UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCELLA MELO ASSIS COSTA

# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FOTOPROTETORA DO RESVERATROL EM NANOEMULSÕES CONTENDO VITAMINA A

Recife
2018

MARCELLA MELO ASSIS COSTA

# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FOTOPROTETORA DO RESVERATROL EM NANOEMULSÕES CONTENDO VITAMINA A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientadora: Profª Drª Beate Saegesser Santos.
Co-orientador: Prof. Dr. Clayton Anderson de Azevedo Filho.

Recife
2018

Catalogação na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

C837a Costa, Marcella Melo Assis.
Avaliação da capacidade fotoprotetora do resveratrol em nanoemulsões contendo vitamina A / Marcella Melo Assis Costa. – Recife: o autor, 2018.
100 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Beate Saegesser Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências.

1. Vitamina A. 2. Nutrição parenteral. 3. Cromatografia. I. Santos, Beate Saegesser (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 254)

MARCELLA MELO ASSIS COSTA

# AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FOTOPROTETORA DO RESVERATROL EM NANOEMULSÕES CONTENDO VITAMINA A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Aprovada em: 31 de julho de 2018.**

**BANCA EXAMINADORA**

_____
Prof.ª Drª Beate Saegesser Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Drª Emmanuela Prado de Paiva Azevedo (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____
Prof.ª Drª Christine Maria Carneiro Maranhão Ribeiro (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Valter e Socorro, e à minha irmã, Isabella, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, me apoiando, incentivando e torcendo meu pelo sucesso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me possibilitado estar firme durante toda essa trajetória;

À minha orientadora e ao meu co-orientador, que não mediram esforços para me ajudar a desenvolver este trabalho;

À Central Analítica, por ter fornecido equipamentos necessários para obtenção de resultados deste trabalho;

À minha família, que me auxiliou em tudo o que foi preciso para que eu mantivesse o foco na minha formação e não desistisse dos meus ideais;

Ao meu namorado, Thiago, que me deu apoio em toda esta trajetória;

À minha grande amiga Priscilla Cruz, que apesar da distância se faz sempre presente, me encorajando na luta pelos meus objetivos;

Aos meus amigos de infância, Rinaldson, Daniele, Jéssica, Everthon, Layla e Júlia, pela amizade e companheirismo;

Aos meus amigos e colegas de profissão, Poline, Amanda, Rafaela, Irla, Matheus e Pedro, por me acompanharem nessa trajetória;

Aos meus grandes amigos Larissa, Yuri, Juliana e Priscilla, que estão sempre ao meu lado me proporcionando momentos de alegria.

## RESUMO

Formulações de Nutrição Parenteral (NP) consistem em misturas nutritivas que são infundidas através das veias de pacientes. A incidência da luz nas preparações de NP pode induzir a oxidação e degradação de alguns de seus componentes, incluindo as vitaminas. Há diversos estudos que relatam a foto-sensibilidade de vitaminas, principalmente da vitamina A, que desempenha um importante papel na visão, crescimento e manutenção dos tecidos, e no sistema imunológico. Ainda assim, são poucos os estudos sistemáticos da ação da luz (visível e/ou ultravioleta) sobre a degradação e oxidação desta neste tipo de formulação. Diante da importância da NP no âmbito terapêutico, faz-se necessária a inclusão de novos agentes antioxidantes e fotoprotetores que possam garantir a estabilidade dos componentes da preparação, bem como a segurança dos pacientes que fazem uso desta. O presente estudo teve como objetivo avaliar o resveratrol como uma nova alternativa de agente fotoprotetor em nanoemulsões contendo vitamina A submetidas à fotodegradação por luz ultravioleta/visível. Estas nanoemulsões foram desenvolvidas para serem futuramente incorporadas em formulações destinadas à NP. A técnica utilizada neste estudo foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que, com o desenvolvimento da metodologia de extração adequada, forneceu resultados precisos, confiáveis e reprodutíveis na análise de vitamina A. A metodologia que permitiu a melhor execução e resultados precisos foi a seguinte: um mililitro de emulsão foi transferido para um tubo de centrifugação onde adicionou-se 4 mL de água ultrapura e 2 mL de solução de extração (hexano-acetato de etila 80:20 v/v). A mistura foi submetida à agitação no vórtex durante 30 s e centrifugada a 7000 rpm durante 60 min. A camada superior foi transferida para um tubo de vidro, evaporada em capela de exaustão, reconstituída com metanol e filtrada em filtro de Teflon 0,20 µm. Uma alíquota de 20 µL da solução foi injetada no cromatógrafo líquido. Sob condições de um modelo reduzido de plano de estudo de fotoestabilidade, os resultados evidenciaram que após a simulação de 10 horas de incidência de radiação UV e visível houve degradação de mais de 90% de vitamina A. O resveratrol foi capaz de suprimir parte da taxa fotodegradativa desta vitamina, em torno de 4% para radiação UV e 7% para luz visível, mostrando-se um candidato potencial para uso em preparações para Nutrição Parenteral.



**Palavras-chave:** Vitamina A. Nutrição Parenteral. Cromatografia.

## ABSTRACT

Parenteral Nutrition formulations (PN) are nutritive mixtures that are infused through the veins of patients. The incidence of light in PN preparations can induce the oxidation and degradation of some of its components, including vitamins. There are several studies that report the photo-sensitivity of vitamins, especially vitamin A, which plays an important role in vision, growth and maintenance of tissues, and in the immune system. Even so, there are few systematic studies of the action of light (visible and/or ultraviolet) on its degradation and oxidation in this type of formulation. Given the importance of PN in the therapeutic scope, it is necessary to include new antioxidant and photoprotective agents that can ensure the stability of the components of the preparation, as well as the safety of the patients who use it. The present study aimed to evaluate resveratrol as a new alternative photoprotective agent in nanoemulsions containing vitamin A submitted to photo-degradation by ultraviolet/visible light. These nanoemulsions have been developed to be incorporated in PN formulations in the future. The technique used in this study was High Performance Liquid Chromatography (HPLC), which, with the development of the appropriate extraction methodology, provided accurate, reliable and reproducible results in vitamin A analysis. The methodology that allowed the best execution and accurate results is described as follows: one milliliter of emulsion was transferred to a centrifuge tube where 4 mL of ultrapure water and 2 mL of extraction solution (80:20 hexane-ethyl acetate v / v) were added. The mixture was vortexed for 30 s and centrifuged at 7000 rpm for 60 min. The upper layer was transferred to a glass tube, evaporated in an exhaust hood, reconstituted with methanol and filtered on a 0.20 µm Teflon filter. An aliquot of 20 µL of the solution was injected into the liquid chromatograph. Under conditions of a reduced model of photostability study plan, the results showed that after the simulation of 10 hours of UV and visible radiation there was degradation of more than 90% of vitamin A. Resveratrol was able to suppress part of the photo-degradation rate of this vitamin, around 4% for UV radiation and 7% for visible light, proving to be a potential candidate for use in preparations for Parenteral Nutrition.



**Keywords:** Vitamin A. Parenteral Nutrition. Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES


Figura 1 – Comparação visual entre uma emulsão estável e uma emulsão desestabilizada com formação de *creaming* (a) e emulsão desestabilizada por coalescência (b). 29

Figura 2 – Estrutura química das formas de vitamina A. 31

Figura 3 – Produtos de fotodegradação do palmitato de retinila irradiado por UV. 32

Figura 4 – Estrutura química do resveratrol, que ocorre na forma de dois isômeros: (A) *trans*-3,5,4'trihydroxystilbene, e (B) *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene. 36

Figura 5 – Gráficos de distribuição de energia espectral da luz solar e de fontes de luz artificial comumente usadas em iluminação interna. 43

Figura 6 – Localização de uma incubadora próxima à janela na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da UFPE. 44

Figura 7 – Exposição das emulsões de vitamina A na câmara de fotoestabilidade. 55

Figura 8 – Espectros de RMN dos padrões primários e secundários do resveratrol. 57

Figura 9 – Espectros de RMN dos padrões primários e secundários do palmitato de retinila. 58

Figura 10 – Correlação do espectro de $^{1}$H RMN do *trans*-resveratrol, utilizado no presente estudo, com a estrutura da molécula. 59

Figura 11 – Correlação do espectro de $^{1}$H RMN do palmitato de retinol, utilizado no presente estudo, com a estrutura da molécula. 60

Figura 12 – Espectros de absorção eletrônica dos padrões primários do palmitato de retinila (a) e resveratrol (b). 61

Figura 13 – Perfil cromatográfico do resveratrol padrão primário (Sigma®) e padrão secundário. 63

Figura 14 – Perfil cromatográfico do palmitato de retinila padrão primário (Sigma®) e padrão secundário. 63

Figura 15 – Espectros de absorção eletrônica representativo das emulsões preparadas neste estudo; (a) espectro normalizado de emulsão de vitamina A (palmitato de retinila), emulsão de RSV e emulsão contendo ambos ativos; (b) emulsão contendo duas proporções de Vit A preparadas com RSV. 64
Figura 16 – Distribuição dos tamanhos das gotículas da emulsão de vitamina A sem resveratrol obtidas através da técnica DLS. 65
Figura 17 – Distribuição dos tamanhos das gotículas da emulsão de vitamina A com resveratrol em relação à intensidade obtidas através da técnica DLS. 66
Figura 18 – Curva de calibração e regressão linear obtida neste estudo para a vitamina A. 67
Figura 19 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostra com e sem a adição de padrão. 71
Figura 20 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostras com e sem resveratrol expostas à radiação UV. 73
Figura 21 – Porcentagem de decaimento da concentração da vitamina A com relação ao seu respectivo controle em função do tempo de exposição à radiação UV (300 – 400 nm). 75
Figura 22 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostras com e sem resveratrol expostas à luz visível. 77
Figura 23 – Porcentagem de decaimento da concentração da vitamina A com relação ao seu respectivo controle em função do tempo de exposição à luz visível (400 – 700 nm). 79
Figura 24 – Mapa de intensidade tridimensional da iluminância UV para a lâmpada BF monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade. 80

## LISTA DE TABELAS


Tabela 1 – Recomendações atuais de vitaminas para administração parenteral e enteral em recém-nascidos pré-termo e neonatos. 25

Tabela 2 – Produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados. 46

Tabela 3 – Componentes utilizados na preparação da emulsão de vitamina A sem resveratrol para o experimento de fotodegradação e suas respectivas quantidades. 47

Tabela 4 – Componentes utilizados na preparação da emulsão de vitamina A com resveratrol para o experimento de fotodegradação e suas respectivas quantidades. 47

Tabela 5 – Equipamentos utilizados nas análises das preparações estudadas. 48

Tabela 6 – Parâmetros da regressão linear obtidos da curva de calibração da vitamina A. 67

Tabela 7 – Valores de quantificação das amostras de emulsão de vitamina A sem e com resveratrol (em $\mu g.mL^{-1}$). 68

Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos do palmitato de retinila. 68

Tabela 9 – Robustez do método cromatográfico. 69

Tabela 10 – Taxa de recuperação. 70

Tabela 11 – Análise dos picos referentes à vitamina A extraída das amostras submetidas à radiação UV. 74

Tabela 12 – Análise dos picos referentes à vitamina A extraída das amostras submetidas à luz visível. 78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AOAC | *Association of Official Analytical Chemists* |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASPEN | *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* |
| BHA | Hidroxianisol butilado |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| CA | Concentração adicionada |
| CAm | Concentração da amostra |
| CE | Concentração encontrada |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DEHP | Dietilhexil ftalato |
| DPa | Desvio Padrão |
| EVA | Acetato de etilvinila |
| FDA | *Food and Drug Administration* |
| ICH | *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| NP | Nutrição Parenteral |
| NPT | Nutrição Parenteral Total |
| PDA | *Photodiode array* (Detector de Arranjos de Diôdos) |
| PG | Propil galato |
| PVC | Cloreto de polivinila |
| PR | Palmitato de Retinila |
| PS 80 | Polissorbato 80 |
| RE | Resolução (ANVISA) |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNPT | Recém-nascido pré-termo |
| RSV | Resveratrol |
| TBHQ | Terc-butilhidroquinona |
| TCL | Triglicerídeos de cadeia longa |

| | |
|---|---|
| TCM | Triglicerídeos de cadeia média |
| Tf | *Tailing factor* (Fator de assimetria) |
| TNP | Terapia de Nutrição Parenteral |
| TR | Taxa de Recuperação |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |
| UV | Ultravioleta |
| Vis | Visível |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| ºC | Graus Celsius |
| λ | Comprimento de onda |
| cm | Centímetro |
| dL | Decilitro |
| g | Grama |
| h | Hora |
| kcal | Quilocaloria |
| kg | Quilograma |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mmol | Milimolar |
| mOsm | Miliosmol |
| µg | Micrograma |
| µm | Micrômetro |
| nº | Número |
| nm | Nanômetro |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ζ | Potencial Zeta |
| pKa | Constante de acidez |
| $r^2$ | Coeficiente de determinação |
| v/v | Concentração volume/volume |

**SUMÁRIO**


1 **INTRODUÇÃO**..... 16
2 **OBJETIVOS**..... 18
2.1 OBJETIVO GERAL..... 18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 18
3 **REVISÃO DA LITERATURA**..... 19
3.1 DEFINIÇÃO DE NUTRIÇÃO PARENTERAL..... 19
3.2 CLASSIFICAÇÃO DA NUTRIÇÃO PARENTERAL..... 20
3.3 INDICAÇÕES DA NUTRIÇÃO PARENTERAL..... 20
3.4 CONSTITUINTES DA NUTRIÇÃO PARENTERAL..... 21
3.4.1 **Carboidratos**..... 21
3.4.2 **Lipídeos**..... 22
3.4.3 **Proteínas**..... 23
3.4.4 **Vitaminas**..... 23
3.4.5 **Componentes Minerais, Oligoelementos e Água**..... 26
3.5 INSTABILIDADES FÍSICO-QUÍMICAS ENCONTRADAS NAS FORMULAÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL..... 27
3.5.1 **Precipitação de Fosfato de Cálcio**..... 27
3.5.2 **Separação das Fases da Emulsão Lipídica**..... 28
3.5.3 **Fotodegradação de Vitaminas em Misturas de Nutrição Parenteral**..... 29
3.6 AGENTES ANTIOXIDANTES EM NUTRIÇAO..... 33
3.7 RESVERATROL..... 34
3.7.1 **Definição e principais fontes**..... 34
3.7.2 **Características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas**..... 35
3.7.3 **Outras atividades biológicas do Resveratrol**..... 37
3.7.4 **Estudos de Toxicidade**..... 38
3.8 ANÁLISE DE VITAMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)..... 39
3.9 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA EXTRAÇÃO DE VITAMINAS..... 41
3.10 ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE..... 42
4 **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 46
4.1 MATERIAIS DE ESTUDO..... 46

4.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS..... 47
4.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA..... 48
4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA..... 50
4.4.1 **Identificação, precisão e exatidão**..... 50
4.4.2 **Limites de detecção e quantificação**..... 51
4.4.3 **Taxa de recuperação**..... 51
4.4.4 **Robustez**..... 52
4.5 METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS SOLVENTES EXTRATORES..... 52
4.6 EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS..... 52
4.7 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO DA VITAMINA A E DO EFEITO FOTOPROTETOR DO RESVERATROL..... 53
**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 56
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA VITAMINA A E DO RESVERATROL..... 56
5.1.1 **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)** ..... 56
5.1.2 **Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Vis**..... 61
5.1.3 **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)** ..... 62
5.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES DE VITAMINA A..... 64
5.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA A E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO..... 66
5.4 ANÁLISE DO SOLVENTE EXTRATOR E TAXA DE RECUPERAÇÃO..... 69
5.5 ESTUDO DA AÇÃO FOTOPROTETORA DO RESVERATROL EM EMULSÕES DE VITAMINA A..... 71
5.5.1 **Análise da ação fotoprotetora do resveratrol sobre a vitamina A em preparações submetidas à radiação UV**..... 71
5.5.2 **Análise da ação fotoprotetora do resveratrol sobre a vitamina A em preparações submetidas à radiação visível**..... 76
5.6 FOTODEGRADAÇÃO DO PALMITATO DE RETINILA..... 80
6 **CONCLUSÕES**..... 84
7 **PERSPECTIVAS**..... 85
**REFERÊNCIAS**..... 86

# 1 INTRODUÇÃO

A nutrição parenteral (NP) é parte de uma terapia nutricional especializada durante a qual os nutrientes são fornecidos através de aporte venoso. A NP é indicada principalmente para o suporte nutricional de pacientes que não podem ou não devem se alimentar pela via oral ou enteral. As formulações compreendem soluções ou emulsões, contendo basicamente carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e eletrólitos (SHULMAN; PHILLIPS, 2003; MIRTALLO et al., 2004; KOLETZKO et al., 2005; TORRINHAS; WAITZBERG, 2016).

Um dos problemas pouco estudados na aplicação da nutrição parenteral é a degradação provocada pela exposição à luz, o que pode levar à foto-oxidação de alguns de seus componentes (CHYTIL, 1996). Misturas de NP, ao serem irradiadas com UV, tornam-se um local de reações entre oxigênio e elétrons doadores, resultando na geração de peróxidos, os quais são considerados como elementos chave para a toxicidade de células (CHESSEX et al., 2002).

Vitaminas encontram-se entre os componentes mais susceptíveis às degradações foto-induzidas em formulações utilizadas em NP (BATHIA, 1992), principalmente a vitamina A (AZEVEDO FILHO, 2008), sendo conhecida por possuir extrema sensibilidade à luz. A exposição da vitamina A à luz do dia pode resultar em perdas maiores que 60% durante a infusão, e, mesmo com certo grau de opacidade, a emulsão lipídica é capaz de oferecer pouca fotoproteção (ALLWOOD; MARTIN, 2000).

Desta forma, o estudo da instabilidade de vitaminas decorrente da fotodegradação constitui uma área de intensa investigação científica. Dentre os fatores que contribuem para a importância desse estudo ressalta-se a necessidade da inclusão de agentes antioxidantes/fotoprotetores eficientes, bem como a execução de um rigoroso controle químico de qualidade nas formulações de NP. No momento, o metabissulfito de sódio representa uma das poucas substâncias antioxidantes utilizadas neste tipo de sistema, sendo adicionado à solução comercial de aminoácidos para este fim. No entanto, ele demonstra incompatibilidade com a vitamina B1, apresenta efeitos locais vasoreativos (LAVOIE; CHESSEX, 1993) e, além disso, foi relatado que os sulfitos reagem espontaneamente com oxigênio para formar radicais livres inorgânicos (BRAWLEY; BHATIA; KARP, 1998).

O presente estudo traz como novidade o uso de um composto fitoquímico para reduzir os danos provocados pela fotooxidação em componentes utilizados para a preparação de formulações de NP. O resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) (RSV), é uma fitoalexina natural presente em uma grande variedade de plantas, tais como uvas (*Vitis vinifera*), amendoim (*Arachis hypogea*) e amoras (*Rubus sp.*), produzida provavelmente em resposta ao estresse, lesões, radiação ultravioleta (UV) e infecção fúngica (AGGARWAL et al., 2004). Diversos efeitos farmacologicamente benéficos já foram atribuídos ao resveratrol: supressão da peroxidação lipídica e estimulação da síntese de eicosanoides (Ex.: ômega 3 e 6), inibição da agregação plaquetária, atividades antioxidante, anti-inflamatória e vasorrelaxante (GAMBINI et al., 2015; RUIVO et al., 2015; SHINDIKAR et al., 2016; BERMAN et al., 2017).

Visando testar a hipótese de utilizar o RSV como agente antioxidante/fotoprotetor em formulações de NP, este trabalho avaliou o resveratrol como um agente protetor para a vitamina A em sistemas nanoemulsionados submetidos à fotodegradação por radiação ultravioleta e visível, contendo RSV em sua composição.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a contribuição do resveratrol como agente fotoprotetor na degradação da vitamina A (na forma de palmitato de retinila), em preparações a serem utilizadas em nutrição parenteral, sob condições controladas de exposição à radiação ultravioleta e visível.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os padrões de vitamina A e resveratrol utilizados no estudo;
- Preparar e caracterizar as emulsões contendo a vitamina A com e sem resveratrol;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para extração da vitamina A das emulsões e para sua quantificação pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Monitorar a fotodegradação da vitamina A emulsionada sob condições controladas de exposição à radiação ultravioleta e visível;
- Avaliar a ação fotoprotetora do resveratrol através da quantificação da vitamina A pela técnica de CLAE.

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 DEFINIÇÃO DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

A Terapia de Nutrição Parenteral (TNP), no Brasil, é regulamentada pela Portaria Nº 272, de 8 de abril de 1998. Esta estabelece que a nutrição parenteral (NP) refere-se à solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais; estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BRASIL, 1998).

A NP é uma preparação de uso extemporâneo e sua formulação envolve a transferência de vários ingredientes estéreis (dextrose, aminoácidos, lipídios, eletrólitos e vitaminas) para um único recipiente, usando técnicas assépticas em cabine de fluxo laminar horizontal, evitando, desta forma, a contaminação microbiológica (INARAJA et al., 2002; SANBORN, 2006). Os farmacêuticos devem cumprir os padrões de formulação estéril estabelecidos, incluindo a composição de salas limpas, vestidos, luvas e validação da técnica asséptica, para garantir que a preparação permaneça estéril. A falta de prática asséptica e as práticas inadequadas de formulação podem levar à contaminação do conteúdo, aumentando o risco de infecção no paciente (MIRTALLO et al., 2004; TURPIN, 2012).

Tanto os macronutrientes (dextrose, lipídios e aminoácidos) quanto os micronutrientes (vitaminas, componentes minerais e oligoelementos) da NP são regulados para o paciente através de prescrição. As quantidades dos componentes devem atender as necessidades individuais de cada paciente, já que existem relatos de sérios danos e mortes a partir de formulações de NP administradas inadequadamente (MIRTALLO et al., 2004).

O farmacêutico é o responsável pela a preparação da NP. Este deve avaliar a prescrição da NP quanto à sua adequação, concentração e compatibilidade físico-química de seus componentes e dosagem de administração. A NP deve ser devidamente rotulada e acondicionada em embalagem impermeável e transparente, permitindo a sua perfeita identificação durante a conservação e transporte (BRASIL, 1998).

Embora os recipientes de vidro sejam geralmente vistos como menos reativos que os plásticos, atualmente eles não são geralmente usados para o fornecimento da terapia de NP. Bolsas de infusão de plástico sofreram várias alterações destinadas a torná-las menos reativas com aditivos e mais protetoras da mistura final antes do uso. Especificamente, as bolsas de cloreto de polivinila (PVC), fabricadas com o plastificante dietilhexil ftalato *(*DEHP*),* foram amplamente substituídas por bolsas feitas com acetato de etilvinila (EVA) ou outros materiais menos reativos. Os resíduos plásticos do DEHP são dissolvidos ao contato com a emulsão lipídica e podem causar toxicidade em neonatos. A bolsa multilaminar representa uma opção bastante utilizada por apresentar baixa permeabilidade ao oxigênio e alta transparência (DRISCOLL, 2003; ANTUNES, 2004; BALET et al., 2004).

## 3.2 CLASSIFICAÇÃO DA NUTRIÇÃO PARENTERAL

Quanto à composição, a NP pode ser classificada como sistema glicídico ou lipídico. O sistema glicídico, binário, ou “dois em um”, é composto por duas soluções de grande volume: uma solução de aminoácidos, como fonte de nitrogênio e uma solução de glicose, como fonte de energia. O sistema lipídico, ternário, ou “três em um”, é composto por três soluções de grande volume: uma solução de aminoácidos, uma solução de glicose e uma solução de lipídios, que representa fonte energética e de ácidos graxos essenciais (GASTALDI, 2009).

## 3.3 INDICAÇÕES DA NUTRIÇÃO PARENTERAL

A Terapia de Nutrição Parenteral (TNP) é indicada em situações nas quais o paciente está impossibilitado de usar a via oral ou enteral por um tempo pré-definido (MARCHINI et al., 1998).

A TNP é indicada para pacientes com anomalias do aparelho gastrointestinal, como, por exemplo, atresia esofágica, atrésia intestinal e gastrosquise; para pacientes com doenças que atinjam gravemente o tubo digestivo: enterocolite necrosante e síndrome do intestino curto; nos casos de prematuridade, com incapacidade total ou parcial em tolerar alimentação por via entérica; e quando há restrição de crescimento intra-uterino com necessidade de pausa alimentar prolongada (PEREIRA-DA-SILVA, 2008).

Os neonatos são um alvo especial na prática de nutrição parenteral. Considerando particularmente os neonatos prematuros, nascidos antes das 37 semanas de gravidez, pode-se afirmar que a sobrevivência destes está relacionada ao uso da NP. Esses pacientes precisam de diferentes quantidades de nutrientes quando comparados com crianças ou adultos (LOBO et al., 2012).

Quanto menor o recém-nascido pré-termo (RNPT), mais precoce deve ser a indicação da nutrição parenteral, uma vez que as reservas energéticas destes são bastante limitadas. Estima-se que um recém-nascido de 1000 g teria reservas energéticas suficientes para sobreviver, sem terapia nutricional, por apenas quatro dias. Crianças com peso inferior a 1000 g devem receber a TNP nas primeiras horas de vida e sugere-se, inicialmente, solução contendo aminoácidos, glicose e eletrólitos. RNPT com peso de 1000 g a 1500 g também merecem atenção especial, não devendo ser postergado o início da NP por mais do que 48 horas. Mesmo o recém-nascido com peso superior a 1500g não deve permanecer mais de 72 horas sem terapia nutricional efetiva. (DE SOUZA; TESKE; SARNI, 2008).

Atualmente tem sido dada grande importância à nutrição do RNPT, pois a desnutrição fetal e, possivelmente, a desnutrição pós-natal têm sido apontadas como fatores importantes na determinação de doenças do adulto, como, por exemplo, diabetes, hipertensão e cardiopatias. Portanto, deve-se propiciar a estes recém-nascidos uma nutrição que lhes garanta crescimento físico e desenvolvimento neuropsicomotor adequados (TRINDADE, 2005).

## 3.4 CONSTITUINTES DA NUTRIÇÃO PARENTERAL

As formulações NP são misturas extremamente complexas contendo 40 ou mais componentes, incluindo aminoácidos, dextrose, lipídios, água, eletrólitos, oligoelementos e vitaminas (MIRTALLO et al., 2004).

### 3.4.1 Carboidratos

De acordo com a condição clínica do paciente, torna-se fundamental o fornecimento adequado de calorias visando um controle metabólico satisfatório. O gasto energético do paciente pode variar de acordo com o tipo de agressão (trauma, sepse ou intervenção cirúrgica, por exemplo), grau de atividade do paciente

(ventilação mecânica ou espontânea, sedação), estado nutricional prévio do paciente e estágio da doença (ATKINSON et al., 2003).

A glicose é o principal substrato calórico no paciente crítico em geral, embora, dependendo do nível de agressão, a fonte energética deva ser misturada (carboidratos e gorduras). Os carboidratos constituem entre 50-60% das calorias não protéicas no metabolismo e devem ser fornecidos numa dose de 2 - 5 g/kg/dia. Uma infusão de glicose de 4 mg/kg/min suprime o consumo de glicogênio em 50% e também suprime o catabolismo protéico de 10% - 15%. Um ajuste na oferta de glicose deve ser realizado para evitar-se níveis glicêmicos >140 $mg.dL^{-1}$, podendo ser necessária, em alguns pacientes, a administração de insulina para manter o nível de glicemia próximo ao normal (LEYBA; GÓMEZ-TELLO; ARBELOA, 2005; FERREIRA, 2007).

É importante ressaltar que os neonatos prematuros apresentam baixa tolerância à glicose nos primeiros dias de vida, e, com o objetivo de evitar um efeito danoso devido à variação da osmolaridade sérica e a diurese osmótica, o início da infusão de glicose deve ser realizado numa velocidade semelhante à taxa de produção hepática (6 mg/kg/min), aumentando de forma lenta e gradativa até que se atinja 11-12 mg/kg/min, em torno de cinco a sete dias (MARCHINI et al., 1998).

### 3.4.2 Lipídeos

As emulsões lipídicas são administradas para prevenir a deficiência de ácidos graxos essenciais e para fornecer uma fonte rica de calorias não proteicas (PUDER et al., 2009).

De 15-30% das calorias devem ser oferecidas na forma de lipídeos. De modo a evitar o déficit de ácidos graxos essenciais, a dose mínima deve ser de 1 g/kg/dia. Entretanto, a contribuição de gorduras não deve exceder a quantidade de 1,5 g/kg/dia, pois a infusão excessiva de lipídeos está relacionada à efeitos imunossupressivos, aumentando o risco de infecções. A contribuição dos lipídios deve ser suspensa se os níveis plasmáticos de triglicerídeos atingirem níveis superiores à 400 $mg.dL^{-1}$ (LEYBA; GÓMEZ-TELLO; ARBELOA, 2005; FERREIRA, 2007).

### 3.4.3 Proteínas

O paciente crítico é um paciente hipercatabólico que apresenta intenso consumo proteico, tornando a infusão de proteínas absolutamente necessária. Os aminoácidos devem representar um total de 15-20% do total de calorias fornecidas, sendo o aporte iniciado com uma dose de 1-1,5 g/kg/dia. Pode-se aumentar esse valor em situações de maior perda proteica (queimaduras e enteropatias com perda de proteínas), devendo ser ajustado de acordo com controles periódicos do balanço de nitrogênio, visando promover a síntese proteica e retenção de nitrogênio (LEYBA; GÓMEZ-TELLO; ARBELOA, 2005; FERREIRA, 2007).

Os requisitos de aminoácidos podem variar com base na quantidade de calorias não proteicas fornecidas (os requisitos de proteína aumentam com a diminuição da infusão de energia), os requisitos gerais de energia (os requisitos de proteína geralmente aumentam com os requisitos de energia aumentados) e a qualidade das proteínas (quantidades inadequadas de qualquer dos aminoácidos essenciais diminui a eficiência da utilização de proteínas). Os aminoácidos entregues aos pacientes devem ser incluídos na estimativa de energia fornecida pela formulação parenteral porque esses aminoácidos podem ser oxidados ou reabastecer os aminoácidos endógenos que foram oxidados (KORETZ; LIPMAN; KLEIN, 2001).

### 3.4.4 Vitaminas

Entre os nutrientes requeridos para muitas funções fisiológicas essenciais estão as vitaminas. Diferentemente de outros nutrientes, as vitaminas não atuam nas funções estruturais, nem geram energia significante decorrente do seu metabolismo. As funções fisiológicas das vitaminas são altamente específicas, e, por esta razão, elas são requeridas em apenas pequenas quantidades na dieta. A forma mais comum da maioria das vitaminas nos alimentos requer algum tipo de ativação metabólica para a forma funcional destas (COMBS; MCCLUNG, 2016).

De acordo com sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica as vitaminas são classificadas em (GREENE et al., 1988):

I. Hidrossolúveis – ácido ascórbico (vitamina C) e o complexo B. O complexo B representa um conjunto de 8 vitaminas. São elas: Tiamina ($B_1$); riboflavina ($B_2$);

niacina ($B_3$); ácido pantotênico ($B_5$); piridoxina ($B_6$); biotina ($B_7$); ácido fólico ($B_9$); cianocobalamina ($B_{12}$).

II. Lipossolúveis - Retinol (A); calciferol (D); tocoferol (E); fitomenadiona ($K_1$).

Embora as vitaminas compartilhem características gerais, elas possuem pouca similaridade química ou funcional. Enquanto muitas vitaminas funcionam como cofatores de enzimas (vitaminas A, K, C, $B_1$, $B_2$, $B_3$, $B_5$, $B_6$, $B_7$, $B_{12}$), nem todos os cofatores de enzimas são vitaminas. Algumas vitaminas funcionam como antioxidantes biológicos (vitaminas E e C), e muitas funcionam como cofatores em reações metabólicas de óxido-redução (vitaminas E, K, C, $B_2$, $B_3$, $B_5$). As vitaminas A e D funcionam como hormônios; a vitamina A também atua como cofator fotorreceptivo na visão (COMBS; MCCLUNG, 2016).

As vitaminas A e D receberam atenção particular nos últimos anos, pois estas vitaminas demonstraram ter um efeito crucial na resposta imune. Elas desempenham um papel essencial na modulação de uma ampla gama de processos imunes, como a ativação e proliferação de linfócitos, a diferenciação de células T-helper, a migração de linfócitos específicos de tecido, a produção de isotipos específicos de anticorpos e regulação da resposta imune (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

Devido às alterações que pode causar em pacientes que fazem uso de anticoagulantes, a vitamina K não é incluída no grupo de vitaminas da formulação de NP. Entretanto, pacientes que estão sob terapia de NP e não necessitam de medicamentos anticoagulantes, devem receber vitamina K suplementar (FERREIRA, 2007).

As preparações multivitamínicas parenterais que estão comercialmente disponíveis nos Estados Unidos satisfazem os requisitos para a maioria dos pacientes que recebem nutrição parenteral, incluindo recém-nascidos pré-termo e neonatos. A ASPEN (*American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*) é um centro projetado para fornecer aos pacientes e cuidadores informações sobre o suporte nutricional, incluindo nutrição parenteral e enteral, dispondo das recomendações atuais de vitaminas para administração em recém-nascidos pré-termo e neonatos, como pode ser visto na Tabela 2.1 (VANEK, 2012).

Tabela 1 – Recomendações atuais de vitaminas para administração parenteral e enteral em recém-nascidos pré-termo e neonatos.

| | **RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO** | | **NEONATOS** | |
|---|---|---|---|---|
| **VIA DE ADMINISTRAÇÃO** | PARENTERAL | ENTERAL | PARENTERAL | ENTERAL |
| **VITAMINAS** | | | | |
| **Retinol (Vitamina A)** | 700–1500 IU/kg/d | 700–1500 IU/kg/d | 2300 IU/d | 1333 IU/d |
| **Calciferol (Vitamina D)** | 40–160 IU/kg/d | 150–400 IU/kg/d | 400 IU/d | 400 IU/d |
| **Tocoferol (Vitamina E)** | 2,8–3,5 IU/kg/d | 6–12 IU/kg/d | 7 IU/d | 6 IU/d |
| **Fitomenadiona (Vitamina K)** | 10 mcg/kg/d in PN | 8–10 mcg/kg/d | 200 mcg/d | 2 mcg/d |
| **Tiamina (Vitamina $B_1$)** | 200–350 mcg/kg/d | 180–240 mcg/kg/d | 1,2 mg/d | 0,2 mg/d |
| **Riboflavina (Vitamina $B_2$)** | 150–200 mcg/kg/d | 250–360 mcg/kg/d | 1,4 mg/d | 0,3 mg/d |
| **Niacina (Vitamina $B_3$)** | 4–6,8 mg/kg/d | 3,6–4,8 mg/kg/d | 17 mg/d | 2 mg/d |
| **Ácido pantotênico (Vitamina $B_5$)** | 1–2 mg/kg/d | 1,2–1,7 mg/kg/d | 5 mg/d | 1,7 mg/d |
| **Piridoxina (Vitamina $B_6$)** | 150–200 mcg/kg/d | 150–210 mcg/kg/d | 1000 mcg/d | 14 mcg/kg/d |
| **Biotina (Vitamina $B_7$)** | 5–8 mcg/kg/d | 3,6–6 mcg/kg/d | 20 mcg/d | 5 mcg/d |
| **Ácido Fólico (Vitamina $B_9$)** | 56 mcg/kg/d | 25–50 mcg/kg/d | 140 mcg/d | 65 mcg/d |
| **Cobalamina (Vitamina $B_{12}$)** | 0,3 mcg/kg/d | 9,3 mcg/kg/d | 1 mcg/d | 0,4 mcg/d |
| **Ácido Ascórbico (Vitamina C)** | 15–25 mg/kg/d | 18–24 mg/kg/d | 80 mg/d | 40 mg |

Fonte: VANEK, 2012.

Com base nas doses recomendadas para os atuais produtos multivitamínicos parenterais, a dose diária das vitaminas lipossolúveis é aproximadamente a mesma para a administração oral destas vitaminas, embora a biodisponibilidade deva ser

muito maior quando elas são administradas por via intravenosa. A justificativa para fornecer uma dose efetiva mais alta quando administrada como parte da terapia de NP foi que esses pacientes tinham maiores necessidades de vitamina devido à desnutrição, deficiências de vitaminas e alterações metabólicas secundárias a doenças agudas e crônicas (VANEK, 2012). Já para as vitaminas hidrossolúveis, a dose diária recomendada, quando administrada por via parenteral é maior que aquela administrada por via oral. A justificativa é que há um aumento da excreção urinária de vitaminas solúveis em água quando administrada por via intravenosa. Essas doses relativamente altas de vitaminas têm sido usadas na terapia de NP há mais de 30 anos, e nenhuma toxicidade foi descrita. Portanto, ASPEN não recomenda qualquer redução de dose nos produtos multivitamínicos parenterais (VANEK, 2012).

### 3.4.5 Componentes Minerais, Oligoelementos e Água

A necessidade de água e eletrólitos é baseada na apuração do balanço diário desses elementos, considerando parâmetros cardiovasculares, renais, hepáticos e análises bioquímicas. O volume de líquido fornecido deve ser consistente com as calorias totais, e, geralmente, é necessário 1 mL de água por caloria infundida (FERREIRA, 2007).

Os minerais adicionados na nutrição parenteral são o sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e fósforo (P). As contribuições de K, Mg e P são essenciais para evitar situações potencialmente letais, como o aparecimento de arritmias malignas, e, por isso, estes minerais devem ser monitorados constantemente (LEYBA; GÓMEZ-TELLO; ARBELOA, 2005). Considerando o RNPT, o Ca e o P são os minerais mais abordados na literatura, devido aos distúrbios metabólicos agudos no período neonatalino imediato que podem ser causados pela falta destes, como a hipocalcemia neonatal precoce, bem como manifestações tardias, como a doença óssea metabólica do prematuro (TRINDADE, 2005).

Cromo (Cr), cobre (Cu), iodo (I), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) são os oligoelementos, também chamados de elementos traço, adicionados nas formulações de NP (LEYBA; GÓMEZ-TELLO; ARBELOA, 2005). Embora os oligoelementos representem, quantitativamente, uma pequena fração do conteúdo mineral do corpo humano, apresentam papel importante em várias vias metabólicas. O RNPT pode apresentar deficiências em consequência dos baixos níveis destes ao

nascimento, uma vez que a incorporação desses mineirais acontece no último trimestre da gestação (TRINDADE, 2005).

## 3.5 INSTABILIDADES FÍSICO-QUÍMICAS ENCONTRADAS NAS FORMULAÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL

As mais importantes instabilidades físico-químicas da NP são: precipitação de fosfato de cálcio; separação de fases da emulsão lipídica; e fotodegradação de vitaminas. A seguir cada uma destas instabilidades é descrita.

### 3.5.1 Precipitação de Fosfato de Cálcio

As formulações de NP típicas apresentam várias possíveis incompatibilidades físico-químicas. O risco mais grave de incompatibilidade e, portanto, a ameaça mais iminente para o paciente, surge quando precipitados que excedem 5 µm se desenvolvem na formulação e passam para a circulação central. Duas formas de precipitados podem aparecer na formulação preparada: os sólidos e os líquidos. A separação de fases com a liberação de óleo livre constitui o precipitado líquido, porém, a formação de precipitado cristalino é citada com maior frequência nas formulações de NP. Os precipitados sólidos podem desenvolver-se quando uma combinação incompatível de vários sais é adicionada a uma formulação de NP, resultando na formação de produtos insolúveis (MIRTALLO et al., 2004).

Embora haja a necessidade do fornecimento adequado dos minerais cálcio e fósforo para recém-nascidos pré-termo, existe uma dificuldade em administra-los, através da nutrição parenteral, em quantidades que se equiparem às necessidades intrauterinas. Altas concentrações de íons cálcio ($Ca^{2+}$) e fosfato ($PO_4^{3+}$) diluídos em um baixo volume final de NP aumentam o risco de formação de precipitados de fosfato de cálcio, que são pouco solúveis em meio aquoso (TRINDADE, 2005).

Os sais de cálcio representam um dos compostos mais reativos e podem prontamente formar produtos insolúveis com vários aditivos. O fosfato de cálcio dibásico ($CaHPO_4$) é um exemplo de uma das combinações incompatíveis mais perigosas e resultou em óbitos por embolia quando infundidos no cenário clínico (MIRTALLO et al., 2004).

A precipitação do fosfato de cálcio pode ser evitada através de uma variedade de medidas. A ordem na adição dos componentes da formulação é extremamente importante para evitar a formação de um precipitado insolúvel que, de outra forma, seria solúvel se fosse adicionado na sequência correta. Geralmente, o fosfato deve ser adicionado em primeiro lugar, e o cálcio perto do final da sequência de adição de eletrólitos para que se possa tirar proveito do volume máximo da formulação de NP (MIRTALLO et al., 2004).

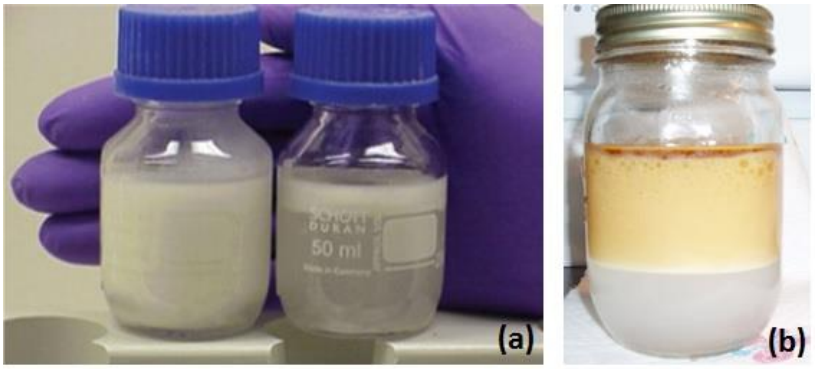
### 3.5.2 Separação das Fases da Emulsão Lipídica

A instabilidade das emulsões lipídicas intravenosa é manifestada pelo crescimento de gotículas submicrônicas (ou seja, <450 nm ou <0,45 μm) em grandes gotículas gordurosas (>5 μm), levando à coalescência. As consequências da coalescência podem ser expressas experimentalmente de várias maneiras, como, por exemplo, avaliando o tamanho da gotícula em termos de volume e de distribuição (polidispersão) em uma região específica (DRISCOLL, 2003).

Existem dois estágios de desestabilização da emulsão que são visivelmente detectáveis a olho nu, que é a formação de sobrenadante, ou *creaming*, e a coalescência, que é o crescimento das gotículas devido ao agrupamento destas. Neste estágio, pode ser notada a presença de uma camada na superfície da emulsão como uma banda translúcida separada da formulação de NP total restante. Embora as gotículas de lipídeos nesta camada estejam desestabilizadas, suas identidades individuais de gotículas são geralmente preservadas. Assim, esta fase da degradação da emulsão ainda é segura para a administração no paciente (MIRTALLO et al., 2004). A Figura 1(a) mostra uma emulsão em processo de formação de *creaming*.

O estágio terminal da desestabilização da emulsão lipídica é a coalescência de pequenas gotículas lipídicas que formam grandes gotículas e podem variar em tamanho de 5 a 50 μm, representando perigo clínico potencial, ainda que escape à detecção visual. A coalescência é irreversível, ou seja, quando ocorre, não permite a recomposição. A existência de gotículas lipídicas coalescentes em uma formulação de NPT é caracterizada pela presença variável de gotículas de óleo amarelo-castanho na superfície da formulação ou perto dela. Neste estágio, a formulação é considerada imprópria para administração intravenosa (MIRTALLO et al., 2004). Um exemplo de emulsão desestabilizada por coalescência pode ser visto na Figura 1(b).

Figura 1 – Comparação visual entre uma emulsão estável e uma emulsão desestabilizada com formação de *creaming* (a) e emulsão desestabilizada por coalescência (b).




Fonte: SARKER, 2013.

### 3.5.3 Fotodegradação de Vitaminas em Misturas de Nutrição Parenteral

A nutrição parenteral é frequentemente suplementada com vitaminas no início da terapia, especialmente para bebês prematuros e recém-nascidos que apresentem deficiência destas. Embora a literatura mostre que algumas vitaminas são suficientemente estáveis para serem adicionadas a soluções parenterais, em alguns casos, o material da bolsa de nutrição parenteral, a temperatura e a duração do armazenamento podem levar à degradação de algumas vitaminas. Na prática clínica, é útil adicionar vitaminas às soluções parenterais antes de iniciar a infusão, a fim de reduzir o risco de deterioração (VAZQUEZ et al., 2009a).

Do ponto de vista clínico, a estabilidade físico-química das formulações de NP é amplamente focada em vitaminas, várias das quais são conhecidas por deterioração substancial ao longo do tempo e na presença de luz e oxigênio. A degradação de vitaminas geralmente produz poucos distúrbios clinicamente significativos no ambiente de cuidados intensivos, tendendo a serem mais importantes em pacientes com reservas corporais escassas, como os recém-nascidos pré-termo, e os que dependem do suporte de NP a longo prazo (MIRTALLO et al., 2004).

Diversos trabalhos têm relatado a degradação de vitaminas na NP sob ação de radiação UV em formulações para NP (LAVOIE et al., 1997; ALLWOOD e KEARNEY, 1998; ALLWOOD e MARTIN, 2000; BALET et al., 2004; LAVOIE et al., 2007; DÍAZ et al., 2009; VAZQUEZ et al., 2009b; RIBEIRO et al., 2011), descrevendo, por exemplo,

a intensa degradação que ocorre com as vitaminas A e E (ALLWOOD e MARTIN, 2000; HAAS; BOROVICZENY; KOLETZKO, 2002; SABLIOV et al., 2009).

A vitamina A possui extrema sensibilidade à luz e a vitamina E sofre foto-oxidação na presença de oxigênio. A exposição à luz do dia da vitamina A pode resultar em maiores perdas, certamente mais de 60% durante a infusão, mesmo que a bolsa esteja protegida contra a luz. A emulsão lipídica oferece pouca proteção e, portanto, torna-se importante proteger a bolsa contendo a formulação de NP durante a administração à luz do dia (ALLWOOD; MARTIN, 2000). Já a degradação da vitamina E durante a administração é influenciada pelo tipo de bolsa utilizada, podendo ser amplamente eliminada se as misturas forem preparadas em bolsas multicamadas. Em contrapartida, as perdas em bolsas de EVA podem ser superiores a 90%, pois as formulações neste tipo de bolsa sempre conterão algum oxigênio devido à permeabilidade do EVA. Novamente, a emulsão lipídica oferece apenas uma proteção parcial. Uma vez que esta foto-reação ocorre entre o tocoferol e o oxigênio dissolvido na NP, a taxa e a extensão desta dependerão da quantidade de oxigênio disponível (ALLWOOD; MARTIN, 2000).

Estudos foram realizados no intuito de avaliar a influência da embalagem na degradação de vitaminas de algumas matrizes alimentícias. Saffert e colaboradores (2008) avaliaram a degradação, sob ação da luz, das vitaminas A, $B_2$ e $D_3$ presentes no leite, comparando-se a estocagem deste em garrafas PET claras com transmissão de luz completa e em garrafas pigmentadas. Os resultados indicam que as garrafas PET claras não oferecem proteção contra a luz para a degradação das vitaminas. Como consequência, os teores de vitamina A e $D_3$ são reduzidos a menos da metade, enquanto a vitamina $B_2$ se decompõe completamente durante o período de vida útil padrão do leite em condições de armazenamento reais. A redução da transmitância da luz pelo uso de garrafas de PET pigmentadas reduziu significativamente as perdas de vitaminas A e $B_2$, embora no caso da vitamina A, o efeito protetor do nível de pigmentação fosse menos pronunciado (SAFFERT; PIEPER; JETTEN, 2008; SAFFERT; PIEPER; JETTEN, 2009).

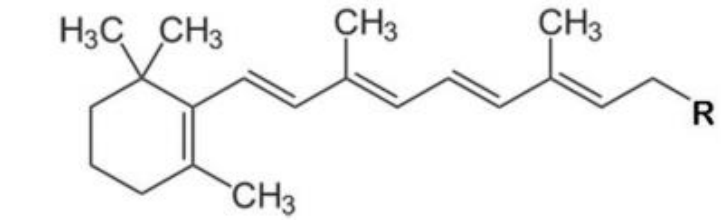
Nos alimentos, o retinol é normalmente ingerido na forma de provitamina A (betacaroteno) e vitamina A (retinol). Após a absorção, a vitamina A é transportada para o fígado, incorporada aos quilornícrons e armazenada como ésteres de retinol. Após a hidrólise desses ésteres, o retinol é liberado no sangue como um complexo ligado à proteína de ligação ao retinol. Uma infusão de ésteres de retinol pode ser um

meio eficaz de prevenir o desenvolvimento de deficiência de vitamina A principalmente em casos de disfunção hepática. (GERLACH et al., 1989).

O palmitato de retinila (éster) é a forma primária de armazenamento da vitamina A no organismo, uma vez que a esterificação protege o grupo hidroxila da oxidação. O retinol pode ser reversivelmente oxidado à retinal, que, por sua vez, pode ser oxidado à ácido retinóico (LIMA, 2015). As estruturas químicas das formas de vitamina A estão representadas na Figura 2.

Os ésteres do retinol, por serem quimicamente e termicamente mais estáveis que o retinol, têm sido frequentemente preferidos na formulação de produtos farmacêuticos (XIA et al., 2006a; FU et al., 2007). Atualmente no Brasil, nas preparações para NP e para suplementação vitamínica, o palmitato de retinila é a forma de vitamina A utilizada (JESUS, 2013; CARUSO; DE SOUZA, 2014).

Figura 2 – Estrutura química das formas de vitamina A.




**Grupo R**

- $CH_2OH$---------- Retinol
- CHO---------- Retinal
- CHOH---------- Ácido retinóico
- $CH_2OCO\ (CH_2)_{14}CH_3$--------- Retinol palmitato

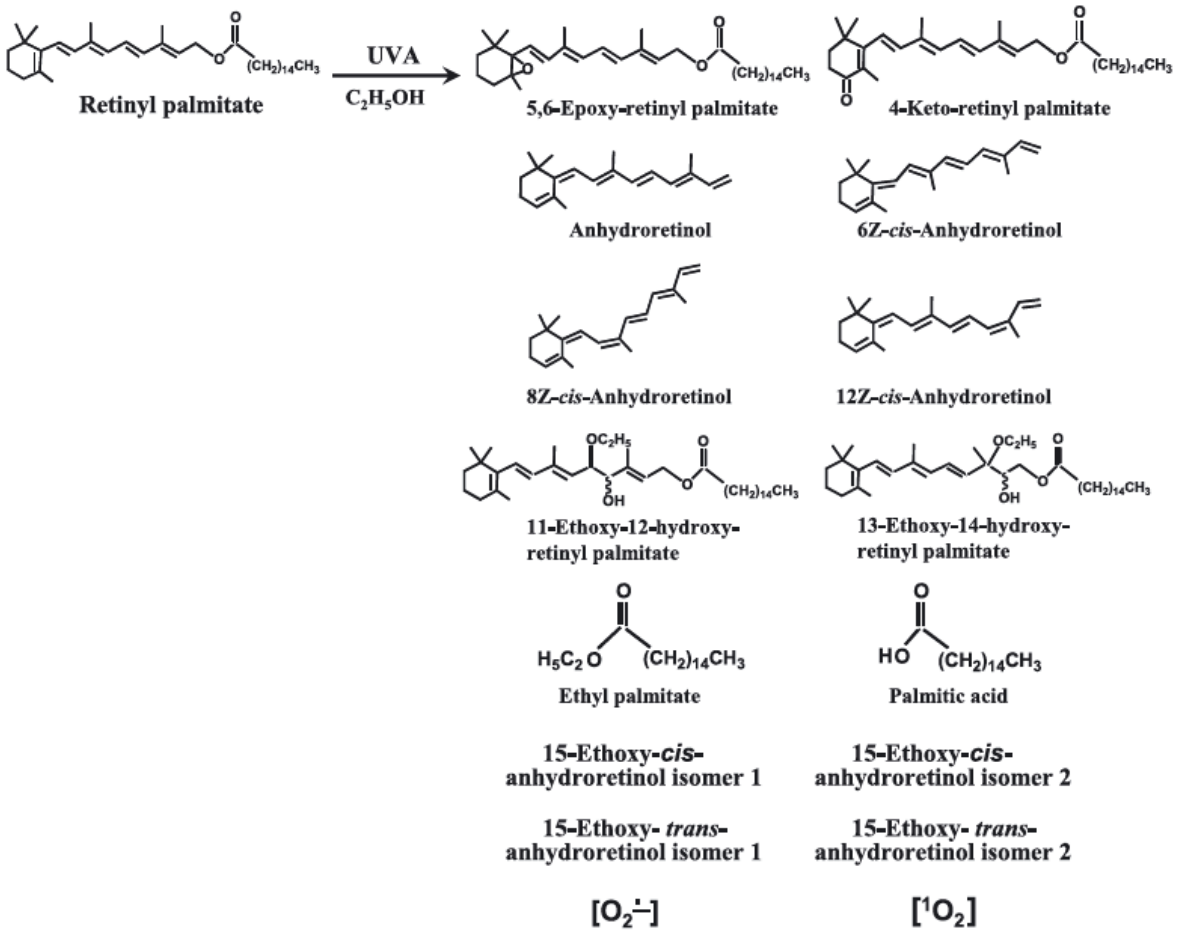
Fonte: LIMA, 2015.

Cherng e colaboradores (2005) estudaram a fotólise do palmitato de retinila dissolvido em etanol e expostos a uma fonte de radiação UV. Os produtos de fotodecomposição resultantes foram separados por CLAE em fase reversa e as estruturas foram identificadas espectroscopicamente. Foram identificados um total de 14 produtos de fotodecomposição, incluindo palmitato de 5,6-epoxi-retinila, palmitato de 4-ceto-retinila, palmitato de 11-etoxi-12-hidroxi-retinila, palmitato de 13-etoxi-14-hidroxi-retinila, all-trans-anidroretinol, 6Z-cis-anidroretinol, 8Z-cis-anidroretinol, 12Z-cis-anidroretinol, ácido palmítico, palmitato de etila e quatro 15-etoxianidroretinóis isoméricos cis- e trans, com formação, também, de oxigênio singleto e ânion

superóxido (descritos na Figura 3) (CHERNG et al., 2005). Em um estudo realizado por Xia e colaboradores (2006), quando o palmitato de retinila emulsionado foi exposto à radiação UV, muitos dos mesmos produtos de fotodecomposição foram formados. Todos os produtos de fotodecomposição foram considerados fotoquimicamente instáveis. Após irradiação prolongada, os produtos de fotodecomposição são posteriormente decompostos em múltiplos produtos (XIA et al., 2006b).

O estudo da instabilidade das formulações, mais precisamente a fotodegradação de vitaminas, constitui uma área de intensa investigação científica. Dentre os fatores que contribuem para a importância desse estudo ressalta-se a necessidade da inclusão de novos agentes antioxidantes /fotoprotetores.

Figura 3 – Produtos de fotodegradação do palmitato de retinila irradiado por UV.




Fonte: FU et al., 2007.

## 3.6 AGENTES ANTIOXIDANTES EM NUTRIÇAO

Considerando que compostos usados para formulações nutritivas estão susceptíveis à oxidação, torna-se necessário o emprego de agentes que sejam capazes de prevenir esse tipo de processo. O papel dos antioxidantes é retardar ou controlar a oxidação inativando radicais livres e/ou pro-oxidantes, como metais de transição (SHAHIDI, 2000; WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011).

No âmbito nutricional, a adição de antioxidantes também é importante na prevenção da deterioração de componentes lipídicos. Antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato (PG) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) são comumente usados em formulações nutritivas. No entanto, devido a preocupações de segurança, o interesse em antioxidantes naturais tem se intensificado (SHAHIDI, 2000).

Uma outra classe muito importante de antioxidantes utilizada cada vez mais é constituída de ingredientes à base de plantas. Os antioxidantes naturais mais ativos neste âmbito pertencem à família dos compostos fenólicos e polifenólicos. Tocoferóis, carotenóides e vitamina C são outros grupos de antioxidantes naturais que também são encontrados amplamente em plantas e tecidos animais (SHAHIDI, 2000). Alguns destes compostos apresentam-se bastante apolares e são bastante eficazes em emulsões óleo-em-água, uma vez que são retidos na gotícula de emulsão, onde a oxidação é mais prevalente (WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011). Antioxidantes apolares como tocoferóis, TBHQ e PG podem se acumular nas interfaces óleo-água, sendo mais eficazes nesses tipos de emulsões (CHAIYASIT, 2007).

Uma variedade de alimentos e bebidas de origem vegetal contém várias classes de compostos fenólicos não-flavonóides sintetizados pelas plantas. Entre eles, o resveratrol foi identificado como o principal composto ativo de fitoalexinas de estilbeno e presume-se ser benéfico para a saúde humana (FREMONT, 2000; GÜLÇIN, 2010; SZKUDELSKA; SZKUDELSKI, 2010; JEON et al., 2012; MAGYAR et al.; 2012). Jang e colaboradores (1999) demonstraram que o resveratrol é um potente inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O número e posição dos substituintes hidroxi em análogos de resveratrol parecem desempenhar um papel importante na sua potência de inibição da produção de ROS. Sua atividade antioxidante também já foi reportada por Tadolini e colaboradores (2000), que

demonstraram que o resveratrol inibiu de forma mais eficiente do que qualquer análogo hidrofílico da vitamina E ou vitamina C a peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina sonicados (JANG et al., 1999; TADOLINI et al., 2000).

Como composto fenólico, o resveratrol contribui para o potencial antioxidante do vinho tinto e, portanto, pode desempenhar um papel na prevenção de doenças cardiovasculares. Este fitocomposto demonstrou modular o metabolismo dos lípidos e inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e a agregação plaquetária. Além disso, como fitoestrógeno, o resveratrol pode fornecer proteção cardiovascular. Este composto também possui propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (FREMONT, 2000).

Sua atividade antioxidante também demonstrou ter efeitos contra doenças e distúrbios da pele. Estudos mostraram efeitos protetores do resveratrol contra o estresse oxidativo mediado pela radiação ultravioleta e danos cutâneos, incluindo envelhecimento e câncer de pele (NDIAYE et al., 2011). Devido a seus efeitos benéficos em organismos vivos, o resveratrol vem sendo intensamente investigado, sendo um bom candidato para minimizar ou impedir a oxidação lipídica em produtos farmacêuticos, retardando a formação de produtos oxidantes tóxicos, mantendo a qualidade nutricional e prolongando a vida útil de produtos alimentícios e farmacêuticos, podendo substituir o BHA e BHT e outros compostos antioxidantes devido ao seu uso mais seguro (GÜLÇIN, 2010).

## 3.7 RESVERATROL

### 3.7.1 Definição e principais fontes

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina presente em várias espécies de plantas. Sua síntese a partir de p-cumaroil-CoA e malonil-CoA é induzida por estresse, lesão, infecção ou irradiação UV, sendo classificado como um antifúngico capaz de conferir resistência a doenças no reino vegetal (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997).

O resveratrol ocorre naturalmente nas frutas e folhas de plantas comestíveis, como amendoim, amora e uva, na qual apresenta-se em maior parte na casca das frutas. Devido a isto, o vinho branco contém quantidades muito pequenas de

resveratrol, em comparação com o vinho tinto (FREMONT, 2000; GÜLÇIN, 2010; NEVES et al., 2012).

Estudos epidemiológicos revelam uma correlação entre o consumo de vinho tinto e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, um fenômeno comumente conhecido como "Paradoxo francês". Sabe- se, desde muitas décadas, que a França tem uma baixa taxa de mortalidade por doença coronariana. Apesar da baixa prática de exercícios associada à dieta rica em gorduras, certas populações da França parecem ter menos predisposição para doenças cardíacas quando comparadas ao restante da Europa, apresentando uma incidência de infarto cerca de 40% menor. A constatação de que um consumo moderado de vinho tinto é benéfico para a saúde levou à sugestão de que os compostos fenólicos poderiam ser responsáveis pelas propriedades benéficas deste (RICHARD, 1987; RENAUD; LORGERIL, 1992; RENAUD; LORGERIL, 1993; CRIQUI; RINGEL, 1994; WHITEHEAD et al., 1995; FUHRMAN; LAVY; AVIRAM, 1995; KOPP, 1998; TADOLINI et al., 2000; NEVES et al., 2012).

O RSV tem sido extensivamente estudado devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, uma consequência de seus efeitos estrogênicos, bem como a prevenção e tratamento de vários distúrbios metabólicos, incluindo diabetes (SZKUDELSKA; SZKUDELSKI, 2010).

### 3.7.2 Características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas

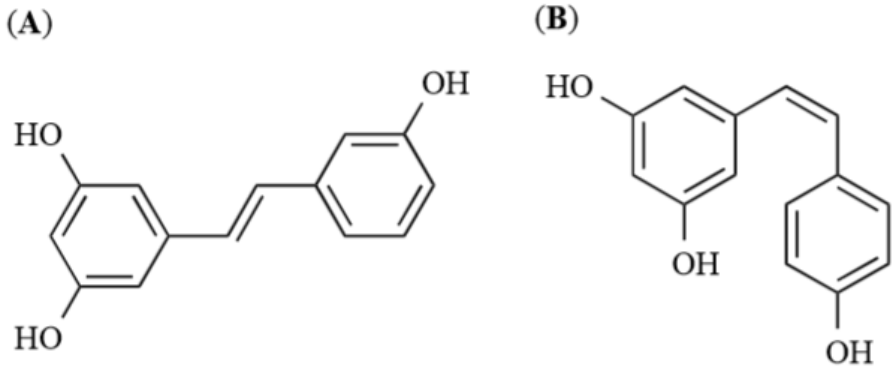
O resveratrol apresenta-se na forma de pó esbranquiçado com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, peso molecular de 228,25 $g.mol^{-1}$ e ponto de fusão entre 253 e 255 °C. Quanto à solubilidade, o resveratrol é um composto lipossolúvel, sendo também solúvel em etanol a ~50 $mg.ml^{-1}$ (~200 $mmol.L^{-1}$) e em DMSO a ~16 $mg.ml^{-1}$ (~70 $mmol.L^{-1}$). Entretanto, sua hidrossolubilidade de ~3 $mg.100\ ml^{-1}$ (~ 0.13 $mmol.L^{-1}$) torna este composto praticamente insolúvel em água. Apesar desta fraca solubilidade em água, o resveratrol exibe uma alta permeabilidade à membrana e pode ser considerado composto de classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (WANG et al., 2002; VIAN et al., 2005; LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2006; AMRI et al., 2012).

O resveratrol apresenta isomeria estrutural *cis* e *trans*. O isômero *trans* é biologicamente mais ativo que o isômero *cis*, provavelmente devido à sua

conformação não planar. *Cis*-resveratrol foi relatado como instável e, portanto, não está disponível comercialmente. Quando protegido da luz, o *trans*-resveratrol é estável por pelo menos 42 h (CV ≤1%) e por pelo menos 28 dias (CV ≤4,7%) em tampões de pH 1-7, enquanto a forma *cis* é apenas estável em pH neutro quando completamente protegido da luz (TRELA; WATERHOUSE, 1996; BASLY, 2000; CHEN et al., 2007; FULDA, 2010; AMRI et al., 2012).

O resveratrol é um composto altamente fotossensível suscetível à isomerização induzida por UV, uma vez que mais de 80% do *trans*-resveratrol em solução é convertido em *cis*-resveratrol se exposto à luz por 1 h. Trela e Waterhouse (1996) também relataram que o *trans*-resveratrol é suscetível à isomerização induzida por UV. Em uma análise que submeteu o *trans*-resveratrol à irradiação por 120 min à 366 nm, constatou-se que 90,6% deste foi convertido em *cis*-resveratrol. (TRELA; WATERHOUSE, 1996; VIAN et al., 2005; AMRI et al., 2012; NEVES et al., 2012). As moléculas dos isômeros *cis* e *trans* do resveratrol encontram-se na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química do resveratrol, que ocorre na forma de dois isômeros: (A) *trans*-3,5,4'trihydroxystilbene, e (B) *cis*-3,5,4'-trihydroxystilbene.




Fonte: Neves et al., 2012.

Em relação às propriedades farmacocinéticas, o trans-resveratrol é rapidamente absorvido, metabolizado e excretado em humanos e animais, indicando uma baixa biodisponibilidade deste composto e comprometendo seus efeitos biológicos. Alguns estudos tentam elucidar a questão se o resveratrol pode acumular-se até níveis bioativos. Para superar esse problema, os transportadores de resveratrol e os sistemas de liberação específicos para cada local estão sendo desenvolvidos

para proteger e estabilizar o resveratrol e aumentar sua biodisponibilidade, preservando suas atividades biológicas e farmacológicas (NEVES et al., 2012).

### 3.7.3 Outras atividades biológicas do Resveratrol

Existem evidências indicando que o resveratrol pode possuir potencial terapêutico em várias doenças imunomediadas, tais como doenças inflamatórias e autoimunes. Experimentos *in vitro* demonstram o efeito inibitório do resveratrol em moléculas inflamatórias cruciais, como por exemplo, na cascata do ácido araquidônico, onde atua na inibição da cicloxigenase, e em fatores de transcrição como o NF-κB, que está relacionado ao estresse oxidativo e expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Embora faltem estudos clínicos em humanos, vários resultados de modelos animais destacam a eficácia do resveratrol em melhorar a artrite inflamatória induzida experimentalmente, a miocardite autoimune experimental, e até mesmo a encefalomielite autoimune experimental (DAS; DAS, 2007; CSISZAR, 2011; ŠVAJGER; JERAS, 2012).

É importante mencionar que o suporte nutricional é parte essencial do tratamento metabólico de pacientes decorrentes de trauma e, em muitos casos, a nutrição parenteral é a única opção terapêutica nutricional viável, devendo ser introduzida entre 24 e 48 h após a lesão, com baixa velocidade de infusão e progressão de forma lenta somente em pacientes com estabilidade hemodinâmica que assegure tolerância à dieta (RABELO et al., 2012). Sendo assim, pacientes politraumatizados que utilizam a terapia da nutrição parenteral poderiam adquirir mais vantagens pela inclusão do resveratrol nas formulações a serem infundidas, pois, desta vez, esse não atuaria apenas como um excipiente para fotoproteção de componentes, mas também como uma substância ativa por sua atividade anti-inflamatória.

Estudos também sugerem que o resveratrol induz a parada do ciclo celular em inúmeras linhas celulares envolvidas no câncer (DAMIANAKI et al., 2000; GAUTAM et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2000; ZHOU et al., 2003; FULDA, 2010). Em outro estudo, o resveratrol demonstrou inibir a proliferação celular em linhagens leucêmicas de camundongos e humanos, através da fragmentação do DNA nucleossômico (apoptose). A exposição à longo prazo ao resveratrol também inibe o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas normais. Experimentos realizados *in*

*vivo* com medula óssea não tratada e tratada com resveratrol mostraram reconstituição hematopoiética comparável em ratinhos letalmente irradiados. Os resultados indicam o uso potencial do resveratrol para a purga farmacológica *ex vivo* de células de leucemia sem perda significativa na atividade hematopoiética de células progenitoras da medula óssea (GAUTAM et al., 2000).

O resveratrol também é descrito na literatura como um composto eficaz na melhoria do controle glicêmico e pode, possivelmente, representar um potencial adjuvante para o tratamento e manejo da obesidade e do *Diabetes Mellitus* (SZKUDELSKA; SZKUDELSKI, 2010; KITADA et al., 2011; TIMMERS et al., 2011; JEON et al., 2012; BHATT; THOMAS; NANJAN, 2012; SOUFI et al., 2012). A utilização deste composto mostrou ser eficaz na redução do peso corporal e a adiposidade em animais obesos por envolver mudanças favoráveis nas expressões gênicas e nas atividades enzimáticas. Evidências indicam os benefícios do resveratrol no diabetes e complicações diabéticas por sua capacidade de afetar a secreção de insulina e a concentração de insulina no sangue. Em animais com hiperinsulinemia, descobriu-se que o resveratrol reduz a insulina no sangue. Além disso, numerosos dados indicam que, em ratos diabéticos, o resveratrol é capaz de reduzir a hiperglicemia. O mecanismo de ação do resveratrol é complexo e demonstra envolver tanto os efeitos dependentes de insulina como os efeitos independentes de insulina (SZKUDELSKA; SZKUDELSKI, 2010).

É importante mencionar que o resveratrol também é bastante investigado por seu efeito cardioprotetor. Já existe uma série de estudos que fornecem evidências que vinhos e uvas podem atenuar doenças cardíacas, como aterosclerose e doença cardíaca isquêmica, relacionando tais efeitos à presença do resveratrol e mostrando sua importância na redução do risco de morbidade e mortalidade devido a complicações cardiovasculares (BERTELLI; DAS, 2009; GURUSAMY et al., 2009; PENUMATHSA; MAULIK, 2009; XI et al., 2009; SEBAI et al., 2011; WU; HSIEH, 2011; WU; HSIEH; WANG, 2011; MAGYAR et al., 2012).

### 3.7.4 Estudos de Toxicidade

A segurança do resveratrol foi avaliada em um estudo recente realizado por Cottart e colaboradores (2014). Neste, dados de pesquisas avaliando a toxicidade do resveratrol foram compilados e comparou-se a ocorrência (ou ausência) de efeitos

adversos com administração do resveratrol em humanos. Os estudos mostraram que nenhum efeito adverso foi relatado ou os efeitos foram considerados não relacionados à suplementação com resveratrol quando quantidades <1 g foram administradas nos indivíduos ou quando o período de suplementação foi curto (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014).

Quando administrado por um mês, os primeiros e raros eventos aparecem com doses > 0,5 g, embora poucos efeitos adversos tenham sido relatados dentro dessa faixa de dosagem. No estudo de Patel e colaboradores (2010), nenhum evento foi relatado quando doses de 0,5 e 1 g foram administradas, mas o tratamento durou apenas 8 dias (PATEL et al., 2010). Para as altas doses, os distúrbios abdominais foram os principais efeitos relatados, como, por exemplo, casos de diarreia, dor abdominal, náusea e flacidez (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014).

Globalmente, o resveratrol foi bem tolerado e quando os efeitos adversos ocorreram, estes foram leves e se resolveram espontaneamente sem sequelas. Além disso, esses eventos adversos podem não ter sido relacionados ao resveratrol, pois pacientes do grupo placebo exibiam distúrbios semelhantes. No entanto, nas doses mais elevadas, a duração máxima da ingestão foi de apenas um mês. Assim, pode-se constatar com tais dados toxicológicos que o resveratrol é bem tolerado, pois, mesmo quando constaram-se efeitos adversos, tais eventos permaneceram moderados e reversíveis (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014).

## 3.8 ANÁLISE DE VITAMINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Já é bem conhecido o fato de que as vitaminas são um amplo grupo de compostos orgânicos essenciais para o crescimento normal, a automanutenção e o funcionamento dos corpos humanos e animais, sendo a ausência destas a causa de sérios problemas fisiológicos. O crescente interesse em bons hábitos alimentares desencadeou em uma maior consciência do papel vital que as vitaminas desempenham no crescimento e na saúde (BLANCO; FERNANDEZ; GUTIERREZ, 2000; MORENO; SALVADÓ, 2000).

Juntamente com uma possível perda através de reações químicas, as vitaminas podem ser lixiviadas durante e processamento de alimentos. Neste sentido, é extremamente importante ter preparativos disponíveis para substituir a possível falta

de vitaminas na dieta diária, razão pela qual os medicamentos multivitamínicos estão se tornando amplamente utilizados, bem como preparações para recém-nascidos que apresentem necessidades vitamínicas. Esses fatos, juntamente com a introdução de regulamentos de rotulagem de preparações nutritivas, levam a uma necessidade de técnicas de separação analítica muito poderosas para o controle de qualidade dessas formulações complexas. Isso estimulou a pesquisa sobre métodos analíticos precisos e eficientes para a determinação de vitaminas, o que é problemático devido à sua instabilidade e à complexidade das matrizes em que elas são usualmente analisadas (MORENO; SALVADÓ, 2000).

Devido à facilidade de isomerização das vitaminas, a análise destas pode incorrer em uma série de erros. As reações envolvendo estes nutrientes podem conduzir à perda total ou parcial do valor vitamínico em condições extremas de pH, temperaturas elevadas e alto poder de oxi-redução, fatores que devem ser considerados pelos métodos analíticos (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

Os clássicos ensaios biológicos com cobaias e microrganismos, em função de suas exigências nutricionais seletivas por determinadas vitaminas, são considerados longos, onerosos e laboriosos. Além disso, não permitem a quantificação simultânea e a automação, apesar da sensibilidade e especificidade dos mesmos para a determinação das vitaminas hidro e lipossolúveis. Neste caso, os ensaios biológicos são considerados complementares aos químicos que, devido ao pequeno número de testes confirmativos são realizados mais rapidamente e requerem menor repetibilidade e reprodutibilidade (PAIXÃO; STAMFORD, 2004).

O ensaio espectrofotométrico é insuficiente como um método único para analisar vitaminas, pois, na estimativa de compostos distintos, interferentes e isômeros contribuem erroneamente para o valor da vitamina. A determinação por CLAE-UV acoplado ao λ máximo ou fixo é uma técnica apropriada para estimar os isômeros de um único composto e seus derivados, possibilitando determinar, com precisão, o valor das vitaminas em análise (PAIXÃO; CAMPOS, 2003).

Atualmente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica mais recomendada para identificar diferentes formas químicas e avaliar as vitaminas nos alimentos e outras matrizes. Isto justifica-se pela versatilidade da técnica, que pode ser usada para a identificação de matrizes complexas ou presença de outras substâncias, tais como isômeros e produtos de degradação. A CLAE pode ser executada através da utilização da detecção por UV e/ou propriedades de

fluorescência dos compostos que desempenham a função de vitaminas, podendo ser realizada à temperatura ambiente e sem derivação das substâncias (PAIXÃO; STAMFORD, 2004; PAIXÃO, 2010; PAIVA; COSTA; AZEVEDO, 2015). A quantificação pode ser obtida por comparação das áreas relacionadas às concentrações conhecidas nas curvas de calibração (externas ou com padrão interno) (BREITHAUPT, 2001; JASTREBOVA et al., 2003; QUIRÓS et al., 2004; PRIETO et al., 2006; YAZININA et al., 2008).

O estudo do perfil espectral é uma ferramenta útil durante o processo de identificação e confirmação de sinais. As áreas de maior absorção podem ser confirmadas com precisão por detecção DAD e as avaliações realizadas no banco de dados são capazes de comparar padrões e amostras, mostrando os índices de similaridade e de pureza (PAIVA; COSTA; AZEVEDO, 2016).

Em relação às vitaminas lipossolúveis, são descritas, nos métodos internacionais, condições para a análise de cada uma destas. Para a vitamina A, a detecção por UV é normalmente usada, mas a detecção de fluorescência também pode ser considerada uma alternativa. Para a vitamina E, a detecção de fluorescência é geralmente preferida à detecção por UV, particularmente quando se utiliza cromatografia de fase normal, proporcionando uma maior sensibilidade e melhor especificidade. Porém, o PDA pode ser utilizado para a determinação simultânea de vitaminas A e E na mesma injeção em múltiplos comprimentos de onda UV. Para a vitamina D, a detecção por UV também é utilizada. No entanto, esta não é totalmente específica e, ocasionalmente, interferências por coeluição podem ocorrer sob os picos de vitamina $D_2$ e $D_3$. Isto é especialmente evidente quando produtos com alto teor de gordura são saponificados incompletamente. A vitamina K1 também pode ser determinada por detecção por UV (PAIXÃO; STAMFORD, 2002; BLAKE, 2007; LEE et al., 2011; AOAC, 2011; AOAC, 2012).

## 3.9 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA EXTRAÇÃO DE VITAMINAS

A preparação da amostra é, na maioria das vezes, mais simples e menos trabalhosa quando a análise é realizada para vitaminas hidrossolúveis - muitas vezes é extração direta com tampões, ácidos diluídos, álcalis diluídos ou suas misturas com solventes orgânicos (JEDLICKA; KLIMES, 2005).

Vitaminas lipossolúveis são frequentemente encapsuladas com surfactantes para aumentar a estabilidade durante a vida de prateleira do produto ou garantir a solubilização em água. Além disso, as partículas encapsuladas tendem a ser distribuídas heterogeneamente por todo o produto, o que pode influenciar negativamente a precisão do procedimento analítico. Especialmente em formulações para nutrição parenteral, onde a concentração de surfactantes na presença de emulsão lipídica é aumentada, este fator pode também dificultar a extração e causar a emulsificação de solventes orgânicos (PAIXAO; STAMFORD, 2002; PAIXÃO; CAMPOS, 2003; PAIXAO; STAMFORD, 2004; BLAKE, 2007; VAZQUEZ et al., 2009a; CHEN et al., 2011).

A determinação de vitaminas lipossolúveis de amostras reais inclui uma etapa de preparação de amostras que é geralmente trabalhosa e demorada. O objetivo das preparações de amostra é extrair os analitos da matriz a ser analisada e concentrá-los, se necessário, de modo a obter uma resposta mensurável (BLANCO; FERNANDEZ; GUTIERREZ, 2000). Os métodos de preparação de amostras mais comumente usados para a análise de vitaminas lipossolúveis, em alimentos e produtos farmacêuticos, incluem a saponificação da amostra, com adição de NaOH ou KOH, e posterior extração das vitaminas da matéria insaponificável ou a extração direta com solventes (extração líquido-líquido), a qual apresenta maior praticidade (CHEN et al., 2011).

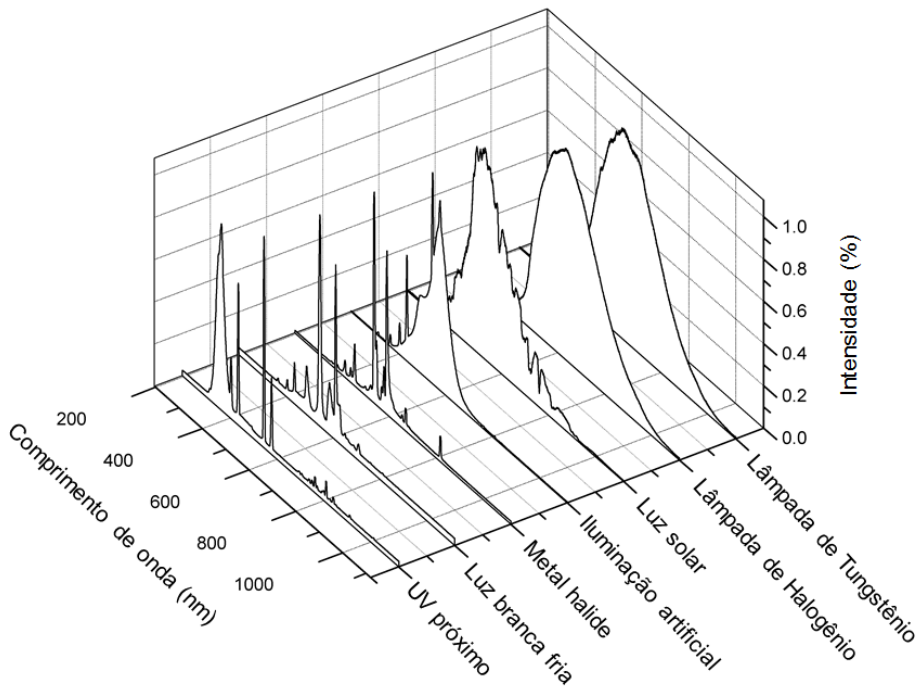
## 3.10 ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia exigidas para o registro sanitário de produtos farmacêuticos. A determinação deste parâmetro fundamenta-se não apenas no cumprimento de exigências legais, mas, também, na preocupação com a saúde pública, uma vez que a instabilidade pode estar relacionada à perda do efeito terapêutico ou à exposição do consumidor aos efeitos tóxicos de produtos de degradação. Vários países publicaram diretrizes para a avaliação da estabilidade farmacêutica. No Brasil, os estudos de estabilidade devem ser conduzidos segundo a Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, publicada na Resolução - RE n.° 01, de 29 de julho de 2005 e atualizada na Consulta Pública n°453, de 28 de dezembro de 2017 (LEITE, 2005; BRASIL, 2005; BRASIL, 2017).

A estabilidade de vitaminas em misturas de NP pode ser influenciada por vários fatores, dentre os quais destacam-se a presença da luz e oxigênio. A fotoestabilidade é um fator preocupante, pois a fotodegradação pode diminuir a oferta das vitaminas para o paciente que recebe o tratamento com NP (MIRTALLO et al., 2004).

A luz pode ter efeitos no princípio ativo de uma formulação tanto durante a manipulação, quanto no produto final ou embalagem. Isto pode ser observado como branqueamento de compostos coloridos ou descoloração de produtos incolores. A luz visível e o UVA são as faixas espectrais mais relevantes, devido à abundância de ambos os tipos na luz do sol e na iluminação interna típica, que são as fontes de luz mais prováveis encontradas por esses produtos fotossensíveis. A Figura 5 mostra curvas de intensidade espectral para luz solar e diferentes lâmpadas. Cada um desses espectros se estende de 300 nm na região ultravioleta até 3000 nm no infravermelho, mas com distribuição de intensidade diferente em cada região (AZEVEDO FILHO; GOMES; SANTOS, 2012).

Figura 5 – Gráficos de distribuição de energia espectral da luz solar e de fontes de luz artificial comumente usadas em iluminação interna.




Fonte: AZEVEDO FILHO; GOMES; SANTOS, 2012.

O prazo de infusão de uma formulação para NP pode ser de até 24 h, deixando-a sujeita a várias horas de exposição à luz artificial. Incubadoras e leitos próximos à janelas podem ser considerados os pontos mais críticos, uma vez que há uma maior intensidade luminosa nestes locais (Figura 6). Porém, há uma diversificação de ambientes onde essas formulações podem ser infundidas, como enfermarias, UTIs ou até mesmo na residência do paciente (*home parenteral nutrition*), variando, assim, as condições às quais elas estão expostas (AZEVEDO FILHO, 2008).

Figura 6 – Localização de uma incubadora próxima à janela na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da UFPE.

Fonte: AZEVEDO FILHO, 2008.

A intensidade da luz do dia é claramente importante e, portanto, as taxas e a quantidade total de degradação variarão com a hora do dia, as condições climáticas e a estação, bem como a proteção contra luz da bolsa e a proximidade da infusão em relação a fontes de luz do dia. As perdas devido à exposição à luz também dependerão de outros fatores físicos (taxa de infusão, comprimento da tubulação de infusão) e variáveis químicas (a composição da mistura de NP, em particular as concentrações de vitaminas). O efeito da emulsão gordurosa também pode ser substancial, uma vez que é geralmente assumido que a opacidade da emulsão diminuirá a exposição das vitaminas diretamente à luz (ALLWOOD; MARTIN, 2000).

Embora a degradação seja atribuída à exposição à radiação UV devido à luz solar direta ou indireta, é difícil determinar a dose correta de radiação (irradiância) que é responsável pela degradação. A mesma situação é observada com fontes de luz artificiais, embora sua contribuição na degradação de vitaminas ainda não esteja bem estabelecida (WATERMAN; ADAMI, 2005).

Assim, a *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) na Diretriz Q1B desde 1996 determina alguns parâmetros para monitorar a degradação por radiação UV em produtos farmacêuticos através de estudos de fotoestabilidade (ICH, 1996).

O teste de fotoestabilidade é realizado através da utilização de câmaras de fotoestabilidade contendo uma fonte de radiação UV com potência de saída conhecida. Nestas, existe o conhecimento da distribuição espectral e de intensidade da fonte de radiação para garantir que uma quantidade precisa de radiação seja homogeneamente distribuída na área da superfície onde o produto será exposto (AZEVEDO FILHO et al., 2011).

Dada a importância da vitamina A no âmbito terapêutico e sua susceptibilidade à fotodegradação, torna-se imprescindível a realização de um estudo que avalie a fotoestabilidade deste composto, simulando uma exposição à condições reais de iluminação hospitalar.

# 4 MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 MATERIAIS DE ESTUDO

Os produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados na presente pesquisa encontram-se listados com suas respectivas especificações na Tabela 2.

Tabela 2 – Produtos utilizados no preparo dos sistemas estudados.

| Componente | Fórmula Química | Concentração | Apresentação | Fabricante |
|---|---|---|---|---|
| **Água estéril para injetáveis** | $H_2O$ | - | Ampola 1000 mL | Fresenius-Kabi Laboratórios Ltda. |
| **Polisorbato 80** | $C_{64}H_{124}O_{26}$ | P.A. | Frasco 1 Kg | Vetec |
| **Manitol** | $C_6H_{14}O_6$ | P.A. | Frasco 500g | CRQ |
| **Palmitato de Retinila (padrão primário)** | $C_{36}H_{60}O_2$ | P.A. | Ampola 1g | Sigma |
| **Palmitato de Retinila (padrão secundário)** | $C_{36}H_{60}O_2$ | P.A. | Frasco 225 g | Galena |
| **Resveratrol* (padrão primário)** | $C_{14}H_{12}O_3$ | P.A. | Frasco 100 mg | Sigma |
| **Resveratrol (padrão secundário)** | $C_{14}H_{12}O_3$ | P.A. | Frasco 100 g | Fagron |
| **Isopropanol** | $C_3H_8O$ | P.A. | Frasco 4 L | Tedia |
| **Metanol** | $CH_3OH$ | Grau HPLC | Frasco 50 L | Vetec |
| **Metanol** | $CH_3OH$ | Grau HPLC | Frasco 1 L | LiChrosolv |
| **Hexano** | $C_6H_{14}$ | P.A. | Frasco 1 L | Merck |
| **Acetato de etila** | $C_4H_8O_2$ | P.A. | Frasco 1 L | Macron |

*O isômero do resveratrol utilizado neste estudo foi o trans-resveratrol desde que o cis-resveratrol não está comercialmente disponível, o qual é obtido por fotoisomerização UV a partir do isômero trans (DEKIĆ et al., 2008).

Os padrões primários e secundários adquiridos foram caracterizados através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Vis e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As Tabelas 3 e 4 descrevem as quantidades de componentes utilizados na preparação das emulsões de Vitamina A, as quais foram utilizadas para o estudo de fotodegradação e análise da ação fotoprotetora do resveratrol. Prepararam-se duas emulsões: uma sem resveratrol (Tabela 3) e outra contendo este composto (Tabela 4). Tanto o palmitato de retinila quanto o resveratrol utilizados nessas preparações foram

os padrões secundários, adquiridos com a finalidade de manipulação. Essas emulsões foram caracterizadas em relação ao pH e tamanho de gotícula.

Tabela 3 – Componentes utilizados na preparação da emulsão de vitamina A sem resveratrol para o experimento de fotodegradação e suas respectivas quantidades.

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| **Manitol** | 7,50 g |
| **Palmitato de Retinila (padrão secundário)** | 0,24 g |
| **Polisorbato 80** | 1,16 mL |
| **Água q.s.p.** | 100 mL |

Tabela 4 – Componentes utilizados na preparação da emulsão de vitamina A com resveratrol para o experimento de fotodegradação e suas respectivas quantidades.

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| **Manitol** | 7,50 g |
| **Palmitato de Retinila (padrão secundário)** | 0,24 g |
| **Resveratrol (padrão secundário)** | 0,10 g |
| **Polisorbato 80** | 1,16 mL |
| **Água q.s.p.** | 100 mL |

## 4.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

A Tabela 5 apresenta as especificações dos equipamentos utilizados nos procedimentos experimentais.

Tabela 5 – Equipamentos utilizados nas análises das preparações estudadas.

| Equipamento | Fabricante | Modelo |
|---|---|---|
| **Agitador vórtex** | Labnet | VC-200 |
| **Balança analítica** | Sartorius | TE2145 |
| **Câmara de fotoestabilidade** | UFPE | BCD1.0 |
| **Centrífuga** | Fanem | Excelsa Baby I 206 |
| **Cromatógrafo líquido** | Shimadzu | Shimadzu Prominence |
| **Cuba ultrassônica** | UNIQUE | Ultrasonic Cleaner |
| **Espectrofotômetro de absorção eletrônica no UV-Visível** | Techno Scientific | Evolution 600 |
| **Espectrômetro RMN** | Varian 300 MHz | Unity Plus 300 |
| **Medidor de tamanho de partículas** | Malvern | Zetasizer Nano ZS90 |
| **pHmetro digital** | Fisher Scientific | AE150 |

## 4.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Uma solução-estoque de vitamina A (Sigma®) de concentração final 480 $\mu g.mL^{-1}$ foi preparada pesando-se 0,0120 g em massa de palmitato de retinila e dissolvendo-a em isopropanol até total dissolução, completando-se o volume para 25 mL com metanol.

Para a obtenção da solução-estoque de resveratrol, pesou-se 0,0020 g do padrão (Sigma®) e dissolveu-se em metanol para um volume final de 50 mL, obtendo-se como concentração final 40 $\mu g.mL^{-1}$.

Após a preparação, ambas as soluções-estoque foram sonicadas e armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração. Essas soluções foram utilizadas para determinação dos parâmetros de adequabilidade cromatográfica e validação e determinação do teor de pureza dos respectivos padrões secundários.

Diluições apropriadas das soluções-estoque foram realizadas para a construção das curvas de calibração para a vitamina A.

Emulsões de vitamina A foram manipuladas em laboratório utilizando-se o padrão secundário de vitamina A e o pré-tratamento para a quantificação do palmitato de retinila presente nessas amostras foi conduzido segundo a metodologia descrita por Blanco e colaboradores (1994) com algumas modificações, sendo o processo de extração melhor descrito no Item 3.6.

Toda a preparação da emulsão foi realizada em um ambiente com pouca luz. A seguinte ordem de adição foi seguida: sob aquecimento e com auxílio de um béquer,

dissolveu-se o manitol em torno de 30 mL de água. Em um outro béquer misturou-se através de agitação manual a vitamina A e o PS80. Após a dissolução completa do manitol, este foi vertido pouco a pouco, e sob constante agitação, na mistura de vitamina A e PS80. Transferiu-se a preparação para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água. Após esta etapa, o balão foi coberto com papel alumínio a fim de protegê-lo da luz (AZEVEDO FILHO, 2008) e mantido a T = 4 -10$^{o}$C.

Para o presente trabalho foi escolhido o surfactante não iônico polisorbato 80 (PS80) o qual apresenta um alto valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo e uma baixa concentração micelar crítica, que favorece a preparação de formulações mais estáveis (DIZAJ, 2013). A quantidade de PS80 utilizada na preparação das emulsões foi estimada de forma a ser suficiente para dissolver a vitamina A, bem como para respeitar os limites de toxicidade descritos no *Handbook of pharmaceutical excipients* (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A solubilidade de retinóides em solventes aquosos é fraca devido a sua baixa polaridade, sofrendo rápida degradação quando são diluídos em meio aquoso (SEMENOVA et al., 2002). Isso desperta uma percepção de que sistemas secos poderiam levar a uma diminuição na degradação da vitamina A quando manipulada em alguma formulação, justificando a aplicação do manitol na preparação das emulsões de vitamina A do presente estudo. O manitol também foi utilizado no preparo das emulsões pois a escolha deste excipiente levou em consideração a possibilidade de ser utilizado para formulações nas quais se deseja obter preparações liofilizadas. Nestas, o manitol é incluído como transportador para produzir uma massa homogênea e rígida que apresenta vantagens na hora da secagem por *spray-drying*, pois aumenta a velocidade desse processo e melhora a aparência do composto liofilizado. Uma forma de manitol apirogênico está disponível especificamente para uso parenteral, sendo uma viável alternativa para futuros testes no desenvolvimento de formulações secas, as quais podem apresentar maior estabilidade frente às formulações líquidas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O mesmo procedimento descrito foi executado para preparação da emulsão com resveratrol, o qual foi adicionado na etapa de mistura da vitamina A com o PS80. Uma vez que o palmitato de retinila usado nessas preparações corresponde a apenas 49,2% do padrão puro, as concentrações das emulsões-estoque foram recalculadas, chegando-se a um valor de 1.180,8 μg.mL$^{-1}$.

A concentração final da vitamina A nas emulsões-estoque com e sem resveratrol foi baseada nos valores descritos na Tabela 1. Considerando que 1 UI de palmitato de retinila equivale à 0,55 µg desta vitamina, um neonato deveria receber em torno de 1200 µg (1,2 mg) de vitamina A por dia. A alta concentração preparada nas emulsões-estoque já visa seu uso em posteriores estudos com as formulações completas de NP.

Após preparadas, as emulsões-estoque foram caracterizadas através das técnicas de espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Vis, tamanho de partículas, potencial zeta e pH. Para a análise através da técnica de espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Vis, realizaram-se espectros das diluições das emulsões. Na análise do tamanho de partícula e potencial zeta, as emulsões foram diluídas numa proporção de 1 para 10 (1 mL da emulsão para 9 mL de água destilada).

Uma solução padrão de trabalho de palmitato de retinila com concentração 9,6 $\mu g.mL^{-1}$ foi obtida por diluição, a partir da solução estoque, e utilizada para realizar os testes de adequabilidade do método. Os principais parâmetros do teste de adequação, incluindo o número de pratos teóricos e fator de assimetria dos picos, foram realizados analisando-se cinco injeções consecutivas da solução padrão de trabalho.

## 4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Os parâmetros de validação foram determinados seguindo as recomendações da ANVISA (2017), compreendendo: identificação, linearidade, intervalo, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade, precisão intermediária e robustez, que são melhor descritos nas próximas seções.

### 4.4.1 Identificação, precisão e exatidão

A identificação foi realizada pela comparação dos sinais obtidos das amostras com os padrões. Para avaliar a precisão metodológica, a varredura espectral para confirmar o $\lambda_{max}$ no DAD foi realizada para o padrão em pelo menos três regiões do pico (início, ponto médio e final). O índice de similaridade e pureza bem como o fator de assimetria dos picos foram avaliados. Para estabelecer o coeficiente de variação

intra-dia e inter-dia (precisão intermediária), repetidas injeções (n = 3) do palmitato de retinila extraídos foram realizadas em um único dia.

### 4.4.2 Limites de detecção e quantificação

A quantificação foi realizada utilizando-se padronização externa. Diluições da solução-estoque de palmitato de retinila padrão Sigma® foram preparadas e utilizadas para construir a curva de calibração, composta por sete pontos injetados em triplicata, com concentração mínima de 0,01 $\mu g.mL^{-1}$ e máxima de 30 $\mu g.mL^{-1}$, valores que se aproximavam das concentrações desta vitamina nas preparações utilizadas no estudo.

O limite de detecção (LD) foi definido como a menor concentração de analito que gera razão sinal-ruído de 3. O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração de analito que resulta em uma razão sinal-ruído de 10.

A concentração da vitamina extraída da preparação foi expressa em µg por mL de amostra.

### 4.4.3 Taxa de recuperação

Para determinar a taxa de recuperação, uma quantidade conhecida da solução padrão de palmitato de retinila (padrão Sigma®) na concentração de 9,6 $\mu g.mL^{-1}$ foi adicionada à emulsão de vitamina A.

As áreas dos picos, e consequentemente as concentrações, das emulsões fortificadas foram comparadas com aquelas geradas pelas emulsões sem a adição de padrão.

As recuperações foram dadas pela equação: TR = (CE – CAm) / CA x 100%, onde: TR é a taxa de recuperação; CE é a concentração encontrada; CAm é a concentração da amostra; e CA é concentração adicionada (RODRIGUEZ et al., 1995).

### 4.4.4 Robustez

Para avaliar-se a robustez do método, utilizaram-se diferentes fabricantes da fase móvel utilizada na corrida cromatográfica. Além do metanol adquirido da Vetec, também adquiriu-se metanol da marca LiChrosolv, ambos em grau HPLC.

A análise foi realizada com injeções repetidas do palmitato extraído das amostras para cada metanol e os picos foram comparados em termos de área, tempo de retenção e fator de assimetria.

## 4.5 METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS SOLVENTES EXTRATORES

Para analisar o perfil de degradação da vitamina A e o efeito fotoprotetor do resveratrol através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, torna-se necessário realizar a extração desta vitamina da emulsão em estudo.

O pré-tratamento para a quantificação do palmitato de retinila nas amostras foi conduzido segundo a metodologia descrita por Blanco e colaboradores (1994) com algumas modificações. Realizou-se uma extração do tipo líquido-líquido e a vitamina A foi extraída da emulsão como descrito: um mililitro de emulsão foi transferido para um tubo de centrifugação e 4 mL de água ultrapura e 2 mL de solução de extração (hexano-acetato de etila 80:20 v/v) foram adicionados. A mistura foi submetida *à* agitação no vórtex durante 30 segundos e centrifugada a 7000 rpm durante 60 minutos. A camada superior foi transferida para um tubo de vidro, evaporada em capela de exaustão, reconstituída com metanol e filtrada em filtro de Teflon 0,20 µm. Uma alíquota de 20 µL da solução foi injetada no cromatógrafo líquido.

Além do hexano e acetato de etila na proporção 80:20 v/v, também foram testadas outras proporções desses solventes: hexano (100%) e hexano-acetato de etila (50:50 v/v).

## 4.6 EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O sistema CLAE utilizado foi um Shimadzu Prominence (Shimadzu, Japão), composto por um modelo de detector de arranjo de diodo (DAD) modelo SPD-20AV, bomba quaternária modelo LC-20 AT, forno da coluna modelo CTO-20AC e injetor automático modelo SIL- 20AC. Todo o sistema foi controlado pelo controlador modelo

CBM-20A e operado com o software LC Solution™ (versão 1.25, Shimadzu, Japão). A eluição da vitamina foi realizada em uma coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5µm.

A fase móvel utilizada para a separação da vitamina A foi o metanol e a corrida foi realizada no modo isocrático. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 $mL.min^{-1}$ com forno da coluna a uma temperatura de 35 °C. O volume da amostra injetado foi de 20 µL. O tempo de corrida foi de 12 minutos. O padrão e amostras foram monitorados em comprimentos de onda entre 200-400 nm.

Foram realizados no espectrômetro UV-Vis espectros de absorção eletrônica da vitamina A, e das emulsões contendo esta vitamina, com o objetivo de avaliar a influência da emulsificação no perfil espectroscópico da vitamina A, bem como confirmar o comprimento de onda adequado para leitura no cromatógrafo.

## 4.7 ESTUDO DE FOTODEGRADAÇÃO DA VITAMINA A E DO EFEITO FOTOPROTETOR DO RESVERATROL

Para o estudo de fotoestabilidade, emulsões de vitamina A preparadas utilizando-se os compostos das Tabelas 3 e 4 foram submetidas à câmara de fotoestabilidade em frascos-ampola de vidro transparentes vedados com papel parafilm incolor. A câmara utilizada neste estudo foi desenvolvida pelo Núcleo de Pesquisas em Nutrição Parenteral/UFPE, de acordo com a opção 2 determinada pela Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos (ICH) e a *Food and Drugs Administration* (FDA) (ICH,1996), os quais são adotados pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017) (AZEVEDO FILHO, 2008).

Esta câmara contém uma lâmpada UV, com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm, e duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (BF), similar à ISO 10977 (1993), como fonte de emissão de luz visível (400-700 nm). Todo o compartimento interno da câmara é forrado com folhas de alumínio, formando uma superfície refletora e garantindo espalhamento contínuo e homogêneo de luz por toda a área de exposição. A distância entre as fontes de irradiação e a superfície de exposição, onde se encontram as amostras, é de 15 cm (AZEVEDO FILHO, 2008).

Para a determinação do tempo de exposição das amostras, foi realizado um estudo por Azevedo Filho (2008) que coletou medidas de irradiância e iluminância no berçário e UTI neonatal do HC/UFPE, calculando-se o tempo de exposição na câmara que equivale ao tempo de administração das formulações nos pontos de maior intensidade de luz nesses ambientes. Considerando que as infusões são administradas em um tempo total de 10 h, obteve-se para a fonte de radiação UV um tempo de exposição de 15 min, e, para as lâmpadas BF, 90 min de exposição. Assim, uma hora de exposição à radiação no berçário e UTI neonatal equivale à 1,5 min na radiação UV e 15 min de exposição à luz visível na câmara de fotoestabilidade (AZEVEDO FILHO, 2008).

No presente estudo, as emulsões de vitamina A com e sem resveratrol foram submetidas a ambas as radiações UV e visível. Foram colocadas alíquotas de 10 mL de amostras das emulsões na região central da câmara em frascos de vidro vedados (Figura 7). Primeiramente realizou-se uma diluição das emulsões-estoque em frasco-ampolas, nos quais adicionou-se 0,5 mL da emulsão e 9,5 mL de água estéril para injetáveis, atingindo-se uma concentração de 59 $\mu g.mL^{-1}$ de palmitato de retinila.

Para a fotodegradação sob radiação UV, frascos teste e controle, os quais foram cobertos com papel alumínio para impedir a fotodegradação e servir como referência comparativa para os frascos de teste, foram submetidos à câmara e retirados para análise nos tempos 5, 10 e 15 minutos. Já para fotodegradação por exposição à luz visível, os frascos teste e controle submetidos à câmara foram retirados para análise em 30, 60 e 90 minutos.

Os estudos que envolvem a quantificação do palmitato de retinila (Vitamina A) foram realizados através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que ocorreu posteriormente à extração da vitamina da emulsão.

A partir da curva padrão da vitamina A determinada anteriormente, foi observado o perfil de cinética de fotodegradação desta vitamina quando extraída das emulsões, na presença e ausência do resveratrol, o qual foi, assim, avaliado quanto ao seu potencial fotoprotetor.

Figura 7 – Exposição das emulsões de vitamina A na câmara de fotoestabilidade.

Fonte: Autoria própria.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

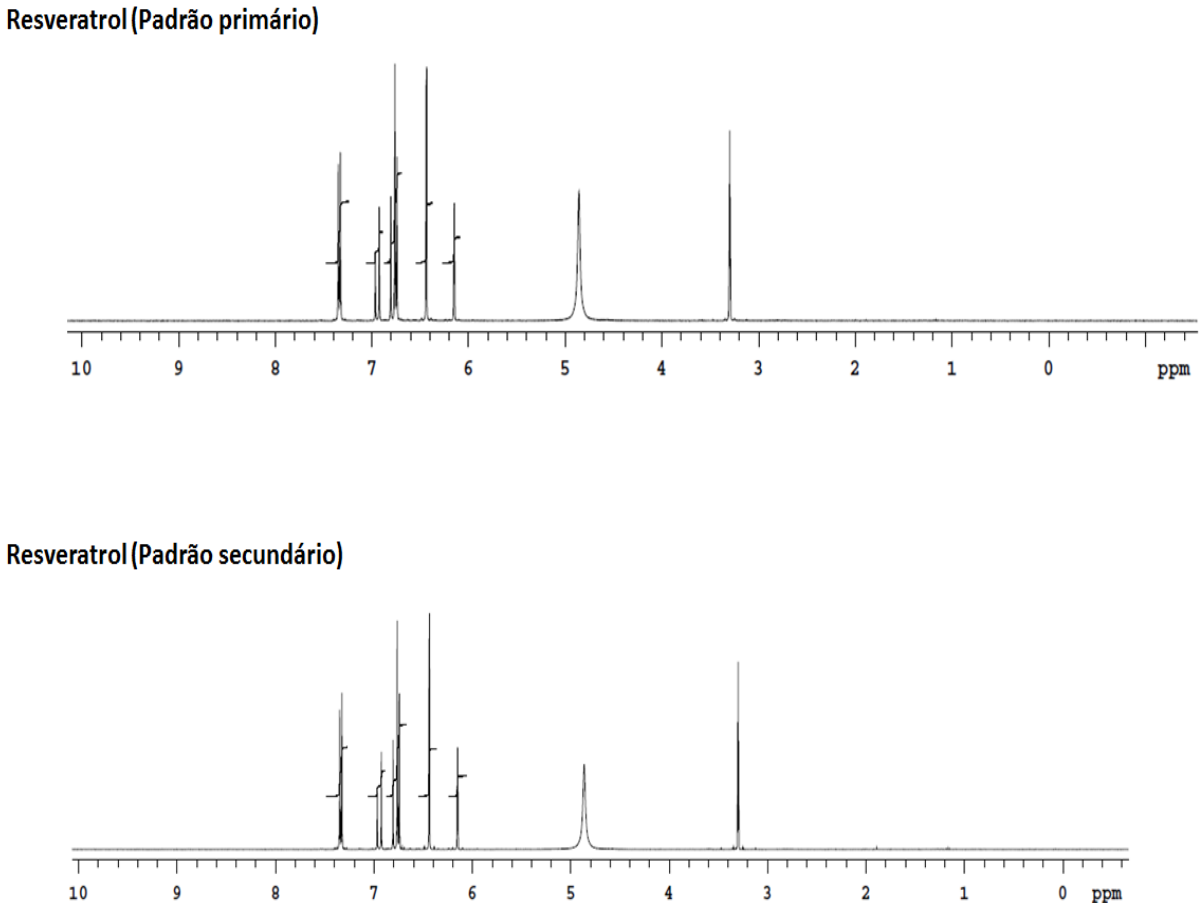
## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA VITAMINA A E DO RESVERATROL

### 5.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os padrões de *trans*-resveratrol e palmitato de retinila adquiridos da Sigma® foram comparados, através dos espectros de RMN de $^{1}H$, com seus respectivos padrões secundários. Como pode ser observado nas Figuras 8 e 9, os perfis espectrais para ambos os padrões de resveratrol são muito semelhantes, enquanto que para os espectros de palmitato de retinila, podem ser notadas diferenças que sugerem a presença de impurezas no padrão secundário.

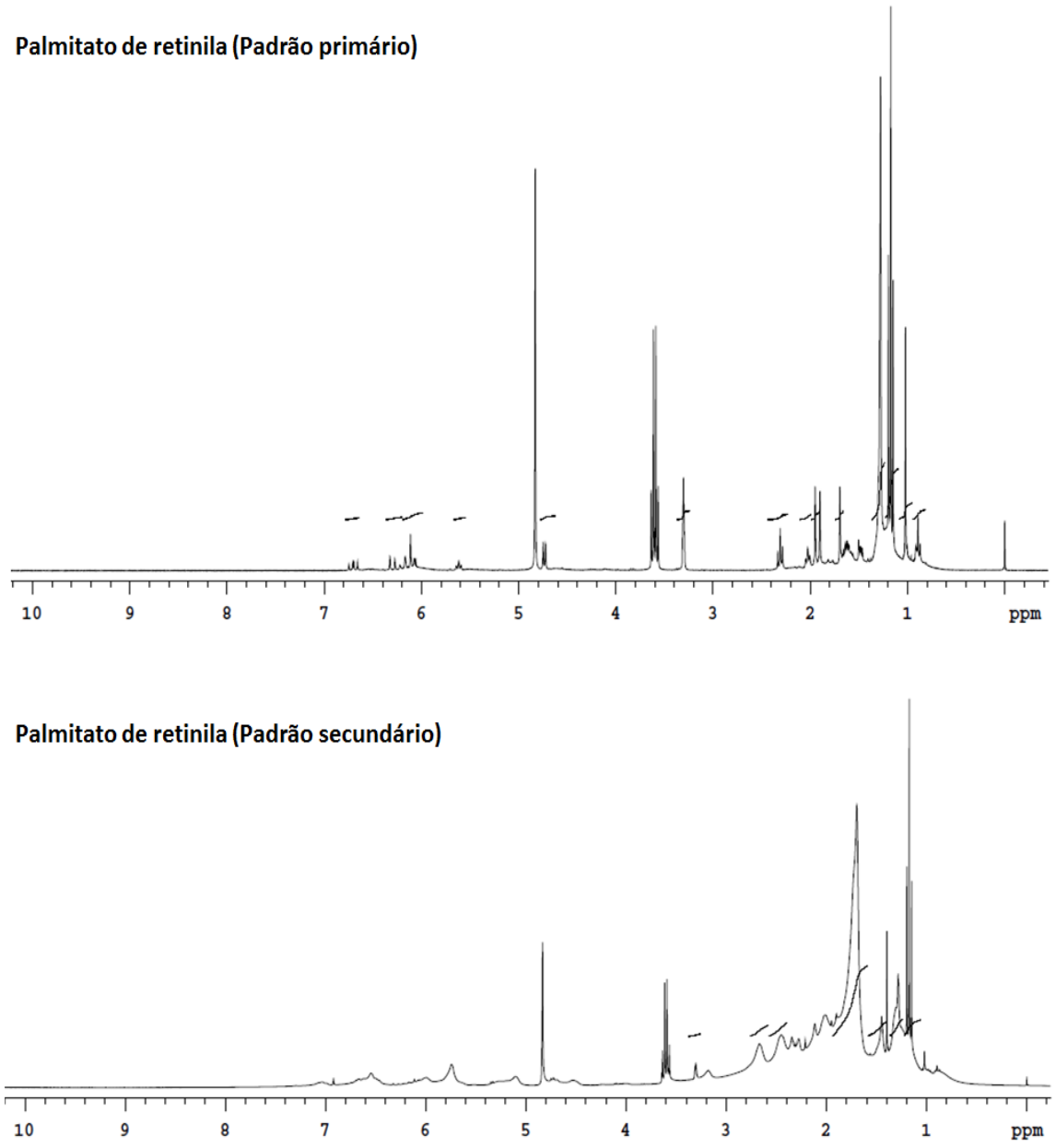
Os espectros de RMN dos padrões primários tanto do *trans*-resveratrol quanto do palmitato de retinila foram analisados para correlação com a estrutura de suas respectivas moléculas (Figuras 8 e 9, respectivamente).

Figura 8 – Espectros de RMN dos padrões primários e secundários do resveratrol utilizados no presente estudo.




Fonte: Autoria própria.

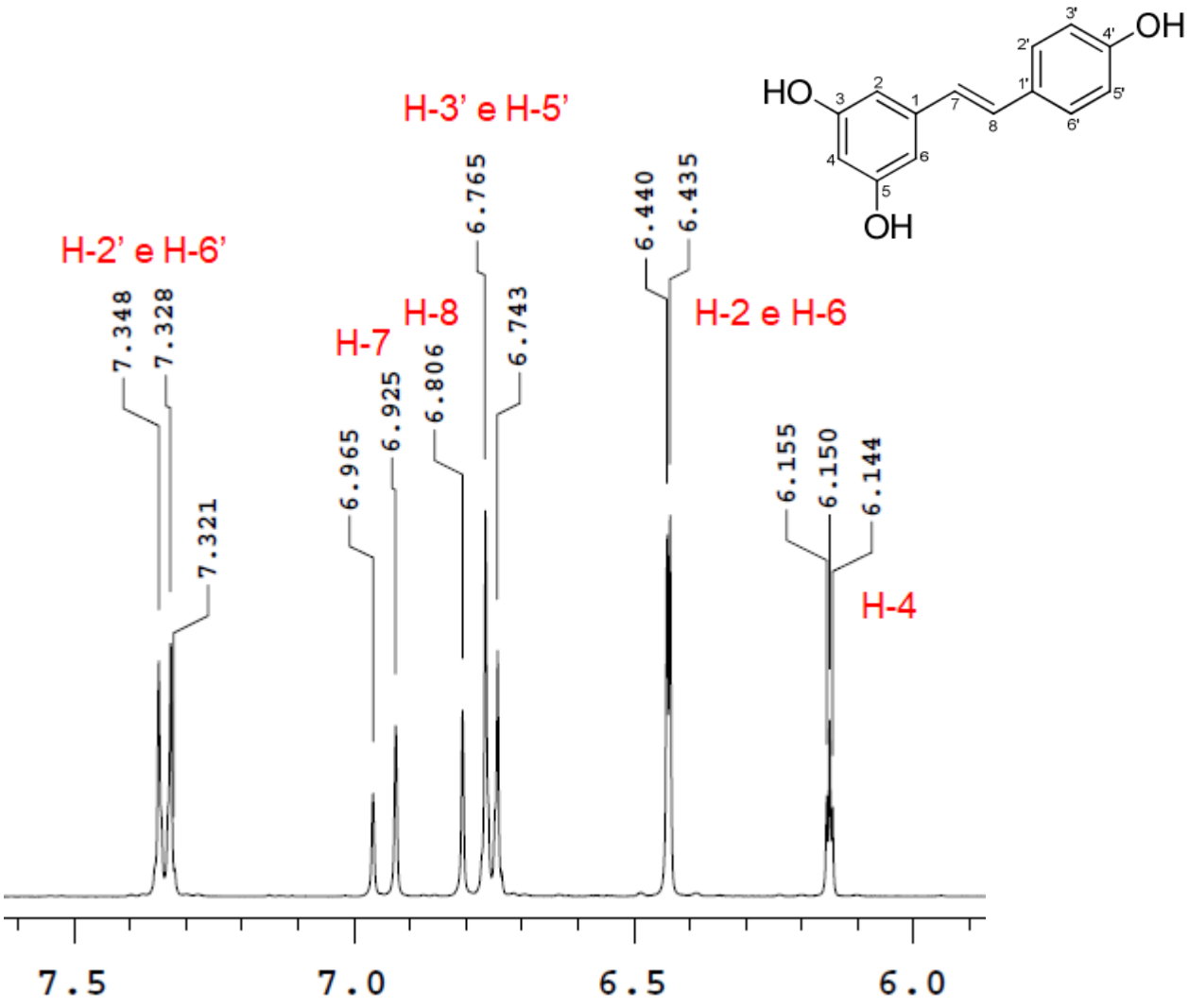
Figura 9 – Espectros de RMN dos padrões primários e secundários do palmitato de retinila utilizados no presente estudo.




Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN de $^{1}H$ do *trans*-resveratrol (Fig. 10) indicou a presença de sete hidrogênios ligados a carbonos aromáticos: dois dubletos em δH 6,76 e δH 7,32 e dois singletos em δH 6,43 e δH 6,15. Sinais característicos dos hidrogênios ligados ao grupamento olefina C=C foram detectados como singletos em δH 6,80 e δH 6,92. Estes dados estão de acordo com os da literatura (COMMODARI et al., 2005; DEKIC et al., 2008; LEE et al., 2010; MISCHIATTI, 2012).

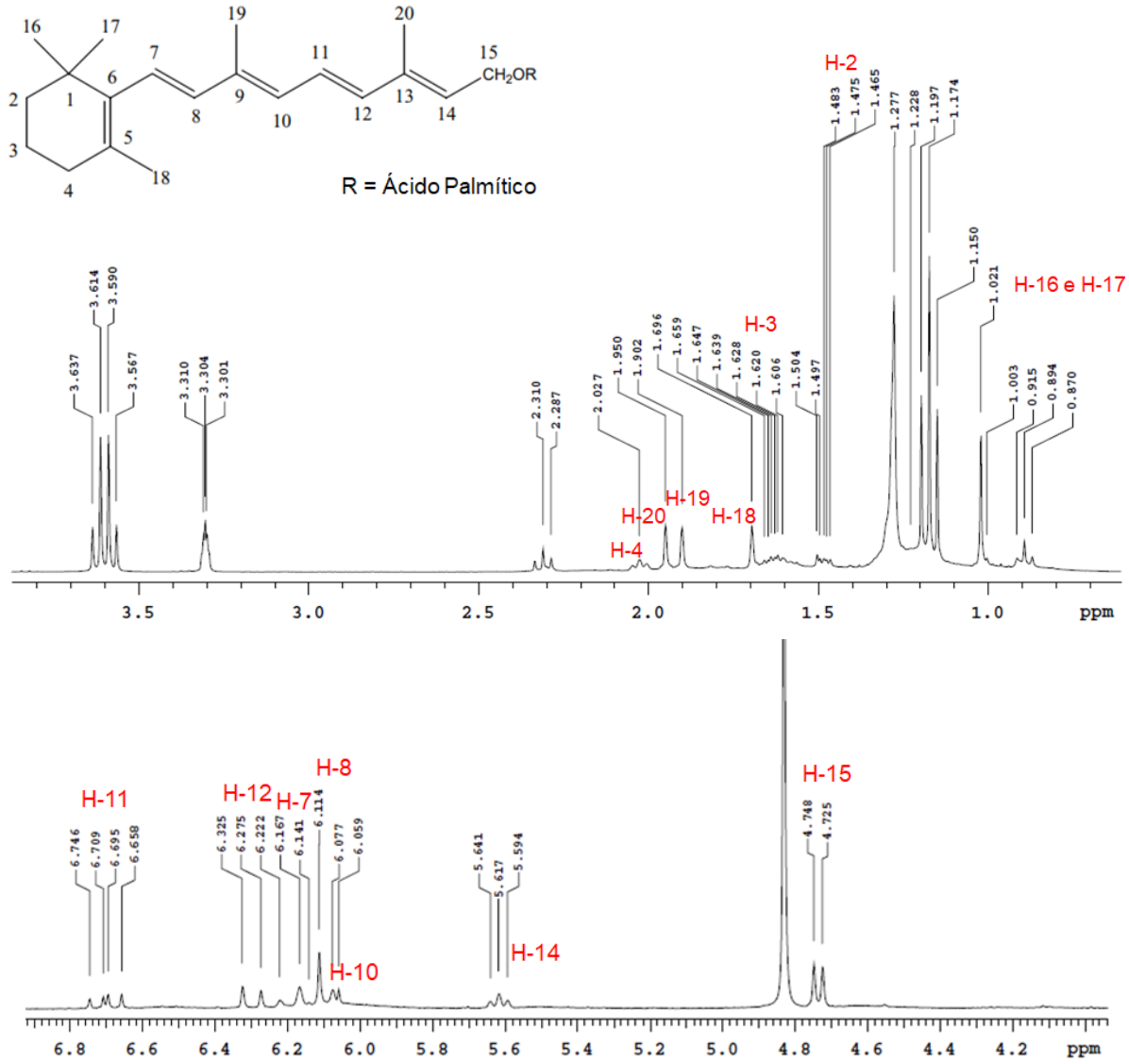
Figura 10 – Correlação do espectro de $^{1}H$ RMN do *trans*-resveratrol, utilizado no presente estudo, com a estrutura da molécula.




Expansão da região entre 6.0 e 7.5 ppm. Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN de $^{1}H$ do palmitato de retinila (Fig. 11) mostra os sinais gerados por cinco grupos metilo em δH 1,02 (H-16 e H-17), δH 1,69 (H-18), δH 1,90 (H-19) e δH 1,95 (H-20), seis prótons metílicos em δH 1,46 (H-2), δH 1,62 (H-3), δH 2,02 (H-4), seis prótons olefínicos em δH 5,61 (H-14), δH 6,07 (H-10), δH 6,11 (H-8), δH 6,14 (H- 7), δH 6,27 (H-12) e δH 6,65 (H-11) e dois prótons metilênicos ligados ao oxigênio em δH 4,72 (H-15). Estes dados estão de acordo com os reportados da literatura (CHOI et al., 2004).

Figura 11 – Correlação do espectro de $^{1}H$ RMN do palmitato de retinila, utilizado no presente estudo, com a estrutura da molécula.

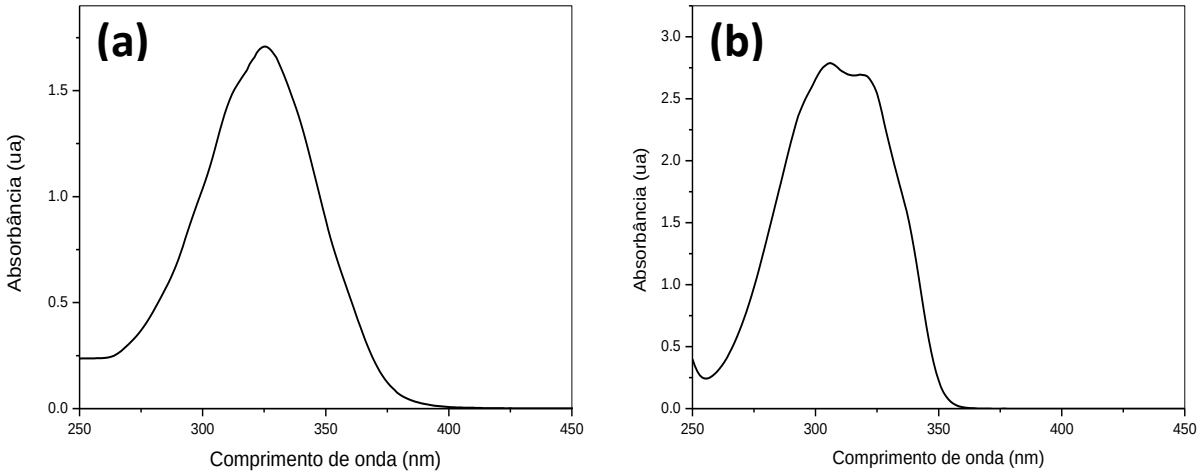



Fonte: Autoria própria.

### 5.1.2 Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Vis

Realizou-se uma análise do perfil espectral dos padrões primários de palmitato de retinol e resveratrol, como pode ser visto na Figura 12. Esta análise teve como objetivo determinar o comprimento de onda ideal destes padrões para leitura nos cromatogramas dos picos posteriormente extraídos das amostras, bem como para análise qualitativa de pureza.

Figura 12 – Espectros de absorção eletrônica dos padrões primários do palmitato de retinila 24 $\mu g.mL^{-1}$ (a) e do resveratrol 9 $\mu g.mL^{-1}$ (b) em metanol.




Fonte: Autoria própria.

Como pode ser visto nos espectros, ambos compostos absorvem na região do ultravioleta estando em conformidade com os perfis espectrais descritos na literatura (KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ et al., 2004; FU et al., 2007; ZUPANČIČ; LAVRIČ; KRISTL, 2015). O comprimento de onda escolhidos para detecção do palmitato de retinila e resveratrol foram $\lambda$ = 326 nm e 305 nm, respectivamente.

### 5.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

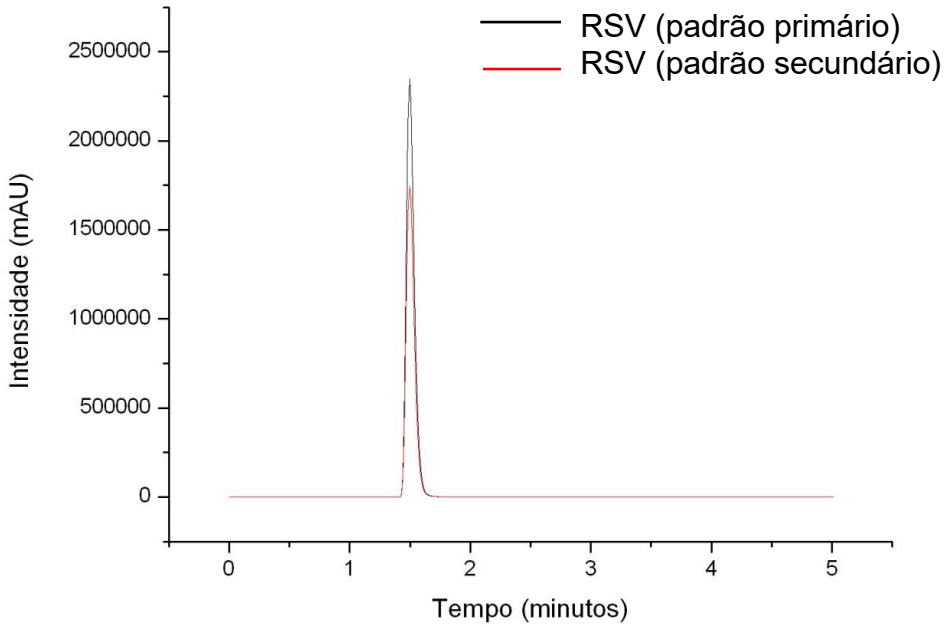
Para comprovar que o resveratrol e a vitamina A adquiridos para a preparação das emulsões de fato correspondem aos seus respectivos padrões primários adquiridos da Sigma®, realizou-se uma comparação do perfil espectral e dos tempos de retenção, que permitiram a confirmação da identidade dos padrões secundários. Os padrões foram comparados em termos de índice de similaridade e pureza.

A Figura 13 representa um cromatograma que compara o resveratrol adquirido para manipulação e o padrão Sigma®, ambos na concentração de 40 $\mu g.mL^{-1}$. A Figura 14 fez a mesma comparação, mas com o palmitato de retinila, ambos à 15 $\mu g.mL^{-1}$.

Como pode ser visto nos cromatogramas, houve uma diminuição na intensidade do pico dos padrões secundários. A injeção dos padrões no cromatógrafo foi realizada em triplicata e as áreas dos picos foram comparadas.

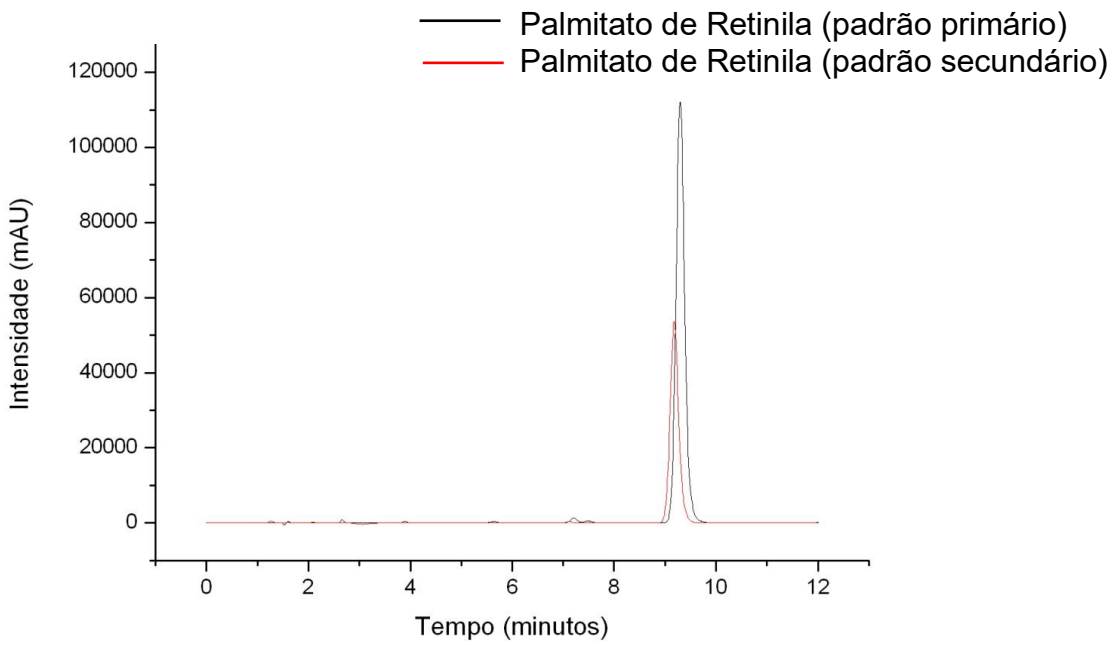
Os resultados demonstram que o resveratrol adquirido para manipulação corresponde a 76,7% do padrão de resveratrol Sigma®, e do mesmo modo, o palmitato de retinila a 49,2%. Esses dados foram importantes para a correção na concentração das emulsões-estoque de vitamina A, uma vez que a quantificação dos picos extraídos das amostras, que correspondem ao palmitato de retinila de manipulação, foi realizada a partir da curva de calibração construída com o padrão Sigma®.

Figura 13 – Perfil cromatográfico do resveratrol padrão primário (Sigma®) e padrão secundário.




O tempo de retenção para o resveratrol foi de 1,5 minutos. A análise foi realizada em coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, 5µm, fluxo de 1 mL/min a 35ºC, com fase móvel metanol em modo isocrático. Comprimento de onda: 305 nm. Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Perfil cromatográfico do palmitato de retinila padrão primário (Sigma®) e padrão secundário.

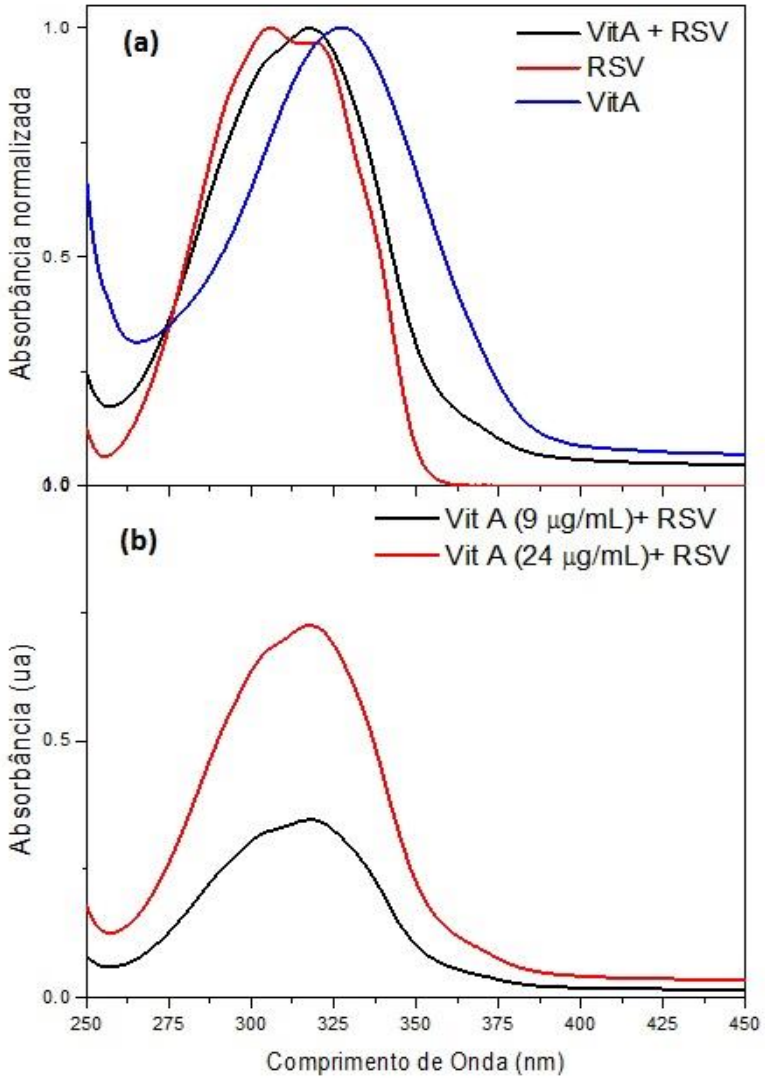



O tempo de retenção para o palmitato de retinila foi de 9,2 minutos. A análise foi realizada em coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, 5µm, fluxo de 1 mL/min a 35ºC, com fase móvel metanol em modo isocrático. Comprimento de onda: 326 nm. Fonte: Autoria própria.

## 5.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES DE VITAMINA A

A formulação da emulsão de vitamina A preparada no presente estudo está descrita na Tabela 4. Os espectros de absorção eletrônica de diluições a partir das emulsões estoque de vitamina A com e sem resveratrol foram realizados com o objetivo de detectar esta vitamina nas preparações (Figura 15).

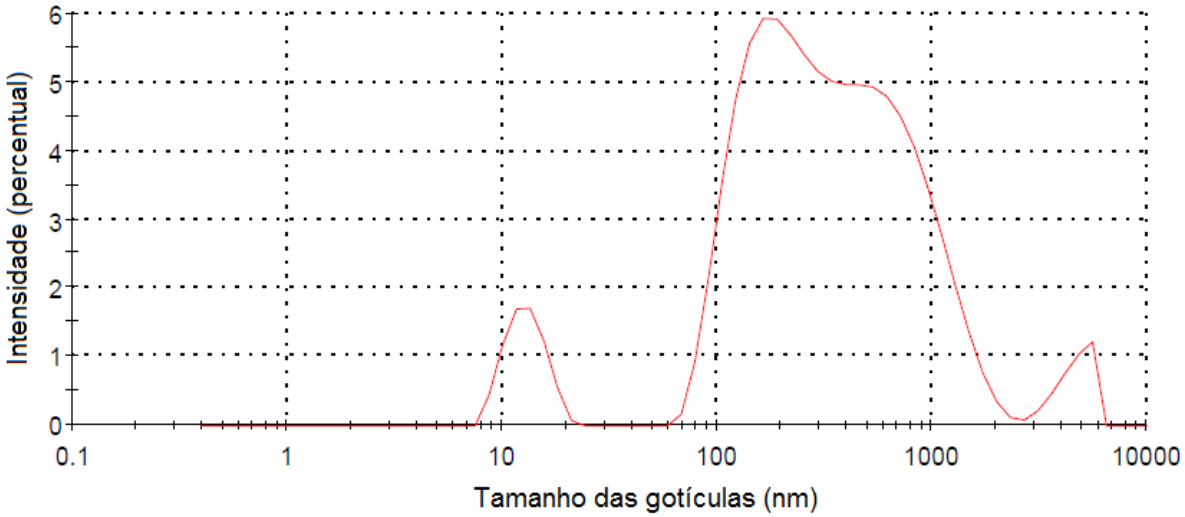
Figura 15 – Espectros de absorção eletrônica representativo das emulsões preparadas neste estudo; (a) espectro normalizado de emulsão de vitamina A (palmitato de retinila), emulsão de RSV e emulsão contendo ambos ativos; (b) emulsão contendo duas proporções de Vit A preparadas com RSV.




Fonte: Autoria própria.

Na análise de tamanho de partículas da emulsão sem resveratrol (Figura 16) observou-se uma distribuição bimodal, na qual 90% das gotículas apresentaram tamanho médio de 446 nm (d = 446 ± 372 nm) e 7% com 13 nm (d = 13 ± 2,7 nm). Para os 3% restantes, pressupõe-se que sejam partículas dispersas oriundas de impurezas advindas do preparo.

Figura 16 – Distribuição dos tamanhos das gotículas da emulsão de vitamina A sem resveratrol obtidas através da técnica DLS.

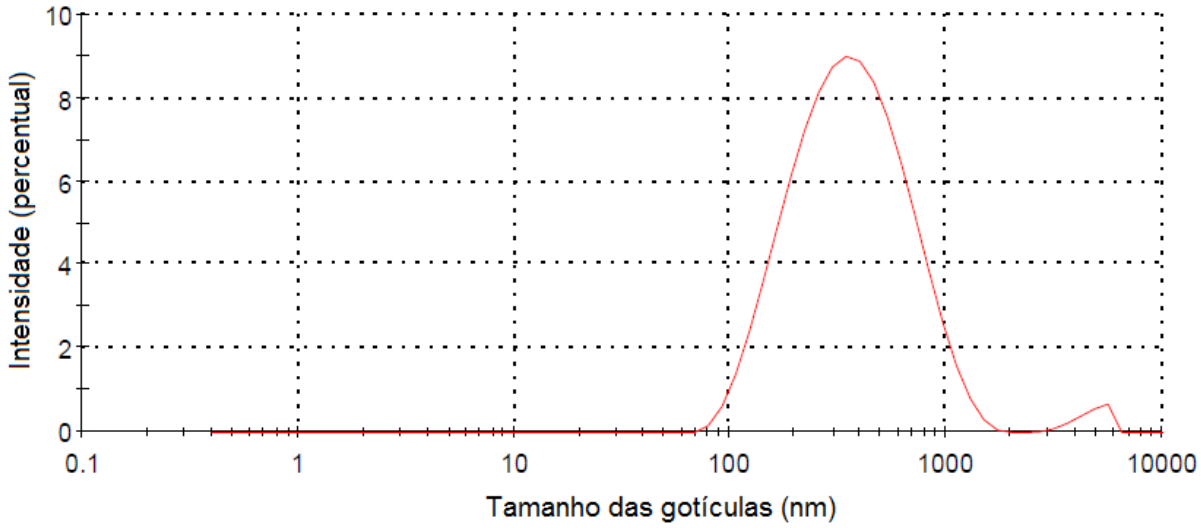



Medidas obtidas por espalhamento dinâmico de luz, em relação à intensidade. PDI = 0,548. Fonte: Autoria própria.

Já na emulsão com resveratrol (Figura 17), observou-se uma distribuição mais uniforme, na qual 98% das gotículas apresentam tamanho médio de 412 nm (d = 412 ± 248 nm), sendo os 2% restantes também atribuídos à impurezas. Os valores da polidispersão das emulsões (PDI) sem e com resveratrol foram de 0,548 e 0,426, respectivamente. Para aplicação em formulações endovenosas, o tamanho e a dispersão de tamanho dos glóbulos lipídicos na emulsão é o aspecto mais importante do ponto de vista clínico, porque isso está relacionado à segurança final da formulação em relação à embolia pulmonar. Um tamanho de gotícula de diâmetro em torno de 5 µm representa o tamanho mínimo de uma gotícula lipídica capaz de obstruir os menores capilares pulmonares após a infusão em uma grande veia central (BOULLATA et al, 2014). A dimensão observada para as gotículas emulsionadas tanto

de vitamina A quanto de vitamina A com RSV apresentam-se na faixa de segurança para uso parenteral.

Figura 17 – Distribuição dos tamanhos das gotículas da emulsão de vitamina A com resveratrol em relação à intensidade obtidas através da técnica DLS.




Medidas obtidas por espalhamento dinâmico de luz, em relação à intensidade. PDI = 0,426. Fonte: Autoria própria.

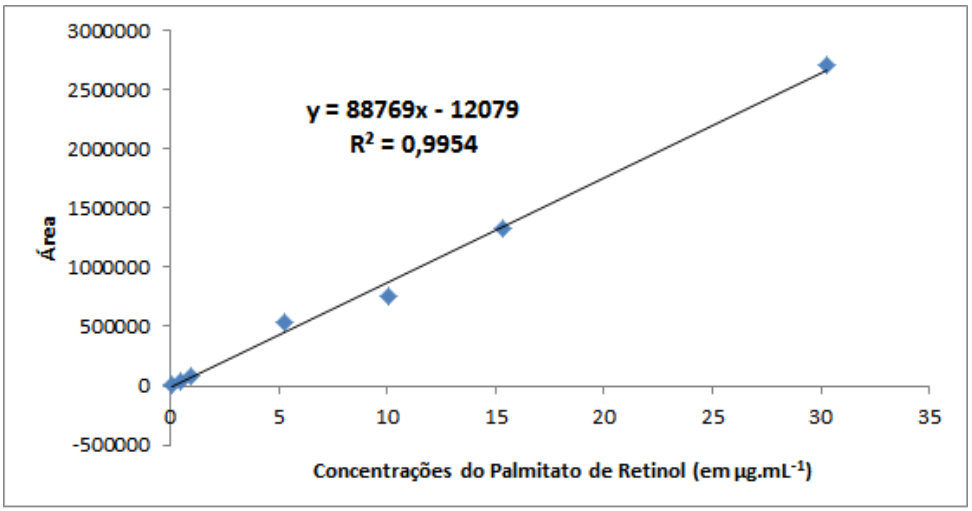
O potencial zeta das emulsões também foi analisado. Os valores observados para a emulsão de vitamina A sem resveratrol foi de ζ = -25,5 mV e para aquela com este composto de ζ = -26,6 mV. Pode-se considerar, através destes resultados, que existe uma considerável repulsão entre as gotículas da emulsão, o que confere uma boa estabilidade coloidal à esta. O valor do pH das emulsões foi de 7,0.

## 5.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VITAMINA A E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Uma vez caracterizadas as emulsões de vitamina A, determinou-se a região de trabalho para a construção da curva de calibração. O padrão de palmitato de retinila adquirido da Sigma® foi diluído em isopropanol (em quantidade suficiente para diluição) e as soluções tiveram seu volume final completados com metanol, em concentrações que variaram de 0,01 $\mu g.mL^{-1}$ à 30 $\mu g.mL^{-1}$.

A técnica utilizada para a construção da curva analítica, ilustrada na Figura 18, foi a de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, na qual as diluições da vitamina A foram injetadas e correlacionadas às suas respectivas áreas dos picos. A curva foi construída com a finalidade de se obter a equação da reta que permite quantificar os picos de vitamina A que foram posteriormente extraídos das amostras.

Figura 18 – Curva de calibração e regressão linear obtida neste estudo para a vitamina A.




A Tabela 6 apresenta os parâmetros da curva de calibração como parte da validação intermediária do método. Como pode ser observado, foi obtida linearidade de $R^2$ = 0,9954 no intervalo de concentração de trabalho.

Tabela 6 – Parâmetros da regressão linear obtidos da curva de calibração da vitamina A.

| PARÂMETROS | VALORES |
|---|---|
| Intervalo | 0,01 – 30 µg/mL |
| Coeficiente angular | 88769 |
| Coeficiente linear | 12079 |
| Coeficiente de determinação | 0,9954 |
| LD | 0,76 µg/mL |
| LQ | 2,30 µg/mL |

Repetibilidade e precisão intermediária foram determinadas pelas medidas em triplicata do palmitato de retinila extraídos das amostras de emulsão de vitamina A, para dois dias no mesmo nível de concentração, conforme pode ser observado na Tabela 7. Para a realização deste estudo, a emulsão-estoque foi diluída para uma concentração de 15 $\mu g.mL^{-1}$, em ambos os dias. Os coeficientes de variação obtidos foram de CV(%) = 0,40% para o primeiro dia e CV(%) = 0,57% para o segundo dia. Esses valores mostram que o método foi preciso e apresentou significativa repetibilidade, uma vez que o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas nas mesmas condições apresentou coeficientes de variações abaixo de 1% em ambos os dias.

Tabela 7 – Valores de quantificação das amostras de emulsão de vitamina A (em $\mu g.mL^{-1}$) em dois dias consecutivos.

| | **DIA 1** | **DIA 2** |
|---|---|---|
| | 13,36 | 13,07 |
| | 13,38 | 13,09 |
| | 13,46 | 12,94 |
| Média | 13,40 | 13,03 |
| Desvio Padrão | 0,05 | 0,07 |
| Coeficiente de Variação (%) | 0,40 | 0,57 |

Os parâmetros cromatográficos monitorados para o palmitato de retinila são mostrados na Tabela 8. Os resultados representam uma média de 5 injeções da solução padrão numa concentração de 9,6 $\mu g.mL^{-1}$.

Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos do palmitato de retinila.

| **PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS** | **VALORES** |
|---|---|
| Tempo de retenção (minutos) | 9,2 |
| Número de pratos teóricos | 13284 |
| Altura do prato teórico (mm) | 0,0113 |
| Fator de Assimetria | 1,1 |

A robustez do método cromatográfico foi avaliada através da análise em triplicata do palmitato de retinila extraído das amostras de emulsão de vitamina A. Para este estudo, utilizou-se a fase móvel, metanol, de dois fabricantes diferentes: Vetec® e LiChrosolv®. Os picos foram comparados em relação ao tempo de retenção, número de pratos teóricos, altura do prato teórico e fator de assimetria, como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9 – Robustez do método cromatográfico.

| PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS | METANOL VETEC® | METANOL LICHROSOLV® |
|---|---|---|
| Tempo de retenção (minutos) | 10,6 | 9,1 |
| Fator de Assimetria | 1,1 | 1,1 |

## 5.4 ANÁLISE DO SOLVENTE EXTRATOR E TAXA DE RECUPERAÇÃO

A metodologia de extração executada teve alguns de seus parâmetros testados, como mudanças no tempo de centrifugação e os tipos e proporções dos solventes de extração. Dentre as velocidades de centrifugação testadas, 7000 rpm foi a que permitiu uma melhor separação da porção orgânica, e, portanto, uma maior recuperação da vitamina A extraída da emulsão.

Além do hexano e acetato de etila na proporção 80:20 v/v, também foram testadas outras proporções desses solventes: hexano (100%) e hexano-acetato de etila (50:50 v/v). O hexano representa um bom solvente extrator devido ao seu elevado ponto de ebulição (69 ºC), o que não permite uma rápida evaporação durante a coleta da camada orgânica, e também devido ao seu momento dipolar igual a 0, que consegue separar a fase orgânica da aquosa por sua elevada apolaridade. O acetato de etila, por sua vez, tem um ainda mais elevado ponto de ebulição (77 ºC) (SMALLWOOD, 1996). Dentre as proporções testadas, hexano e acetato de etila na proporção 80:20 v/v foi a que permitiu a maior taxa de recuperação na metodologia empregada.

A análise da taxa de recuperação foi realizada em triplicata, na qual uma emulsão de vitamina A diluída passou pelo processo de extração descrito e, simultaneamente, em outra emulsão, foi adicionada uma quantidade conhecida de

vitamina A (9,6 μg.mL$^{-1}$), a qual também passou pelo processo de extração. As áreas dos picos, e consequentemente as concentrações, das emulsões fortificadas foram comparadas com as áreas dos picos das emulsões sem a adição de padrão. Os dados (Tabela 10) mostraram que este método consegue recuperar por volta de 98,6% da vitamina A que está presente na preparação.

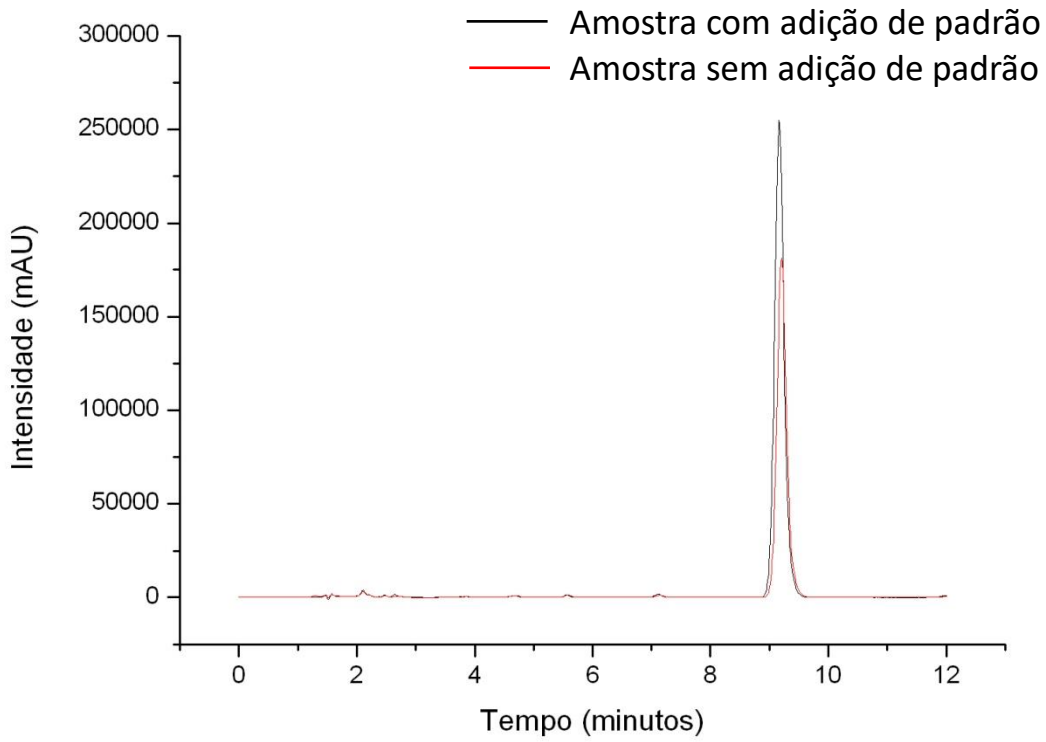
As recuperações foram estimadas pela equação: TR = (CE – CAm) / CA x 100%, onde: TR é a taxa de recuperação; CE é a concentração encontrada; CAm é a concentração da amostra; e CA é concentração adicionada (RODRIGUEZ et al., 1995).

A Figura 19 sobrepõe um cromatograma mostrando o pico da vitamina A extraído de uma amostra não adicionada de padrão e uma amostra que passou pelo processo de adição de padrão, para o cálculo da taxa de recuperação.

Tabela 10 – Taxa de recuperação.

| **AMOSTRA** | **CONCENTRAÇÃO (μg.mL$^{-1}$)** | **DESVIO PADRÃO** | **COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)** |
|---|---|---|---|
| Sem adição de padrão | 24,65 | 0,97 | 3,96 |
| Com adição de padrão | 34,12 | 0,85 | 2,50 |

Figura 19 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostra com e sem a adição de padrão.




Comparação dos picos de palmitato de retinila sem a adição de padrão e com a adição, onde pode ser notado um aumento na intensidade do pico. A análise foi realizada em coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, 5µm, fluxo de 1 mL/min a 35ºC, com fase móvel metanol em modo isocrático. Fonte: Autoria própria.

## 5.5 ESTUDO DA AÇÃO FOTOPROTETORA DO RESVERATROL EM EMULSÕES DE VITAMINA A

Objetivando-se analisar a ação fotoprotetora do resveratrol sobre a vitamina A, as emulsões diluídas de vitamina A com e sem resveratrol foram submetidas às radiações UV e visível.

### 5.5.1 Análise da ação fotoprotetora do resveratrol sobre a vitamina A em preparações submetidas à radiação UV

Na exposição à radiação UV, frascos teste e controle (frascos cobertos com papel alumínio) foram submetidos à câmara. Os testes e controles foram retirados a cada 5 min, representando, assim, análises dos tempos 5, 10 e 15 min de exposição à câmara. Após a exposição, procedeu-se com a extração da vitamina A destas

amostras, injetando-se o material extraído no cromatógrafo líquido para a análise dos picos fornecidos pelo cromatograma. O estudo foi realizado em triplicata.

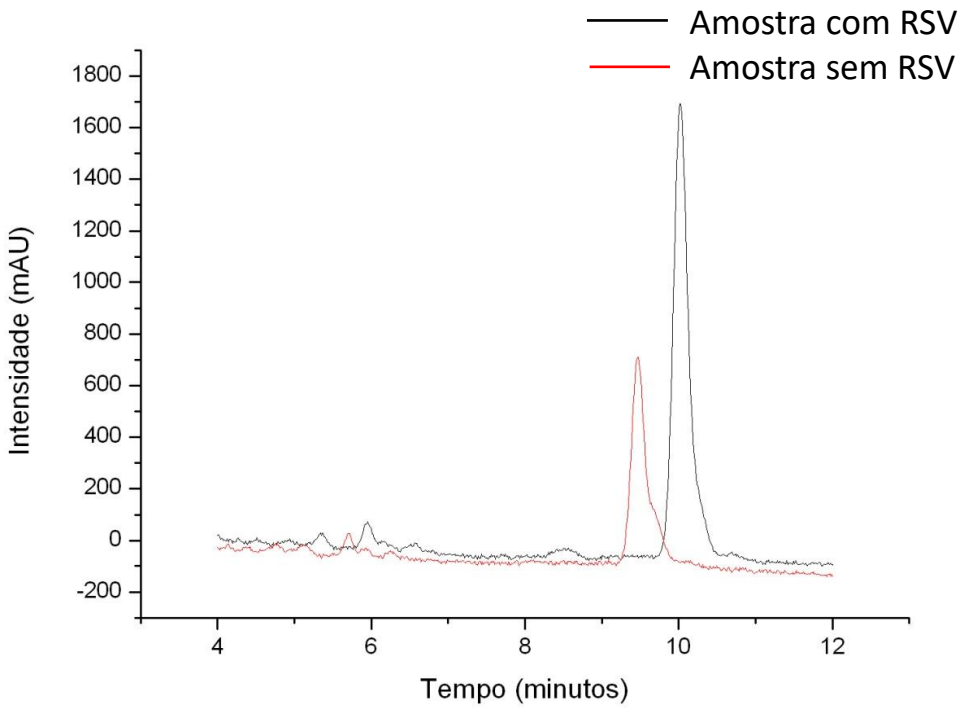
As áreas dos picos da vitamina A extraída das amostras fotodegradadas foram comparadas para ambos os tipos de emulsão (com e sem resveratrol). Para exemplificar, a Figura 20 representa um cromatograma com um pico de vitamina A referente a uma emulsão sem resveratrol com 15 min de exposição à câmara (radiação UV) sobreposto à um pico desta vitamina extraído da emulsão com resveratrol, com o mesmo tempo de exposição. A pureza de todos os picos do palmitato de retinila extraído foi de 99,99%. Desde que o pico do resveratrol após irradiação não apresentou pureza detectável, este não foi quantificado depois de extraído das amostras.

Considerando que as análises das emulsões com e sem o resveratrol não foram realizadas no mesmo dia, é esperada a possibilidade de uma pequena variação no tempo de retenção, a qual nada influencia na identificação da vitamina A, que, através da ferramenta de similaridade espectral fornecida pela técnica de CLAE, demonstrou possuir 99,99% de similaridade com o padrão em ambos os cromatogramas.

A quantificação da Vitamina A foi realizada a partir do padrão externo, por comparação das áreas dos picos de interesse extraídos da amostra com aquelas relacionadas às concentrações conhecidas na curva de calibração.

As concentrações, os desvios padrões relativos e o fator de assimetria dos picos, tanto das amostras controle, quanto das amostras teste dessa análise encontram-se na Tabela 11.

Figura 20 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostras com e sem resveratrol expostas à radiação UV.




Comparação dos picos de palmitato de retinila das amostras com e sem resveratrol (degradação de 15 minutos sob radiação UV), onde pode ser notada uma diminuição na intensidade do pico na amostra sem o resveratrol. A análise foi realizada em coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, 5µm, fluxo de 1 mL/min a 35ºC, com fase móvel metanol em modo isocrático. Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 – Análise dos picos referentes à vitamina A extraída das amostras submetidas à radiação UV.

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO ($\mu g.mL^{-1}$) | DESVIO PADRÃO | COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%) | RETENÇÃO (minutos) | FATOR DE ASSIMETRIA |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **AMOSTRAS SEM RESVERATROL** | | |
| **C-5** | 18,59 | 2,17 | 11,65 | 9,5 | 1,1 |
| **C-10** | 17,30 | 2,20 | 12,73 | 9,5 | 1,1 |
| **C-15** | 16,26 | 1,37 | 8,43 | 9,5 | 1,1 |
| **F-5** | 0,59 | 0,15 | 24,41 | 9,5 | 1,2 |
| **F-10** | 0,36 | 0,02 | 4,41 | 9,5 | 1,2 |
| **F-15** | 0,28 | 0,01 | 4,58 | 9,5 | 1,2 |
| | | | **AMOSTRAS COM RESVERATROL** | | |
| **C-5** | 22,96 | 1,46 | 6,38 | 10,0 | 1,1 |
| **C-10** | 21,87 | 0,60 | 2,74 | 10,0 | 1,1 |
| **C-15** | 20,36 | 1,14 | 5,59 | 10,0 | 1,1 |
| **F-5** | 0,86 | 0,04 | 4,58 | 10,0 | 1,3 |
| **F-10** | 0,54 | 0,01 | 1,08 | 10,0 | 1,3 |
| **F-15** | 0,40 | 0,02 | 5,25 | 10,0 | 1,3 |

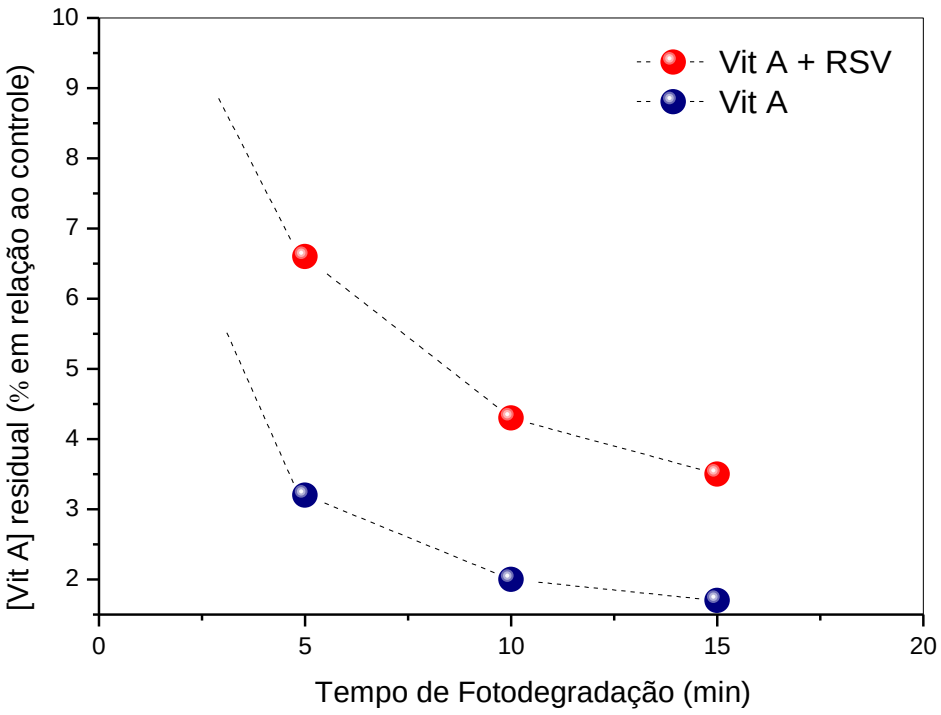
*C: amostras controle; F: amostras expostas à radiação

As áreas dos picos da vitamina A extraídas das amostras fotodegradadas foram comparadas com seus respectivos controles. Na Tabela 11 pode-se observar que as amostras controle que possuem o resveratrol apresentaram concentrações maiores de vitamina A. Pode-se sugerir através desse resultado, que o resveratrol desempenhou atividade antioxidante na emulsão-estoque desde a sua preparação até o dia de realização da análise. Portanto, se a concentração de vitamina A das

amostras fotodegradadas sem resveratrol tivessem sido comparadas às amostras controle contendo este antioxidante, seria obtido um maior percentual fotoprotetor para este composto.

A Figura 21 representa um gráfico que compara a porcentagem de decaimento da concentração de vitamina A das amostras fotodegradadas por radiação UV em relação aos seus controles. Esta comparação foi feita tanto para as emulsões com resveratrol, quanto para as emulsões sem este composto.

Figura 21 – Porcentagem de decaimento da concentração da vitamina A com relação ao seu respectivo controle em função do tempo de exposição à radiação UV (300 – 400 nm).




Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar na Figura 21 que nas emulsões que receberam a adição de resveratrol, a vitamina A sofreu menor degradação (em torno de 4% nos primeiros 5 min) quando exposta à radiação UV, confirmando a capacidade fotoprotetora deste composto. Neste estudo empregou-se a proporção 1:1 VitA:RSV, e sugere-se que uma proporção maior de RSV em relação à Vit A possa ofertar uma maior

fotoproteção. Observou-se que nas leituras das amostras fotodegradadas o coeficiente de variação da Vit A foi próximo à 25% indicando um processo rápido e descontrolado de degradação. A partir de 5 min de exposição, a concentração varia menos, possibilitando uma quantificação mais reprodutível.

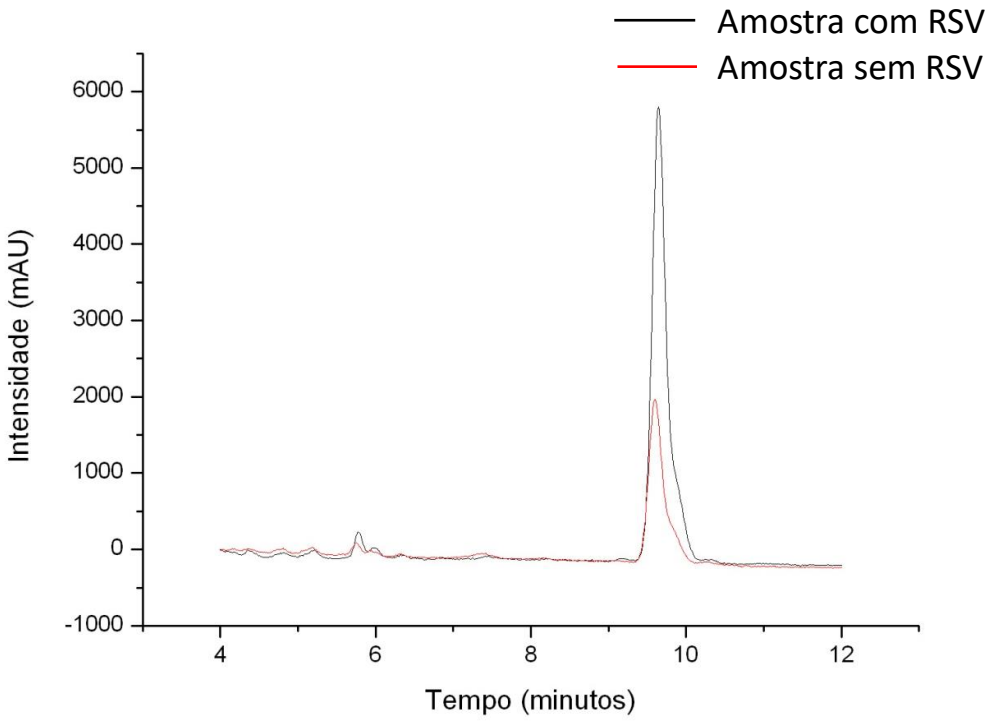
### 5.5.2 Análise da ação fotoprotetora do resveratrol sobre a vitamina A em preparações submetidas à radiação visível

Na exposição à luz visível, novamente frascos teste e controle foram submetidos à câmara de fotoestabilidade. Estes foram retirados a cada 30 min, representando, assim, análises dos tempos 30, 60 e 90 min de exposição à câmara. Após a exposição, procedeu-se com a extração da vitamina A destas amostras, injetando-se o material extraído no cromatógrafo líquido para a análise dos picos fornecidos pelo cromatograma. O estudo foi novamente realizado em triplicata.

Novamente, as áreas dos picos da vitamina A extraída das amostras fotodegradadas foram comparadas para ambos os tipos de emulsão (com e sem resveratrol). Para exemplificar, a Figura 22 representa um cromatograma com um pico de vitamina A referente a uma emulsão sem resveratrol com 90 min de exposição à câmara sobreposto à um pico desta vitamina extraído da emulsão com resveratrol, com o mesmo tempo de exposição. A pureza de todos os picos do palmitato de retinila extraído foi de 99,99%.

As concentrações, os desvios padrões relativos e o fator de assimetria dos picos, tanto das amostras controle, quanto das amostras teste dessa análise encontram-se na Tabela 12.

Figura 22 – Cromatograma com os picos da vitamina A extraídos de amostras com e sem resveratrol expostas à luz visível.




Comparação dos picos de palmitato de retinila das amostras com e sem resveratrol (degradação de 90 minutos sob luz visível), onde pode ser notada uma diminuição na intensidade do pico na amostra sem o resveratrol. A análise foi realizada em coluna Phenomenex $C_{18}$ 150 x 4,6 mm, 5µm, fluxo de 1 mL/min a 35ºC, com fase móvel metanol em modo isocrático. Fonte: Autoria própria.

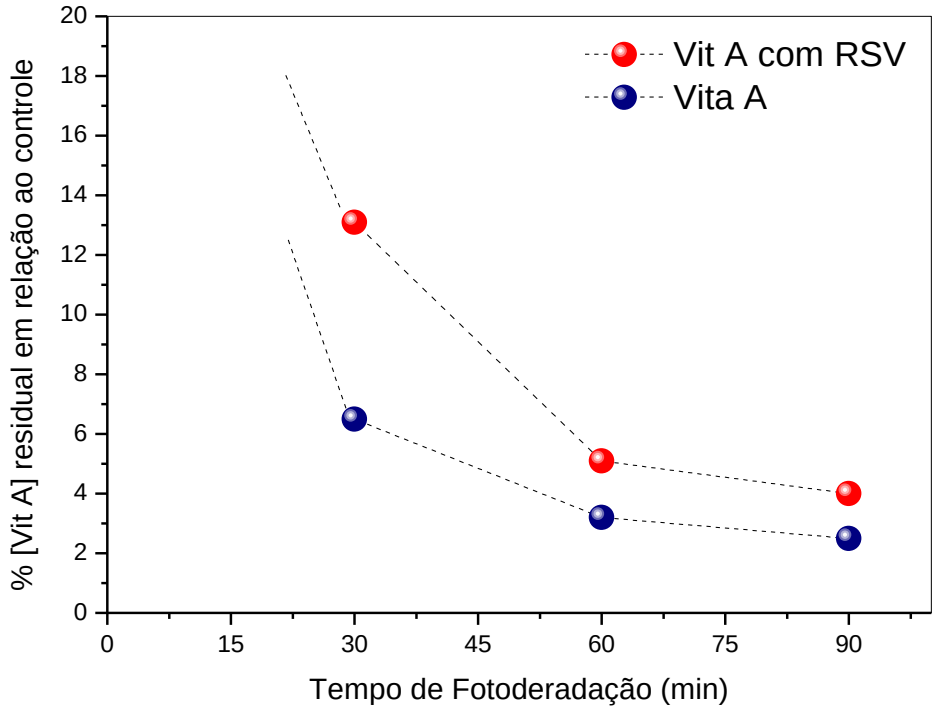
Tabela 12 – Análise dos picos referentes à vitamina A extraída das amostras submetidas à luz visível.

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO ($\mu g.mL^{-1}$) | DESVIO PADRÃO | COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%) | RETENÇÃO (minutos) | FATOR DE ASSIMETRIA |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **AMOSTRAS SEM RESVERATROL** | | |
| **C-30** | 25,86 | 2,62 | 10,15 | 9,9 | 1,1 |
| **C-60** | 21,73 | 1,19 | 5,49 | 9,9 | 1,1 |
| **C-90** | 21,81 | 0,71 | 3,26 | 9,9 | 1,1 |
| **F-30** | 1,69 | 0,06 | 3,41 | 9,9 | 1,2 |
| **F-60** | 0,69 | 0,11 | 15,90 | 9,9 | 1,2 |
| **F-90** | 0,54 | 0,05 | 8,49 | 9,9 | 1,2 |
| | | | **AMOSTRAS COM RESVERATROL** | | |
| **C-30** | 23,47 | 1,02 | 4,36 | 10,0 | 1,1 |
| **C-60** | 25,47 | 0,28 | 1,09 | 10,0 | 1,1 |
| **C-90** | 20,63 | 1,42 | 6,90 | 10,0 | 1,1 |
| **F-30** | 3,08 | 0,18 | 5,68 | 10,0 | 1,3 |
| **F-60** | 1,29 | 0,29 | 22,73 | 10,0 | 1,3 |
| **F-90** | 0,83 | 0,26 | 31,64 | 10,0 | 1,3 |

*C: amostras controle; F: amostras expostas

Depois de realizada a quantificação da vitamina A extraída das amostras, gerou-se um gráfico comparando a porcentagem de decaimento da concentração de vitamina A das amostras fotodegradadas por luz visível com seus respectivos controles. Esta comparação foi feita tanto para as emulsões com resveratrol, quanto para as emulsões sem este composto, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 – Porcentagem de decaimento da concentração da vitamina A com relação ao seu respectivo controle em função do tempo de exposição à luz visível (400 – 700 nm).

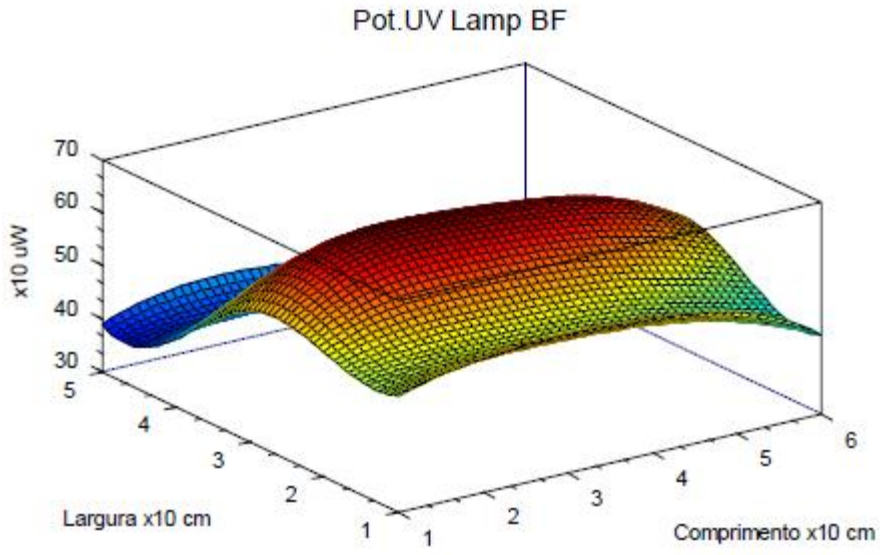



Do mesmo modo que ocorreu com as amostras no teste de degradação sob radiação UV, pode-se observar na Figura 23 que nas emulsões que receberam a adição de resveratrol, a vitamina A sofreu menor degradação (em torno de 7% nos primeiros 30 min) quando exposta à luz visível, confirmando mais uma vez a capacidade fotoprotetora deste composto. Novamente neste estudo empregou-se a proporção 1:1 VitA:RSV, e sugere-se que uma proporção maior de RSV em relação à Vit A possa ofertar uma maior fotoproteção. Observou-se que nas leituras das amostras fotodegradadas o coeficiente de variação da Vit A foi próximo à 30%, indicando um processo rápido e descontrolado do processo de degradação.

A região espectral da lâmpada Branca Fria utilizada é de 400 a 700 nm, região onde a vitamina A não absorve. Isso mostra que outro fator está relacionado à degradação da vitamina A no sistema pela luz visível. No estudo de fotodegradação da vitamina A realizado por Azevedo Filho (2008) também constatou-se sua fotodegradação pela luz visível (em ambiente de câmara de fotodegradação). Através de mapas de intensidade de irradiância para a lâmpada utilizada na câmara, ele

observa que existe uma quantidade diferente de zero na leitura da radiação UV para lâmpada BF (AZEVEDO FILHO, 2008). A Figura 24 mostra o mapa de intensidade referente à radiação UV (300-400 nm) exibida pela lâmpada branca fria utilizada para a geração de luz visível.

Figura 24 – Mapa de intensidade tridimensional da iluminância UV para a lâmpada BF monitorada no interior da câmara de fotoestabilidade.




Fonte: AZEVEDO FILHO, 2008.

Uma hipótese sugerida para explicar a degradação da vitamina A pela luz visível consiste no fato de que a fonte de luz branca da câmara utilizada também está contribuindo com luz na região do UV, pois, apesar do fabricante anunciar ausência de emissão luminosa nesta região, observou-se leitura positiva para tal (AZEVEDO FILHO, 2008).

## 5.6 FOTODEGRADAÇÃO DO PALMITATO DE RETINILA

Apesar de ser mais resistente à oxidação do que o retinol, o palmitato de retinila é físico-quimicamente mais instável à fotólise (IHARA et al., 1999) como demonstrado anteriormente na Seção 2.5.3 através da Figura 3. O sistema conjugado de dupla ligação de retinóides (Figura 2) apresenta uma região de alta densidade de elétrons que é atrativa para espécies deficiente destes, especialmente radicais. A degradação

dos retinóides exibe características que são típicas das reações de radicais catalisadas por metais de transição e substâncias produtoras de radicais livres e inibidas por compostos químicos quelantes de radicais livres e luz (LOVEDAY; SINGH, 2008).

Os resultados observados no presente estudo demonstram que a Vitamina A sofreu uma grande degradação após exposição à luz, com perda superior a 90% nos cinco primeiros minutos de irradiação (lembrando que para o estudo realizado com radiação UV na câmara de fotodegradação, cada 5 min equivalem a aproximadamente 3 h de exposição à luz em ambiente hospitalar). Estes resultados corroboram com diversos estudos anteriores. Allwood e Martin (2000), por exemplo, demonstraram que a exposição da vitamina A à luz do dia pode resultar em grandes perdas quando administradas em formulações parenterais, com mais de 60% de perda durante a infusão (ALLWOOD; MARTIN, 2000). Em outro estudo realizado por Thomas e colaboradores (1991), demonstrou-se que há uma perda significativa de vitamina A das soluções convencionais de nutrição parenteral. Os resultados indicam que apenas 10% da quantidade esperada de vitamina A foi estimada para ser administrada ao paciente ao longo de 24 h de infusão (THOMAS et al., 1991). Neste estudo, a quantidade restante de vitamina A destinada ao paciente apresenta valores semelhantes aos que foram obtidos no presente estudo.

Contudo, estas análises foram realizadas com a vitamina A incorporada em formulações já prontas para serem infundidas, em um sistema muito mais complexo do que é apresentado no presente estudo. Haas, Boroviczény e Koletzko (2002) demonstraram que administrar a vitamina A em uma emulsão lipídica fornecerá quantidades mais consistentes e reprodutíveis desta ao final dos dispositivos de aplicação no paciente (HAAS; BOROVICZÉNY; KOLETZKO, 2002). Isto indica que os resultados que apresentamos quanto à porcentagem de perda da vitamina A à ser infudida no paciente serão mais consistentes quando ambos o resveratrol e a vitamina forem incorporados em formulações completas de NP.

Esses autores ainda apontam que o fator mais prejudicial para a vitamina A é a luz solar intensa, consistindo de todo o espectro de luz, incluindo a faixa ultravioleta. Em contraste, a luz fluorescente que ilumina as unidades de terapia intensiva à noite emitem principalmente comprimentos de onda na parte visível do espectro de luz, e a lâmpada de fototerapia usada emite principalmente comprimentos de onda de 400 e 450-460nm, respectivamente. Ambas as fontes de luz são descritas por eles como

serem responsáveis por pouco efeito degradativo na vitamina A (HAAS; BOROVICZÉNY; KOLETZKO, 2002).

No presente estudo, o RSV foi testado como substância fotoprotetora. Comparando os resultados dos sistemas com e sem RSV, observa-se que a presença de RSV nas emulsões reduziu sistematicamente a degradação fotoinduzida da Vitamina A. A atividade antioxidante do resveratrol já foi reportada em outros estudos. Tadolini e colaboradores (2000) demonstraram que o resveratrol inibiu de forma mais eficiente do que qualquer análogo hidrofílico da vitamina E ou vitamina C a peroxidação lipídica de lipossomas de fosfatidilcolina sonicados. Eles também indicaram que o principal mecanismo molecular responsável pela inibição do resveratrol da peroxidação lipídica não é a eliminação de iniciadores inorgânicos primários nem a modulação da catálise metálica por quelação ou redução. O resveratrol interagindo com o ambiente lipofílico, parece exercer seu efeito através da eliminação de iniciadores orgânicos, como o tocoferol age. Além disso, suas características de partição de fases podem localizá-lo espontaneamente em membranas e lipoproteínas (TADOLINI et al., 2000).

Um recente trabalho também teve como objetivo analisar a atividade antioxidade do resveratrol, através da incorporação deste em uma emulsão base não iônica e comparação a outra emulsão base não-iônica contendo o butil-hidroxi-tolueno (BHT). O BHT tem sido um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados em formulações cosméticas, porém, a busca da indústria farmacêutica e cosmética pelo emprego de produtos de origem natural tem sido cada vez maior. Através do teste com o radical livre DPPH, o resveratrol, tanto na sua forma de extrato seco, como quando incorporado na emulsão, demonstrou significativa superioridade na atividade antioxidante em relação ao BHT, podendo sua utilização ser uma alternativa viável em preparações cosméticas, devido ao seu grande potencial antioxidante. O artigo sugere que este resultado possa ser explicado através da avaliação da estrutura química da molécula do resveratrol. Esta apresenta dois anéis aromáticos e ligações duplas, formando intermediários relativamente estáveis, devido à ressonância do anel presente em sua estrutura, enquanto que o BHT apresenta em sua estrutura apenas um anel aromático (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Avaliando-se os espectros de absorção eletrônica do resveratrol e do palmitato de retinila (Figura 12), pode-se observar que eles possuem regiões de absorção semelhantes. Sendo assim, este estudo sugere que o resveratrol possa desempenhar

sua capacidade fotoprotetora por competir com o palmitato pela luz incidida sobre a emulsão, sofrendo degradação e mantendo uma concentração de Vitamina A superior ao sistema na qual ele não está presente. Analisando-se o perfil cromatográfico do RSV após irradiação sugere-se que a falta de pureza do pico correspondente a este composto resulta da conversão do *trans*-resveratrol, a seu isômero *cis*, com possível degradação deste composto.

# 6 CONCLUSÕES

Este trabalho reveste-se de um caráter inovador no que apresenta o resveratrol como agente antioxidante/fotoprotetor em formulações para NP. Neste estudo, conseguiu-se nanoemulsionar a vitamina A e o resveratrol em preparações estáveis, as quais foram caracterizadas e apresentaram um tamanho médio das gotículas na faixa de 100-800 nm e potencial zeta $\zeta \sim 26$ mV.

Os resultados obtidos com a exposição da vitamina A mostram que após uma sessão de radiação a qual foram submetidas as emulsões, equivalente às radiações UV e visível, a vitamina A sofreu um decréscimo em sua concentração de mais de 90% para ambas as luzes, em relação ao grupo controle. Ainda que num efeito total relativamente baixo (~4% para UV e ~7% para luz visível), o resveratrol, na concentração em que foi utilizado, conseguiu oferecer fotoproteção à vitamina A, mostrando potencial como substância fotoprotetora para preparações contendo esta vitamina.

Outro resultado importante no estudo foi o desenvolvimento da metodologia de extração satisfatória diante da alta taxa de recuperação atingida. A metodologia de extração aplicada no presente estudo demanda de uma grande quantidade de tempo para ser realizada, e precisa de ajustes que permitam diminuir o coeficiente de variação entre as amostras analisadas.

Além disso, existem outros promissores benefícios através da aplicação do RSV quanto às suas outras atividades biológicas, como, por exemplo, a atividade anti-inflamatória que o resveratrol pode desempenhar em pacientes politraumatizados que realizam a terapia de NP. Espera-se com isto consolidar o campo da pesquisa na área e aproximar o setor científico ao setor de aplicação direta do resultado científico.

## 7 PERSPECTIVAS

Visando aumentar a taxa de fotoproteção do resveratrol sobre a vitamina A, serão realizados novos testes com preparações contendo quantidades proporcionalmente maiores deste composto, já que foram aplicados valores muito baixos e ainda existe uma margem grande em relação à toxicidade do resveratrol e do polissorbato 80. Acredita-se que, aumentando-se a quantidade de resveratrol, também será possível aumentar a fotoproteção da vitamina A. Desta forma, almeja-se estimar a correlação do efeito fotoprotetor com a concentração de RSV na formulação, de forma a otimizar seu efeito. Ensaios de detecção de espécies reativas de oxigênio também podem ser aplicados para estimar a natureza do processo de fotoproteção do RSV. Para tanto, diagramas ternários e pseudo-ternários contendo os componentes (RSV, PS80, água) serão testados.

Através do uso concomitante de RMN e CLAE acoplado a espectrometria de massas serão investigados os possíveis produtos de fotodegradação tanto da vitamina A quando do Resveratrol.

Com atividade fotoprotetora estabelecida, visa-se o desenvolvimento de formulações parenterais “dois em um” e “três em um” contendo este composto nanoemulsionado, juntamente com os demais componentes da nutrição parenteral.

# REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2783-2840, 2004.

ALLWOOD, M.C.; KEARNEY, M.C. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. **Nutrition**, v. 14, n. 9, p. 697 - 706, 1998.

ALLWOOD, M.C.; MARTIN, H.J. The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. **Clinical Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 339-342, 2000.

AMRI, A. et al. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations?. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 182-193, 2012.

ANTUNES, M.D.S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas em soluções nutritivas parenterais. **Rev. Bras. Farm**, v. 85, n. 3, p. 121-127, 2004.

AOAC. Vitamin D in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula. **Official Method 2011.11.** First Action. 2011.

AOAC. Vitamins A and E in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula. **Official Method 2012.09.** First Action. 2012.

ATKINSON, M. et al. Nutrition in the critically ill patient: part I. Essential physiology and pathophysiology. **Critical care and resuscitation**, v. 5, n. 2, p. 109, 2003.

AZEVEDO FILHO, C.A. et al. Considerations on the quinine actinometry calibration method used in photostability testing of pharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 4, p. 886-888, 2011.

AZEVEDO FILHO, C.A. **Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

AZEVEDO FILHO, C.A.; GOMES, D.F.; SANTOS, B.S. How to Use UV Radiation to Monitor the Photostability of Pharmaceutical Products. In: BALENOVIC, D.; STIMAC, E. **Radiation Exposure: Sources, Impacts and Reduction Strategies.** Nova Science Pub Inc. 2012. cap. 9, p.207-228.

BALET, A. et al. Effects of multilayered bags vs ethylvinyl-acetate bags on oxidation of parenteral nutrition. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 85-91, 2004.

BASLY, J.P. et al. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)-and (Z)-resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 9, p. 769-777, 2000.

BATHIA, J. et al. Hepatic function during short-term total parenteral nutrition: effect of exposure of parenteral nutrients to light. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 321-340, 1992.

BERMAN, A.Y. et al. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, v. 1, n. 1, p. 35, 2017.

BERTELLI, A.; DAS, D.K. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 468-476, 2009.

BHAT, K.P.L.; KOSMEDER, J.W.; PEZZUTO, J.M. Biological effects of resveratrol. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 3, n. 6, p. 1041-1064, 2001.

BHATT, J.K.; THOMAS, S.; NANJAN, M.J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition research**, v. 32, n. 7, p. 537-541, 2012.

BLAKE, C.J. Status of methodology for the determination of fat-soluble vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 4, p. 897-910, 2007.

BLANCO, D. et al. Determination of fat-soluble vitamins by liquid chromatography in pediatric parenteral nutritions. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 17, n. 20, p. 4513-4530, 1994.

BLANCO, D.; FERNANDEZ, M. P.; GUTIERREZ, M. D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 427-431, 2000.

BOULLATA, J.I. et al. ASPEN clinical guidelines: parenteral nutrition ordering, order review, compounding, labeling, and dispensing. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 334-377, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n°453, de 28 de dezembro de 2017. **Estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n°166, de 24 de julho de 2017. **Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos.** Brasília: Diário Oficial da União, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 272 de 08/04/1998. Dispõe sobre regulamento Técnico e os requisitos mínimos exigidos para terapia de nutrição parenteral. *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 Abr. 1998. Seção I, p. 1-15.

BRAWLEY, V.; BHATIA, J.; KARP, W.B. Effect of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions. **American journal of health-system pharmacy**, v. 55, n. 12, p. 1288-1292, 1998.

BREITHAUPT, D.E. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction. **Food chemistry**, v. 74, n. 4, p. 521-525, 2001.

CARUSO, L; DE SOUZA, A.B. Manual da Equipe Multidisciplinar de Terapia Nutricional (EMNT). Hospital Universitário da Universidade de São Paulo HU/USP, São Paulo. p. 116, 2014.

CHAIYASIT, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 3, p. 299-317, 2007.

CHEN, L. et al. Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/clean-up. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 588-595, 2011.

CHEN, X. et al. Stereospecific determination of cis-and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. **Biomedical chromatography**, v. 21, n. 3, p. 257-265, 2007.

CHERNG, S.H. et al. Photodecomposition of retinyl palmitate in ethanol by UVA light formation of photodecomposition products, reactive oxygen species, and lipid peroxides. **Chemical research in toxicology**, 18(2), 129-138, 2005.

CHESSEX, P. et al. Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. **Pediatric research**, v. 52, n. 6, p. 958-963, 2002.

CHYTIL, F. The dairy industry protects milk from photodegradation; why not protect total parenteral nutrition solutions also?. **The American journal of clinical nutrition**, v. 63, n. 3, p. 404-405, 1996.

CHOI, Y.H. et al. Quantitative analysis of retinol and retinol palmitate in vitamin tablets using 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v. 512, n. 1, p. 141-147, 2004.

COMBS JR, G.F.; MCCLUNG, J.P. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. Academic press, 2016.

COMMODARI, F. et al. Comparison of the phytoestrogen trans-resveratrol (3, 4′, 5-trihydroxystilbene) structures from x-ray diffraction and solution NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 567-572, 2005.

COTTART, C.H.; NIVET-ANTOINE, V.; BEAUDEUX, J.L. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 1, p. 7-21, 2014.

CRIQUI, M.H.; RINGEL, B.L. Does diet or alcohol explain the French paradox?. **The Lancet**, v. 344, n. 8939-8940, p. 1719-1723, 1994.

CSISZAR, A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1215, n. 1, p. 117-122, 2011.

DAMIANAKI, A. et al. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 78, n. 3, p. 429-441, 2000.

DAS, S.; DAS, D.K. Anti-inflammatory responses of resveratrol. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 6, n. 3, p. 168-173, 2007.

DEKIĆ, S. et al. Trans-and cis-resveratrol concentration in wines produced in Serbia. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 73, n. 11, p. 1027-1037, 2008.

DÍAZ, A.S. et al. Estabilidad de vitaminas en nutrición parenteral. **Nutrición Hospitalaria,** v. 24, n. 1, p. 1-9, 2009.

DIZAJ, S.M. Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. **Journal of nanostructure in chemistry**, v. 3, n. 1, p. 59, 2013.

DRISCOLL, D.F. Compounding TPN admixtures: then and now. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 433-438, 2003.

FALCÃO, J.S.A. **Desenvolvimento e estabilidade físico-química de emulsões lipídicas secas utilizadas para a nutrição parenteral**. 2017. 22 f. Pesquisa de Pós-doutorado (Não publicado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

FERREIRA, I.K.C. Terapia nutricional em unidade de terapia intensiva. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 19, n. 1, p. 90-97, 2007.

FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FU, P.P. et al. Photodecomposition of vitamin A and photobiological implications for the skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 83, n. 2, p. 409-424, 2007.

FULDA, S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. **Drug discovery today**, v. 15, n. 17-18, p. 757-765, 2010.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 3, p. 549-554, 1995.

GAMBINI, J. et al. 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.

GASTALDI, M. et al. Nutrição parenteral total: da produção à administração. **Revista Pharmacia Brasileira**, 2009.

GAUTAM, S.C. et al. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. **Bone marrow transplantation**, v. 25, n. 6, p. 639, 2000.

GERLACH, T. et al. Vitamin A in parenteral nutrition: uptake and distribution of retinyl esters after intravenous application. **The American journal of clinical nutrition**, v. 50, n. 5, p. 1029-1038, 1989.

GREENE, H.L. et al. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 48, n. 5, p. 1324-1342, 1988.

GÜLÇIN, I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 210-218, 2010.

GURUSAMY, N. et al. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. **Cardiovascular research**, v. 86, n. 1, p. 103-112, 2009.

HAAS, C.; BOROVICZÉNY, O. G.; KOLETZKO, B. Losses of vitamin A and E in parenteral nutrition suitable for premature infants. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 9, p. 906, 2002.

ICH GUIDELINE, Harmonized Tripartite. Guidance for Industry Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Products. **Fed. Register**, v. 62, p. 27115-27122, 1996.

ICH GUIDELINE, Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In: **International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland**, 1996.

IHARA, H. et al. Esterification makes retinol more labile to photyolysis. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 45, n. 3, p. 353-358, 1999.

INARAJA, M.T. et al. Sección 2.7.2. Formas farmaceúticas estériles: mezclas intravenosas, citostáticos, nutrición parenteral. p. 487–506. In: Farmacia Hospitalaria - Tomo I, 2002. Disponivel em <https://www.sefh.es/sefhpublicaciones/fichalibrolibre.php?id=4> Acesso em: 05, jan./2017.

JANG, D. et al. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochemical pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 705-712, 1999.

JASTREBOVA, J., WITTHOFT, C., GRAHN, A., SVENSSON, U., JAGERSTAD, M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. **Food Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 579-588, 2003.

JEDLICKA, A.; KLIMES, J. Determination of water-and fat-soluble vitamins in different matrices using high-performance liquid chromatography. **CHEMICAL PAPERS-SLOVAK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 59, n. 3, p. 202, 2005.

JESUS, V.S. **Estudo sobre a Correlação entre a Ordem de Adição dos Componentes da Nutrição Parenteral e a Formação de Precipitados entre Fosfato e Cálcio.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

JEON, B.T. et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1444-1454, 2012.

KITADA, M. et al. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. **Diabetes**, v. 60, n. 2, p. 634-643, 2011.

KOLETZKO, B.; GOULET, O.; HUNT, J.; KROHN, K.; SHAMIR, R. Report on the guidelines on parenteral nutrition in infants, children and adolescents. **Clin Nutr**, v. 24, n. 6, p. 1105-1109, 2005.

KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ, I. et al. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. **Food Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 151-158, 2004.

KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the'French paradox'?. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 6, p. 619-620, 1998.

KORETZ, R. L.; LIPMAN, T. O.; KLEIN, S. AGA technical review on parenteral nutrition. **Gastroenterology**, v. 121, n. 4, p. 970-1001, 2001.

LANGE, M.K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.

LAVOIE, J.; CHESSEX, P. Biologic effects of parenteral bisulfite on human vascular tissue. **Pediatric research**, v. 33, n. 4, p. 347-351, 1993.

LAVOIE, J.C. et al. Admixture of a Multivitamin Preparation to Parenteral Nutrition: The Major Contributor to In Vitro Generation of Peroxides. **Pediatrics,** v. 99, n. 3, p. e6-e6, 1997.

LAVOIE, J.C. et al. Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs. **Clin Nutr,** v. 26, n. 3, p. 341-7, 2007.

LEE, H. et al. Syntheses of resveratrol and its hydroxylated derivatives as radical scavenger and tyrosinase inhibitor. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 971-975, 2010.

LEE, H. et al. Simultaneous Determination of Vitamin A and E in Infant Formula by HPLC with Photodiode Array Detection. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 31, n. 2, p. 191-199, 2011.

LEITE, E.G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2005.

LEYBA, C.O.; GÓMEZ-TELLO, V.; ARBELOA, C.S. Requerimientos de macronutrientes y micronutrientes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, p. 13-17, 2005.

LIMA, M.S.R. **Avaliação da concentração de vitamina A materna e de neonatos prematuros e a termo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

LOBO, B.W. et al. Influence of the relative composition of trace elements and vitamins in physicochemical stability of total parenteral nutrition formulations for neonatal use. **Nutrition journal**, v. 11, n. 1, p. 26, 2012.

LÓPEZ-NICOLÁS, J.M. et al. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β-cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 2, p. 158-165, 2006.

LOVEDAY, S.M.; SINGH, Harjinder. Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. **Trends in food science & technology**, v. 19, n. 12, p. 657-668, 2008.

MAGYAR, K. et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 50, n. 3, p. 179-187, 2012.

MARCHINI, J. S. et al. Nutrição parenteral-príncipios gerais, formulários de prescrição e monitorização. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 31, n. 1, p. 62-72, 1998.

MIRTALLO, J. et al. Safe practices for parenteral nutrition. **J Parenter Enteral Nutr,** v. 28, n. 6, p. S39-70, 2004.

MISCHIATTI, K.L. **Obtenção de derivados do Resveratrol por biotransformações e avaliação das atividades biológicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2012.

MORA, J.R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685-698, 2008.

MORENO, P.; SALVADÓ, V. Determination of eight water-and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 207-215, 2000.

NDIAYE, M. et al. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 164-170, 2011.

NEVES, A.R. et al. Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663-1681, 2012.

PAIVA, E.P.; COSTA, M.M.A., AZEVEDO FILHO, C.A.; Folate–Analytical properties, bioavailability and stability in foods. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 1-24, 2015.

PAIXÃO, J.A.; CAMPOS, J. M. Determination of Fat Soluble Vitamins by Reversed-Phase HPLC Coupled with UV Detection: A Guide to the Explanation of Intrinsic Variability. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 26, n. 4, p. 641-663, 2003.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Lacteal matrices. A single guide for extraction and quantification of fat-soluble vitamins. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 25, n. 2, p. 217-239, 2002.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos-uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.

PAIXÃO, J.A. UV-Visible Detection Including Multiple Wavelengths. **Encyclopedia of Chromatography**, 3rd ed. United States of America, USA, Taylor & Francis Group, 2010.

PATEL, K.R. et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer research**, v. 70, n. 19, p. 7392-7399, 2010.

PENUMATHSA, S.V.; MAULIK, N. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 275-286, 2009.

PEREIRA-DA-SILVA, L. Nutrição parentérica no recém-nascido: 1ª revisão do Consenso Nacional, 2008. **Acta Pediatrica Portuguesa**, p. 125-134, 2008.

PRIETO, S.P.; GRANDE, B.C.; FALCÓN, S.G.; GÁNDARA, J.S. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. **Food Control**, v. 17, n. 11, p. 900-904, 2006.

PUDER, M. et al. Parenteral fish oil improves outcomes in patients with parenteral nutrition associated liver injury. **Annals of surgery**, v. 250, n. 3, p. 39, 2009.

QUIRÓS, A.R.B. et al. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v. 1032, n. 1, p. 135-139, 2004.

RABELO, N.N. et al. Conduta nutricional no trauma para o clínico. **Razões alegadas por médicos recém-formados em Salvador/BA em 2010 para não prestarem o concurso de residência médica**, v. 10, n. 2, p. 116-21, 2012.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. The French Paradox: Dietary Factors and Cigarette Smoking-Related Health Risks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 686, n. 1, p. 299-309, 1993.

RIBEIRO, D. O. et al. Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. **Nutr J,** v. 10, p.47, 2011.

RICHARD, J. L. Coronary risk factors. The French paradox. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 80, p. 17-21, 1987.

RIGO, J. et al. Bone mineral metabolism in the micropremie. **Clinics in perinatology**, v. 27, n. 1, p. 147-170, 2000.

RODRIGUEZ, L.C., CAMPANA, A.M.G., BARRERO, F.A., LINARES, C.J., CEBA, M.R., **Validation of an analytical instrumental method by standard addition methodology.** Journal of AOAC International v. 78, n. 2, p. 471 – 476, 1995.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. (Ed.). **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical press, 2009.

RUIVO, J. et al. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 499-513, 2015.

SABLIOV, C. M. et al. Effects of temperature and UV light on degradation of α-tocopherol in free and dissolved form. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 9, p. 895, 2009.

SAFFERT, A.; PIEPER, G.; JETTEN, J. Effect of package light transmittance on vitamin content of milk. Part 2: UHT whole milk. **Packaging Technology and Science**, v. 21, n. 1, p. 47-55, 2008.

SAFFERT, A.; PIEPER, G.; JETTEN, J. Effect of package light transmittance on the vitamin content of milk, part 3: Fortified UHT low-fat milk. **Packaging Technology and Science**, v. 22, n. 1, p. 31-37, 2009.

SANBORN, M. Core competencies in hospital pharmacy-intravenous admixtures. **Hospital Pharmacy**, v. 41, n. 4, p. 377-380, 2006.

SARKER, D. K. **School Science Review**, v. 95, n. 350, p. 45-52, 2013.

SEBAI, H. et al. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. **Drug and chemical toxicology**, v. 34, n. 2, p. 146-150, 2011.

SEMENOVA, E.M. et al. Stabilization of all-trans-retinol by cyclodextrins: a comparative study using HPLC and fluorescence spectroscopy. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 44, n. 1-4, p. 155-158, 2002.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

SCHNEIDER, Y. et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer letters**, v. 158, n. 1, p. 85-91, 2000.

SHINDIKAR, A. et al. Curcumin and resveratrol as promising natural remedies with nanomedicine approach for the effective treatment of triple negative breast cancer. **Journal of oncology**, v. 2016, 2016.

SHULMAN, R.J.; PHILLIPS, S. Parenteral nutrition in infants and children. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 36, n. 5, p. 587-607, 2003.

SMALLWOOD, I.M. **Handbook of organic solvent properties**; Arnold: London, 1996.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. **Clinical biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOUFI, F.G. et al. Chronic resveratrol administration has beneficial effects in experimental model of type 2 diabetic rats. **Endocrine regulations**, v. 46, n. 2, p. 83-90, 2012.

ŠVAJGER, U.; JERAS, M. Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. International reviews of immunology, v. 31, n. 3, p. 202-222, 2012.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, obesity and diabetes. **European journal of pharmacology**, v. 635, n. 1-3, p. 1-8, 2010.

TADOLINI, B. et al. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. **Free Radical Research**, v. 33, n. 1, p. 105-114, 2000.

THOMAS, D.G. et al. Delivery of vitamin A from parenteral nutrition solutions in neonates. **Journal of paediatrics and child health**, v. 27, n. 3, p. 180-183, 1991.

TIMMERS, S. et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell metabolism**, v. 14, n. 5, p. 612-622, 2011.

TORRINHAS, R.S.; WAITZBERG, D.L. Parenteral Nutrition. **Encyclopedia of Food and Health**, Academic Press, Oxford, p. 225-229, 2016.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

TRINDADE, C.E.P. Importância dos minerais na alimentação do pré-termo extremo. **J Pediatr (Rio J)**, v. 81, n. Suppl 1, p. s43-51, 2005.

TURPIN, R. S. et al. Bloodstream infections associated with parenteral nutrition preparation methods in the United States: a retrospective, large database analysis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 169-176, 2012.

VANEK, V.W. et al. ASPEN position paper: recommendations for changes in commercially available parenteral multivitamin and multi–trace element products. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 4, p. 440-491, 2012.

VAZQUEZ, R. et al. Simultaneous quantification of water-soluble and fat-soluble vitamins in parenteral nutrition admixtures by HPLC-UV-MS/MS. **Eur J Hosp Pharm Sci Pract**, v. 15, n. 2, p. 28-35, 2009a.

VAZQUEZ, R. et al. Stability Indicating Assay Method on Vitamins: Application to their Stability Study in Parenteral Nutrition Admixtures. **Chromatographia,** v. 69, n. 7-8, p. 629-635, 2009b.

VIAN, M.A. et al. Simple and rapid method for cis-and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 224-229, 2005.

WANG, Y. et al. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 3, p. 431-435, 2002.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International journal of pharmaceutics**, v. 293, n. 1-2, p. 101-125, 2005.

WHITEHEAD, T.P. et al. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 32-35, 1995.

WU, J.M.; HSIEH, T. Resveratrol: a cardioprotective substance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 16-21, 2011.

WU, J.M.; HSIEH, T.; WANG, Z. Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. **American journal of cardiovascular disease**, v. 1, n. 1, p. 38, 2011.

XI, J. et al. Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3β and mitochondrial permeability transition pore. **European journal of pharmacology**, v. 604, n. 1-3, p. 111-116, 2009.

XIA, Q. et al. Photoirradiation of retinyl palmitate in ethanol with ultraviolet light-formation of photodecomposition products, reactive oxygen species, and lipid peroxides. **International journal of environmental research and public health**, v. 3, n. 2, p. 185-190, 2006a.

XIA, Q. et al. UVA photoirradiation of retinyl palmitate—formation of singlet oxygen and superoxide, and their role in induction of lipid peroxidation. **Toxicology letters**, *163*(1), 30-43, 2006b.

ZHOU, H. et al. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. **World journal of gastroenterology**, v. 9, n. 3, p. 408, 2003.

ZUPANČIČ, Š; LAVRIČ, Z; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 196-204, 2015.