos de inclusão auxilia na absorção e metabolização do resveratrol, incrementando a solubilidade, dissolução, molhabilidade e permeabilidade do fármaco. Observando a Figura 14 referente ao tempo de meia vida de eliminação das formulações propostas, podemos corroborar essa ação. O  $t_{1/2}$  médio do produto complexado foi um terço menor que o do resveratrol *in natura* e esse acentuado decaimento é justificado pela complexação à  $\gamma$ -CD e o caráter hidrofílico à ele conferido. Isso se deve à presença de hidroxilas livres na parte externa das CDs (RANG et al., 2012). O tempo de máxima concentração está diretamente relacionado à absorção, metabolismo, ligação às proteínas plasmáticas e, no caso de administrado por via oral, ao efeito de primeira passagem. Podemos observar uma propensão ao aumento desse parâmetro no complexo, mesmo que a ligação às proteínas e o metabolismo ocorra de maneira mais intensa, o tempo necessário para se alcançar o ápice dessa referência acaba sendo maior.

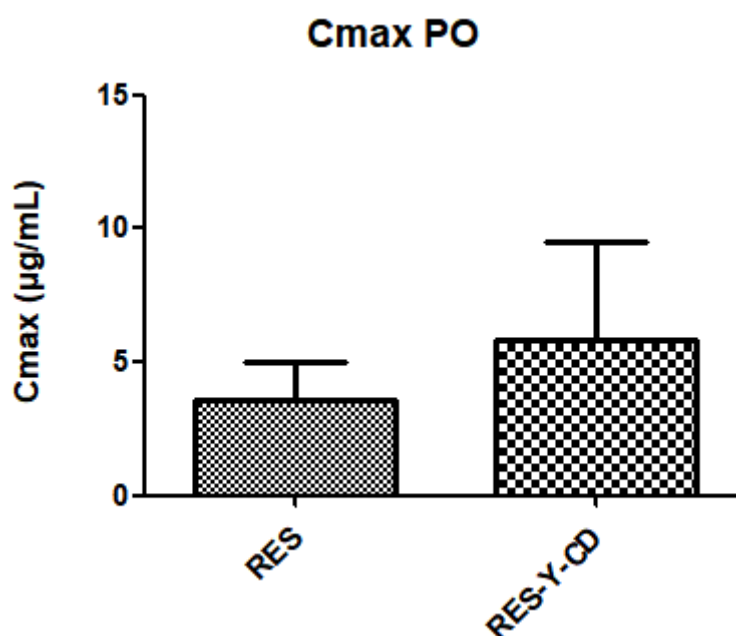
Esse aspecto provavelmente ocorre pela proteção conferida pela ciclodextrina ao resveratrol, bloqueando a ação do efeito de primeira passagem e retardando o processo. Apesar da busca em melhorar esses parâmetros através da complexação com a ciclodextrina e de burlar a intensidade dos efeitos negativos dessas etapas, observa-se que os resultados apresentados tanto do produto natural quanto do complexado não demonstraram diferença significativa, compatíveis aos relatados em outros estudos.

Figura 14: Análise da meia-vida de eliminação e tempo para atingir concentração máxima para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).



Diferentemente do que foi observada na via intravenosa, a Figura 15 demonstra que a concentração máxima obtida pela via oral não só não apresentou diferença estatística como também a probabilidade de significância mais alta de todo o trabalho. Mesmo que as propriedades das ciclodextrinas anteriormente mencionadas têm demonstrado eficiência como formas farmacêuticas de entrega específica, elas foram incapazes de evitar o efeito de primeira passagem, tendo sua concentração significativamente reduzida e até mesmo inativada pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica em concentração terapêutica aceitável.

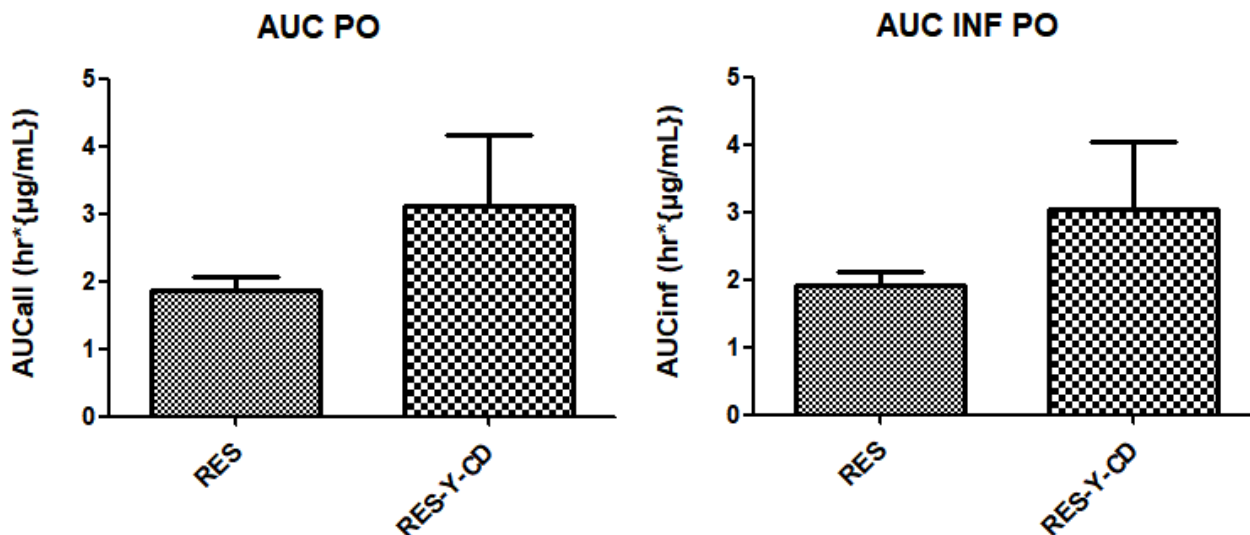
Figura 15: Análise da concentração máxima para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).



De todos os critérios analisados, os que mais apresentaram similaridade nos resultados obtidos foram os das áreas sob a curva. Nota-se na Figura 16 que em ambos os casos, o RES- $\gamma$ -CD foi superior ao resveratrol não modificado. Ainda que a relevância estatística não tenha sido observada, é perceptível como a complexação do resveratrol à ciclodextrina exacerbou a taxa e a extensão do princípio ativo na circulação, demonstrando que, a pesar de ainda ser necessário aperfeiçoamentos, a metodologia oferece benefícios.

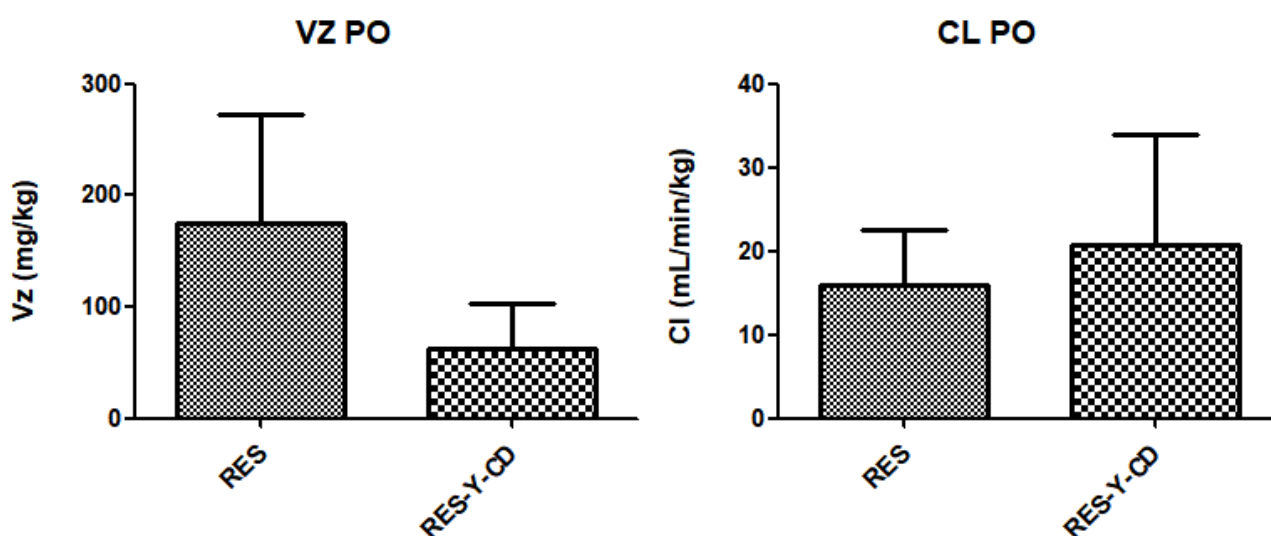
Vale ressaltar mais uma vez que devido ao pequeno número de amostras e a grande variabilidade inerente aos indivíduos, os erros apresentados foram significativos. Acredita-se que se a amostragem fosse maior e a variabilidade fisiológica dos indivíduos fosse atenuada, os resultados se mostrariam mais positivos e estatisticamente relevantes.

Figura 16: Análise das áreas sob as curvas para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3).



Observamos na Figura 17 que o volume de distribuição tem padrão semelhante ao da via oral. Entretanto, diferentemente do que ocorreu na primeira administração, o clearance observado foi maior nessa via. Acredita-se que a hidrossolubilidade melhorada pelo uso da ciclodextrina tenha surtido efeito como esperado, facilitando a excreção do fármaco. Ainda assim, tal mudança não foi o suficiente para verificação de melhora estatística.

Figura 17: Análise do volume de distribuição e do clearance para o resveratrol (RES) e o resveratrol complexado com ciclodextrina (RES- $\gamma$ -CD), obtidos após administração p.o. em ratos Wistar machos (n = 3)..



### 5.6.2. BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA E RELATIVA

Em consonância aos resultados já observados, encontramos as seguintes biodisponibilidades absolutas para o resveratrol:

$$\frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \times \frac{DOSE_{IV}}{DOSE_{PO}} \rightarrow \frac{2,06}{1,88} \times \frac{10}{60} = 0,183 \text{ ou } 18,3\%$$

E para o resveratrol complexado:

$$\frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \times \frac{DOSE_{IV}}{DOSE_{PO}} \rightarrow \frac{3,57}{2,4} \times \frac{10}{60} = 0,248 \text{ ou } 24,8\%$$

A Resolução ANVISA nº 898, de 29 de Maio de 2003 (Brasil, 2003) estabelece que aumentos superiores a 20% da média de referência asseguram dados estatisticamente importantes. Observa-se que o aumento proporcional entre as duas formulações foi de 35,52%, demonstrando forte indício de como a presença de ciclodextrina aprimora o comportamento do resveratrol.

Para a biodisponibilidade relativa, temos:

$$\frac{AUC_{RES-\gamma-CD}}{AUC_{RES}} \times 100\% \rightarrow \frac{3,57}{2,06} \times 100 = 173\%$$

Partindo da mesma resolução, a equidade estatística ocorre quando este intervalo de confiança está compreendido entre 80 e 125%. Como o valor obtido foi de 173%, sugere-se que o uso do excipiente não só protegeu como beneficiou a dissolução do resveratrol no meio, intensificando seu alcance e ação através da formulação.

Mesmo não apresentando uma diferença estatística entre os grupos de administração oral (Figura 16), observa-se uma tendência clara de melhora na biodisponibilidade do complexo na formulação. Essa propensão fica evidente observando-se a razão das duas áreas sob a curva, como descrito acima. A alta variabilidade observada nos resultados pode ser explicada pela utilização de um número reduzido de

animais, realizado por motivos éticos. Essa alta variabilidade pode ter influenciado diretamente o teste estatístico aplicado (Mann-Whitney), resultando na não observância de diferenças estatísticas.

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação completa de um método bioanalítico simples, sensível e custo-eficiente utilizando HPLC para a determinação de resveratrol em plasma de ratos, de maneira seletiva, exata e precisa. Após a análise dos resultados finais obtidos, acredita-se que ocorreu um aperfeiçoamento na utilização do resveratrol, possibilitando novos possíveis usos, melhorando a solubilidade e disponibilidade do produto final.

Os valores de F% e FR% do resveratrol foram bastante superiores para formulação RES- $\gamma$ -CD, demonstrando melhor biodisponibilidade absoluta e relativa do que o resveratrol dissolvido em DMSO. Conclui-se que a incorporação do resveratrol em hidróxi- $\gamma$ -ciclodextrina é promissora para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol, podendo melhorar a sua eficácia.

Entretanto, o questionamento que fica é: aumentando-se o número de animais testados, seria possível verificar uma relevância estatística significativa nos demais parâmetros farmacocinéticos? Para um produto com baixa biodisponibilidade como é o caso do resveratrol, o quão significativo é a melhora observada? Isso viabilizaria o seu uso em larga escala? O volume de dados obtidos nesta pesquisa não responde a tais indagações, mas servem de fomento para novos estudos e possibilidades.

## 7. REFERÊNCIAS

---

- ALI, Kashif. **Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products.** Phytochemistry Reviews. 9<sup>o</sup> edição. 2010.
- AMORIM, Vivian. Marta Schmidt Lima; Marilisa Berti de Azevedo Barros; Chester Luiz Galvão César. **Fatores associados à não realização do exame de Papanicolaou: um estudo de base populacional no município de Campinas.** São Paulo, Brasil. Caderno de Saúde Pública. v. 22. Nov. 2006.
- ARANGO, Michael, Ponchel, Renedo; Duchêne D., Irache, J. **Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems.** European Journal Pharmacy Science. 11<sup>o</sup> edição. 2000.
- BASTOS, Deborah; Marcelo M. Rogero; José Alfredo G. Arêas. **Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade.** Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública. Dissertação. 2009.
- BAUR-SINCLAIR. **Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.** Nature Reviews Drug Discovery. 5<sup>a</sup> Ed. 2006.
- BELLÓ, A. **Estresse oxidativo e antioxidantes.** Porto Alegre: Editora Ulbra, 2002 p.49-61.
- BERTACCHE, Vittorio; Natascia Lorenzi, Donatella Nava, Elena Pini, Chiara Sinico. **Host-Guest Interaction Study of Resveratrol With Natural and Modified Cyclodextrins.** Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry. v.55. 2006.
- BRASIL, 2012. Conselho Nacional de Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Brasília: Diário Oficial da União, 2012.
- BREWSTER AND LOFTSSON. **Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers.** Advanced Drug Delivery Reviews. v. 59. 2007.
- BOROUJERDI, Michael. **Pharmacokinetics principles and applications.** Mc Graw-Hill, 2002.
- BROWNSON, D.M.; Nicolas, G.A.; Fuqua, B. K.; Dharmawardhane, Su, F.; Mabry, T. J. **Flavonoid effects relevant to cancer.** Journal Nutrition. v. 132. 2002.
- CALABRÒ. Tommasini, Pedro Donato, Daniel Raneri. **Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 35. 2004.
- CERQUEIRA, Fernanda Menezes; Marisa Helena Gennari de Medeiros e Ohara Augusto. **Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias E Perspectivas.** Química Nova. v. 30. 2007.
- COIMBRA, Maria; Benedetta Isacchi, Louisvan Bloois, Javier Sastre Torano, AldoKet Xiaojie Wu, Femke Broere, Josbert M.Metselaar, Cristianne J.F.Rijcken, GertStorm, Rita Bilia, Raymond M.Schiffelers. **Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes.** International Journal of Pharmaceutics. v.416. 2011.

- COUNET, Christine; Delphine Callemien and Sonia Collin. **Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid.** Food Chemistry. v.98. 2006.
- CZAPLICKI, Sulwester. **Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds.** INTECH. 2014.
- DJOKO, Bambang; Robin Yan, Jia-Jen Shee Chiou and Yi-Wen Liu. **Characterization of Immunological Activities of Peanut Stilbenoids, Arachidin-1, Piceatannol, and Resveratrol on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation of RAW 264.7 Macrophages.** Journal of agricultural and food chemistry. v.55. 2007.
- DORNAS, Willian; Oliveira, Tincler; Rodrigues-Das-Dores, Raphael. **Flavonoides: Potencial Terapêutico No Estresse Oxidativo.** Revista De Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada, v.28. Jun. 2009.
- DRUNKLER Deisy Alessandra, Roseane Fett, Marilde T. Bordignon Luiz. **Polímeros De Ciclodextrina: Características, Formação De Complexos De Inclusão E Aplicações Industriais.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. v. 17. 2009.
- FARMACOPÉIA EUROPEIA, 9<sup>o</sup> Edição. 2017.
- FREMONT, Lucie. **Biological effects of resveratrol.** Life Sciences, v.66. 2000
- GAMBINI Juan, Marta Inglés, Gustav Olaso, Raul Lopez-Gruoso. **Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v.2015. 2015.
- GBD ALCOHOL COLLABORATORS, **Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016.** Lancet. v.392. 2018.
- GONCALVES Daniel. **Development of a liquid chromatography assay for the determination of opicapone and BIA 9–1079 in rat matrices.** Biomedical Chromatography. 16<sup>a</sup> Ed. 2016.
- GUEDES Francimary de Lima, Geisiane Maria Cavalcante Alves, Fabiana Lícia Araújo dos Santos, Larissa Fantini de Lima, Larissa Araújo Rolim, Pedro José Rolim Neto. **Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos.** Tecnologia Farmacêutica. v140. 2008.
- KIM David, Jung YJ, Lee Jhefrey, Lee Kang and Lee Sebastian. **SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53.** American Journal of Physiology-Renal Physiology. v.48. 2011.
- LAMATTINA, Jordan; Golan, David. **Farmacocinética. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2<sup>o</sup>Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- LANNON, Inês. **Pharmacokinetics.** Biochemical Pharmacology. v.87. 2014. Transactions. v.35. 2007.
- LASTRA, Catalina Alarcón de la and Isabel Villegas. **Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications.** Biochemical Society
- LEAL, Juliane Barroso; Ferdinando Oliveira Carvalho; Daniela Caetano Gonçalves; Juçara Barroso Leal; Gabriela Chamusca Lopes Da Silva; Luiz Carlos Carnevali Júnior; Ana Lúcia Hoefel. **Resveratrol: composição química e benefícios à saúde.** Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento. v.11. 2017.

- LEWANDOWSKA, Urszula; Karolina Szewczyk, Elżbieta Hrabec, Anna Janecka, and Sylwia Gorlach **Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols**. American Chemical Society. v.61. 2013.
- LIANG, Yuejin; Zuliang Jie, Lifei Hou, Renan Aguilar-Valenzuela, David Vu, Lynn Soong and Jiaren Sun IL-33 Induces Nuocytes and Modulates Liver Injury in Viral Hepatitis. The Journal of Immunology. V190. 2013.
- LIU, Peng; Liang, Hang Xia, Qiang Kong, **Resveratrol Induces Apoptosis Of Pancreatic Cancers Cells By Inhibiting Mir-21 Regulation Of Bcl-2 Expression**. Clinical And Translational Oncology. v.15. 2013
- LUCERI, Cristina; Giovanna Caderni; Anna Sanna; Piero Dolaro. **Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors**. Journal Nutrition, v. 132. 2002.
- LYONS, Mark. **Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries**. Journal of Agricultural Food Chemistry. v. 51. 2003.
- MACEDO, Gabriela; Vania Battestin; Luis Matsuda. **Fontes e aplicações de taninos e tanases nos alimentos**. Alimentos e Nutrição. v.15. 2016.
- MALDANER, Liane, Carol Collins e Isabel Jardim. **Modern stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography**. Química Nova. V. 33. 2010.
- MARTINS, Pâmela. **Polifenóis no vinho: resveratrol e seus benefícios**. Infarma, Ciências Farmacêuticas. v28. 2016.
- MENDES, Jessica Bitencourt Emilio. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol**. Universidade Estadual De Ponta Grossa. 2011.
- NIEHS. **Niehs Handbook for investigators and technicians of National Institute of Environmental Health Scienses**. 2011. Disponível em <<https://www.niehs.nih.gov/>>. Acesso em Março 2019.
- NEMEN, Daiane and Elenara Senna. **Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea**. Química Nova. 34<sup>a</sup> Ed. 2010.
- OLIVEIRA, Rita. **Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica**. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. v.70. 2009.
- PAIXÃO, Francijane Ferreira. **Avaliação da genotoxicidade do capsiate (Capsicumannuum) e resveratrol suplementados em ratos wistar através do teste de micronúcleo**. Dissertação. Faculdade Unoeste. 2014.
- PAULO, Luísa Alexandra Serrano. **Determinação dos Teores de Resveratrol em Vinhos Tintos com Denominação de Origem Controlada Beira Interior e Avaliação das suas Propriedades Antimicrobianas**. Dissertação. Faculdade da Beira Interior. 2011.
- PRATA, Mariana Nathuê Lobo. **Ação anti-inflamatória do resveratrol na melhora das complicações crônicas causadas pelo Diabetes Mellitus**. Dissertação. UFMG. 2015
- PROVIDÊNCIA, Rui; **Proteção Cardiovascular por Bebidas Alcoólicas: Bases Científicas do Paradoxo Francês**. Revista Portuguesa de Cardiologia. nº 25. 2006.
- RAMIREZ, Maria Rosana. **Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (mirtilo e amora-preta)**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

- RANG, Humphrey Peter, DALE, M.M., James M. Ritter, James M. Ritter, Rod J. Flower, Graeme Henderson **Farmacologia**. 7ª Ed. Rio De Janeiro: Elsevier, 2012.
- RAUF, Abdur; Muhammad Imran, Masood Sadiq Butt, Muhammad Nadeem, Dennis G. Peters & Mohammad S. Mubarak. **Resveratrol as an anticancer agent: a review**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v.258. 2016.
- RAWAT, Swat; JAIN, Sanjay. **Solubility enhancement of celecoxib using  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 57. 2004.
- RDC nº 27, de 17 de Maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)>. Acesso em: 10 de Abril de 2019.
- RDC nº 898, de 29 de Maio de 2003. **Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência**. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_898\\_2003\\_.pdf/ec99f246-b668-497d-b1ff-822529d9a348](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_898_2003_.pdf/ec99f246-b668-497d-b1ff-822529d9a348)>. Acesso em: 14 de Abril de 2019.
- REGE, Shraddha; Thangiah Geetha, Gerald Griffin and Tom Broderick. **Neuroprotective effects of Resveratrol in Alzheimer Disease Pathology**. *Frontiers in Aging Neuroscience*. Ed. 218. 2014.
- RIFICI, Vicent; Schneider, Stephen; Khachadurian, Avedis. **Lipoprotein oxidation mediated by J774 murine macrophages is inhibited by individual red wine**. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. v. 22, 2002.
- SADOVOY, Vladimir; Arcadiy Silantsev, Magomed Selimov, Tatiana Shchedrina **An examination of chemical composition and molecular properties of grape berry skin flavonoids**, *Food Nutrition. Science*. 2ª Ed. 2011.
- SALIPIRA, K. L.; Mamba, B. B. Krause, R. W.; Malefetse, T. J.; Durbach, S. H. **Carbon Nanotubes And Cyclodextrin Polymers For Removing Organic Pollutants From Water**. *Environmental Earth Sciences*. v. 5, 2006.
- SALTÃO Rui and VEIGA, Francisco. **Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 37. 2001.
- SANTOS, Fernanda. **New delivery systems to improve the bioavailability of resveratrol**. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8ª Ed. 2011.
- SARUBBO, Fabian; Esteban Sanchez; Aida Miralles, David Moranta. **Effects of resveratrol and polyphenols on sirt1: relevance to brain function during**. *Current Neuropharmacology*. v. 15. 2017.
- SAUTTER, Cláudia; Sandra DENARDIN, Audrei O. ALVES, Carlos A. MALLMANN, Neidi G. PENNA, Luisa H. HECKTHEUER. **Determinação De Resveratrol Em Sucos De Uva No Brasil**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 25. 2005.
- SEFORA-SOUSA, Maria and De Angelis-Pereira. **Mecanismos Moleculares De Ação Anti-Inflamatória E Antioxidante De Polifenóis De Uvas E Vinho Tinto Na Aterosclerose**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.15. 2013.
- SEGUIN, Johanne; Laura Brullé, Renaud Boyer, Yen Mei, Lu Miriam, Ramos Romano, Yasmine S.Touil, Daniel Scherman, Michel Bessodes, Nathalie Mignet, Guy G.Chabot.

- Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy.** *International Journal of Pharmaceutics*. v.444. 2013.
- SOO, Ernest; Sachin Thakur, Zhi Qu; Siddharth Jambhrunkar. **Enhancing delivery and cytotoxicity of resveratrol through a dual nanoencapsulation approach.** *Journal of Colloid and Interface Science*. v.60. 2015.
- SOUZA, Sabrina Ambrósio De Lima; Rodolfo Êlleson Dos Santos Arruda, Ticiano Gomes Do Nascimento. **Estudos De Caracterização De Microencapsulados De Resveratrol.** *Dissertação. Universidade Federal de Alagoas*. 2017.
- SUVARNA, Vasanti; GUJAR, Parul; MURAHARI, Manikanta. **Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 8. 2017.
- TOKUŞOĞLU, Özlem; Mustafa Kemal, Ünal Akhisar and Fadim Yemiş. **Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS).** *Celal Bayar University, Manisa, Turkey and Departments of Food Engineering and Chemistry, Ege University*. 2005.
- TOZER, Tomaz and ROWLAND, Malcom. **Introdução à farmacocinética e farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica.** 1ª Ed. 2009.
- UDENIGWE Chibuike; Vanu Ramprasath Rotimi and Aluko Peter Jones. **Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy.** *Nutrition Reviews*. v. 66. 2008.
- VALLIANOU, Natalia G., Angelos Evangelopoulos and Christos Kazazis. **Resveratrol and Diabetes.** *The review of diabetic studies*. 10ª Ed. 2013.
- VANAJA Satheesh, Wahl Martin and Ljiljana Bukarica. **Liposomes as carriers of the lipid soluble antioxidant resveratrol: evaluation of amelioration of oxidative stress by additional antioxidant vitamin.** *Life Science*. v.93. 2013.
- VILLANO Debra; Troncoso, Ana; Moyá, Maria Luisa. **Radical scavenging ability of polyphenolic compound towards DPPH free radical.** *Talanta*, 71ª Ed. 2007.
- WANG, Laid; Tuz Yang, Moi Zhu, Lian Zhang, Louis Yan. **Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review.** *Pharmazie*. v.70. 2015.
- WENZEL, Omoza; **Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol.** *Molecular Nutrition Food Research*. v. 49. 2015.
- ZHONG, Lu; Bo Cheng, Yeli Hu, Youhong Zhang, Guolin Zou. **Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity.** *Food Chemistry*. v113. 2009.
- ZIKA Cvetkovic; Vesna D. Nikolic; Ivan M. Savic; Ivana M. Savic-Gajic; Ljubisa B. Nikolic. **Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of trans-resveratrol in the plant extracts.** *Hemijaska Industrija*. 69ª Ed. 2015.