

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA PELO MÉTODO DE DESSOLVATAÇÃO COM RETICULAÇÃO VIA DISSULFETO

Maria de Lourdes F. M. Santos¹; Gilmar F. Dias²; Anderson N. Mendes³.

¹ IEMA Pleno Caxias

² IFMA Campus Caxias

³ UFPI Campus Universitário Ministro Petrônio Portella

mdelourddes@hotmail.com

Palavras-Chave: Nanotecnologia, Inovação, NPsBSA.

Introdução

A nanotecnologia é um campo da ciência e tecnologias aplicadas que visa o desenvolvimento de materiais, dispositivos e sistemas funcionais em escala coloidal, ou seja, entre 1 e 1000 nm [1]. O uso dessa abordagem no aprimoramento de produtos naturais tem ganhado destaque em estudos recentes, por possibilitar a obtenção de produtos alternativos eficazes para múltiplas aplicações [2,3].

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas nanométricos possibilitou a aplicação funcional de ativos naturais, como os óleos essenciais. Estes são metabólitos de interesse biotecnológico e terapêutico, mas apresentam limitações de aplicabilidade direta tais como alta volatilidade, alto risco de oxidação e estabilidade reduzida de suas propriedades físico-químicas [4]. Ratificando, a nanotecnologia emergiu como uma abordagem inovadora para superar esses desafios, permitindo a criação de nanossistemas que aumentam a estabilidade, a biodisponibilidade e a eficácia funcional dos OEs [5].

Entre as técnicas empregadas, destaca-se a nanoencapsulação, que consiste na incorporação de compostos bioativos em sistemas coloidais, prevenindo a exposição e degradação dos OEs, criando assim uma barreira física contra agentes externos (luz, oxigênio e calor), além de facilitar sua liberação controlada, o que resulta em maior biodisponibilidade e eficácia [6]. Vários métodos de nanocarreadores têm sido desenvolvidos, incluindo nanopartículas à base de lipídios, nanopartículas poliméricas, dendrímeros e nanopartículas metálicas. Desse rol, os sistemas poliméricos são amplamente utilizados na encapsulação de compostos orgânicos sintéticos ou naturais [7-9].

Os sistemas encapsulados são estratégias eficientes para o transporte de substâncias ativas até seus sítios de ação, possibilitando vantagens como a proteção de substâncias ativas frente a fatores ambientais, liberação controlada, mascaramento de sabores/odores desagradáveis e aumento do tempo de atuação do composto ativo, prolongando a sua eficácia terapêutica. Neste caso, o tipo de nanopartícula e o local onde a substância ativa será exposta (adsorvida na superfície ou não) dependerão das características finais desejadas, como aplicação, tamanho, distribuição de tamanhos, grau de biodegradabilidade e compatibilidade do polímero com a substância ativa [10].

As proteínas são macromoléculas que têm funções únicas e potenciais aplicações no campo biomédico e no desenvolvimento de novos materiais. Por serem anfifílicas, as proteínas interagem com fármacos hidrofílicos e lipofílicos, logo são consideradas ideais para a síntese de nanopartículas [11,12]. Nos últimos anos, as nanopartículas proteicas têm despertado exponencial interesse na nanomedicina, pois são estáveis, biodegradáveis, não tóxicas, não antigênicas e têm alto valor nutricional e abundantes fontes renováveis. Além disso, nanodispositivos de proteína têm locais de ligação adicionais para vários fármacos e podem ser facilmente ampliados durante a fabricação [13-15].

Dentre as proteínas utilizadas, a albumina destaca-se como um dos carreadores mais promissores. Sendo elencada como uma macromolécula solúvel em água, de fácil purificação

não imunogênica e metabolizada *in vivo* em subprodutos não tóxicos, o que a torna ideal para a preparação de nanopartículas [16,17]. Os sistemas nanopartículados à base de albumina possibilitam que uma quantidade significativa de droga seja incorporada na matriz de partículas, devido aos diferentes sítios de ligação presentes em sua estrutura [18].

Ao analisar a estrutura primária da albumina, pode-se perceber que ela é rica em resíduos de aminoácidos carregados, como a lisina, o que permite adsorção eletrostática de moléculas positivas (por exemplo, *ganciclovir*) ou negativamente carregadas (por exemplo, oligonucleotídeos) sem a necessidade de reagentes adicionais [19,20]. Além disso, nanopartículas de albumina podem ser obtidas por técnicas brandas, como dessolvatação, emulsificação, geleificação térmica, *nab-technology* e automontagem.

No organismo humano, a albumina é a proteína mais abundante no plasma (35–50 mg/mL), sendo sintetizada principalmente pelo fígado, com uma elevada taxa de produção de 0,4–0,7 mg/h. É importante salientar que esta proteína apresenta alta solubilidade (até 40% p/v) e estabilidade térmica, podendo ser aquecida até 60 °C por 10 h sem quaisquer efeitos nocivos ou perda de funcionalidade [21,22].

As albuminas são classificadas de acordo com sua origem, destacando-se como a albumina sérica humana (HSA), albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica de rato (RSA) e a ovoalbumina (OVA), oriunda da clara do ovo. Além dessas fontes, a albumina também pode ser obtida do leite, da soja e de grãos [23].

Por tanto nanocarreadores de albumina são considerados sistemas portadores confiáveis e eficientes, oferecendo vantagens como fácil preparo, controle de tamanho, versatilidade de modificação de superfície e compatibilidade com diversos fármacos bioativos [24].

Material e Métodos

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para a síntese das nanopartículas, foram empregados: albumina sérica bovina (pó liofilizado, ≥96%), L-cisteína (97%) e 4-metil-2-(2-metilpropen-1-il)tetrahidropirano (Sigma-Aldrich, USA), álcool etílico absoluto e ureia (Synth, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, USA).

As nanopartículas foram obtidas pelo método de dessolvatação com reticulação via ligação dissulfeto [25]. Para a produção das nanopartículas de albumina (NPsBSA), 120 mg de albumina sérica bovina (BSA) foram dissolvidos em 3 mL de água deionizada sob agitação magnética a 200 rpm, à temperatura ambiente (25 °C), por 5 min. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de uma solução aquosa de ureia (10 mg mL⁻¹), com o intuito de promover a desnaturação parcial das proteínas. Posteriormente, realizou-se a dessolvatação por meio da adição controlada de 12 mL de etanol absoluto à solução proteica, utilizando uma bomba peristáltica com vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Esse processo resultou na formação de uma suspensão turva, indicativa da agregação proteica e da formação de nanopartículas. Como essas nanopartículas não são termodinamicamente estáveis, foi necessária uma etapa de reticulação para estabilização estrutural. Neste viés, a reticulação foi induzida pela adição de 3 mL de uma solução aquosa de L-cisteína (0,01 mg mL⁻¹), responsável pela formação de pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas. A dispersão foi mantida sob agitação constante por 2 horas. Após esse período, as nanopartículas formadas foram submetidas a três ciclos consecutivos de centrifugação (13.500 rpm.min⁻¹), sendo redispersas em água deionizada com o auxílio de banho ultrassônico (5 min) entre cada etapa. Por fim, as amostras foram secas em estufa a vácuo com circulação de ar a 40 °C.

O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico da luz (Horiba, SZ-100). No mesmo equipamento as medidas de potencial zeta foram realizadas com ênfase na mobilidade eletroforética das partículas em meio líquido. Em relação ao rendimento das nanopartículas de

BSA foi determinado pelo método de *Bradford*, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis).

Para consolidar a caracterização das NPsBSA, foram realizadas análises de: a) MEV em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7200F FEG; b) DRX, as estruturas cristalinas ou amorfas das nanopartículas sintetizadas foram investigadas por espectroscopia de raios X (Shimadzu XRD 6000); c) FTIR, a estrutura química das nanopartículas obtidas foi caracterizada por meio de um espectrofotômetro (Bruker, Vertex 70); d) Análise termogravimétrica (TG) e a análise derivada termogravimétrica (DTG) foram realizadas em equipamento Shimadzu TG-60, com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das NPsBSA.

Resultados e Discussão

Um dos métodos mais utilizados para a síntese de nanopartículas de albumina é a dessolvatação, devido à sua simplicidade de rota, eficiência e reprodutibilidade [26]. Tazhbayev e colaboradores (2020) obtiveram nanopartículas de albumina por dessolvatação, realizando a reticulação com glutaraldeído (GA) [29]. No entanto, o uso do glutaraldeído levanta preocupações em função da sua citotoxicidade, o que acende a necessidade de pesquisar substitutos para esse agente reticulante. Nesse contexto, a autorreticulação via ligação dissulfeto, mediada por cisteína, pode ser considerada uma rota sintética segura para a obtenção de nanopartículas de albumina (NPsBSA) estáveis.

Nesse aspecto, utilizou-se etanol como agente dessolvatante e ureia como agente desnaturante, responsável pelo desenovelamento parcial da estrutura proteica [27-29]. A cisteína foi empregada como agente redutor, capaz de romper as ligações dissulfeto intramoleculares nas macromoléculas proteicas [1,2].

A Tabela 1 apresenta os resultados oriundos do processo de otimização de parâmetros de síntese das NPsBSA, considerando a variação da concentração de BSA e do tempo de síntese em relação a parâmetros dependentes. A síntese das NPsBSA foi avaliada sob diferentes condições experimentais, variando-se a concentração inicial de BSA (20, 30 e 40 mg mL⁻¹) e o tempo de síntese (2 e 4 horas), com o intuito de determinar a influência desses parâmetros sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas.

Tabela 1 – Características físico-químicas das NPsBSA após variação da concentração de BSA e tempo de síntese. Fonte: Autores (2024).

Ensaio	Concentração inicial de BSA mg mL ⁻¹	Tempo de síntese (h)	Tamanho das partículas (nm) ± SD	PDI ± SD	Potencial Zeta (mV) ± SD	Rendimento de NPs (%) ± SD
1	20	2	247,53 ± 2,17	0,145 ± 0,037	-26,10 ± 3,64	47,61 ± 1,61
2	30	2	247,34 ± 4,73	0,083 ± 0,019	-28,47 ± 1,64	46,54 ± 1,30
3	40	2	257,51 ± 4,77	0,128 ± 0,011	-32,86 ± 2,89	62,17 ± 2,07
4	20	4	265,08 ± 3,87	0,126 ± 0,018	-29,55 ± 3,26	51,12 ± 1,09
5	30	4	260,48 ± 4,09	0,134 ± 0,028	-33,09 ± 2,67	55,34 ± 2,72
6	40	4	249,08 ± 4,06	0,112 ± 0,010	-36,32 ± 1,54	58,83 ± 2,60

O diâmetro médio das NPsBSA variou de 247,34 ± 4,73 nm a 265,08 ± 3,87 nm, indicando que as nanopartículas obtidas estão dentro de uma faixa de tamanho adequada para aplicações em liberação de fármacos, especialmente por favorecerem a penetração em tecidos e prolongarem a liberação sistêmica.

O potencial zeta apresentou valores negativos em todas as formulações, variando de -26,10 ± 3,64 mV a -36,32 ± 1,54 mV, contribuindo para a estabilidade do sistema, evitando a agregação espontânea. De modo geral, observou-se que tanto o aumento da concentração de BSA quanto a extensão do tempo de síntese favoreceram uma maior magnitude do potencial zeta. O rendimento das NPsBSA apresentou relação proporcional à concentração inicial de

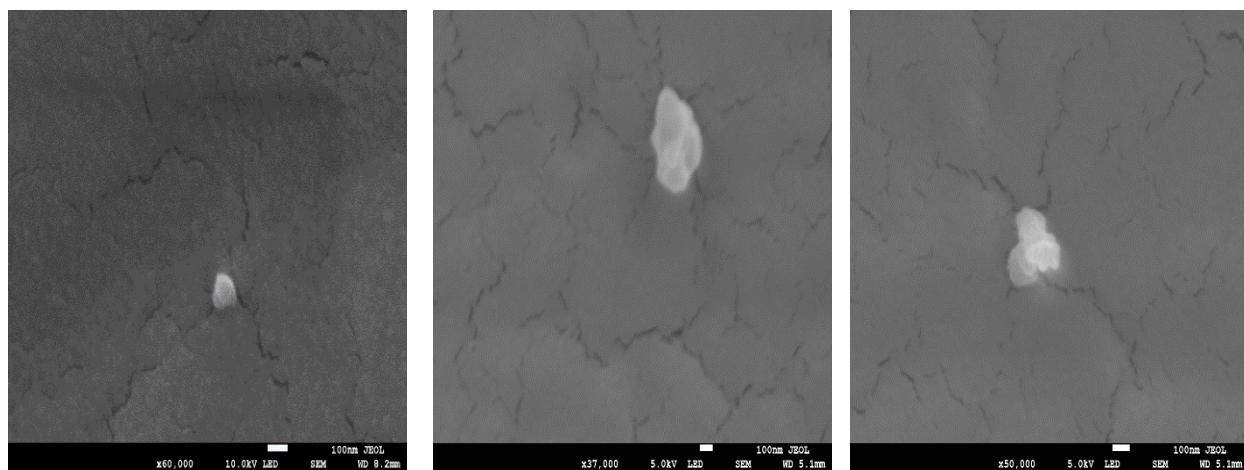
BSA, aumentando de $47,61 \pm 1,61\%$ (20 mg mL^{-1}) para $62,17 \pm 2,07\%$ (40 mg mL^{-1}) após 2 h de síntese.

O experimento 3 produziu nanopartículas estáveis, com potencial zeta = $-32,86 \pm 2,89 \text{ mV}$, diâmetro médio de partícula de $257,51 \pm 4,77 \text{ nm}$, baixa polidispersidade (PDI = $0,128 \pm 0,011$) e o maior rendimento de encapsulamento do óxido de rosa ($62,17 \pm 2,07\%$). Portanto, esse sistema foi utilizado como condição padrão para a síntese de NPsBSA de potencial aplicação terapêutica.

Os protótipos obtidos foram submetidos a caracterizações físico-químicas avançadas, incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), análise termogravimétrica (TG/DTG) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para identificar possíveis alterações estruturais e interações químicas.

Com base nas micrografias obtidas por MEV, apresentadas na Figura 1, é possível observar e comparar aspectos morfológicos e dimensionais das nanopartículas de albumina. As NPsBSA apresentaram morfologia ligeiramente elipsoidal, com superfície lisa e contornos bem definidos. As partículas estão isoladas sobre o substrato, com distribuição homogênea e sem evidência de aglomeração significativa. O tamanho aparente das partículas nas imagens está na faixa inferior a 300 nm , compatível com os dados de DLS. A ampliação utilizada nas micrografias (de $37.000\times$ a $60.000\times$) permitiu observar detalhes de superfície, os quais confirmam a regularidade morfológica das nanopartículas formadas.

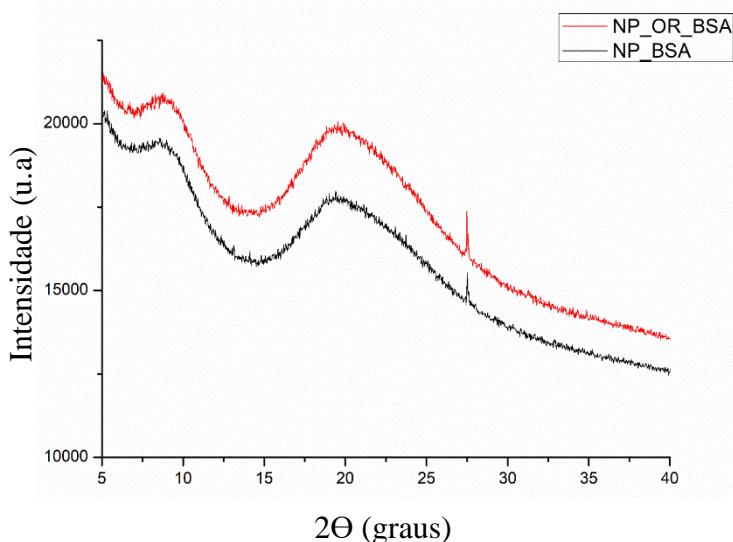
Figura 1 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de albumina por dessolvatação e reticuladas via ligação dissulfeto. Fonte: Autores (2024).



De modo geral, os resultados morfológicos obtidos por MEV corroboram a eficiência do método de dessolvatação empregado na síntese das nanopartículas, evidenciando que a estratégia de reticulação via ligação dissulfeto foi eficaz na formação de estruturas estáveis, com morfologia adequada e tamanho nanométrico [25]. Esses atributos estruturais são essenciais para garantir a biocompatibilidade e a aplicabilidade das nanopartículas como sistemas de liberação em contextos farmacológicos e terapêuticos.

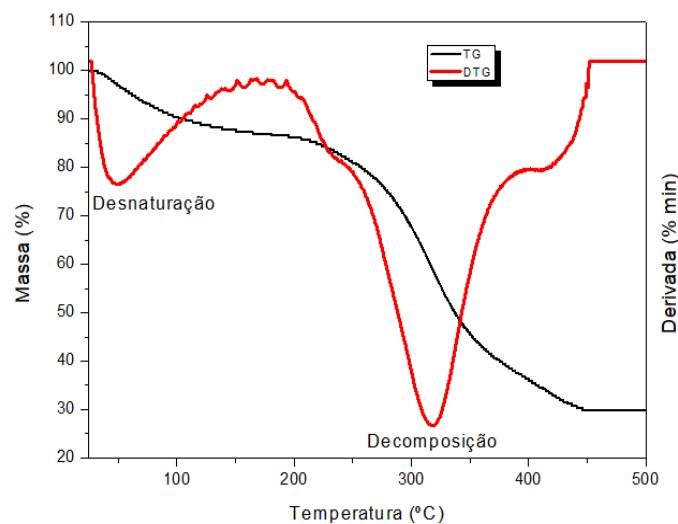
A análise dos difratogramas de raios X das NPsBSA, apresentada na figura 2, sugere um padrão típico de estrutura predominantemente amorfo, evidenciado pela presença de picos largos e de baixa intensidade ao longo do espectro 2θ , em contraste com os picos nítidos e intensos que seriam característicos de materiais cristalinos. Esse comportamento amorfo é compatível com materiais proteicos naturais, como a albumina, que tendem a apresentar organização molecular desordenada quando processados na forma de nanopartículas, especialmente por meio de técnicas como a dessolvatação.

Figura 2 – Difratograma de raios X (DRX) de nanopartículas de albumina. Fonte: Autores (2024).



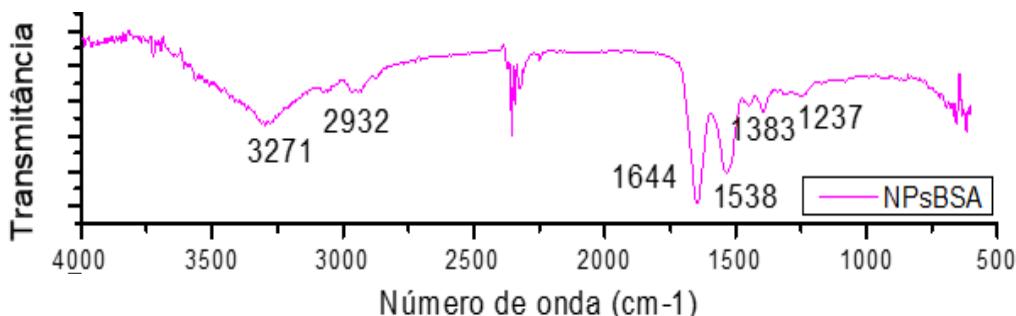
A figura 3 apresenta as curvas de análise termogravimétrica (TG/DTG) das NPsBSA. A análise termogravimétrica sugere a identificação de dois principais eventos térmicos: a) faixa de temperatura entre aproximadamente 80 °C e 150 °C, corresponde à perda de massa associada à eliminação de água adsorvida, bem como à desnaturação parcial da estrutura proteica da albumina; b) mais expressivo, ocorre entre 280 °C e 350 °C e está relacionado à decomposição térmica da matriz proteica, resultando na degradação das cadeias polipeptídicas e na oxidação dos resíduos de aminoácidos [4,5].

Figura 3 – Análise TG/DTG das formulações NPsBSA. Fonte: Autores (2024).



A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para investigar os grupos funcionais presentes nas amostras e a matriz de albumina nas nanopartículas desenvolvidas. Os espectros correspondentes às nanopartículas de albumina (NPsBSA) estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Análise por FTIR das nanopartículas de albumina (NPsBSA). Fonte: Autores (2024).



A banda em 3271 cm⁻¹ corresponde ao estiramento N–H (amida A), refletindo a presença de ligações peptídicas. O pico em 2932 cm⁻¹ refere-se ao estiramento C–H de cadeias laterais alifáticas [7]. As bandas em 1644 e 1538 cm⁻¹ são atribuídas às amidas I (C=O) e II (N–H e C–N), respectivamente, que são fundamentais para a conformação secundária da proteína [8,9]. A amida III aparece em 1237 cm⁻¹, associada às vibrações combinadas de N–H e C–N, enquanto a banda em 1383 cm⁻¹ refere-se à deformação de grupos metil [7].

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a síntese de nanopartículas de albumina (NPsBSA), obtidas por dessolvatação com reticulação via ligações dissulfeto, resultou em um sistema nanoestruturado estável, com propriedades físico-químicas adequadas, alta biocompatibilidade e potencial aplicação terapêutica. A caracterização morfológica e estrutural confirmou a formação de nanopartículas com comportamento predominantemente amorfo, enquanto a análise termogravimétrica indicou um aumento na estabilidade térmica do nanossistema.

Em conjunto, os achados deste estudo reforçam a viabilidade do uso de nanopartículas de albumina como sistemas carreadores eficientes para compostos naturais lipofílicos naturais ou sintéticas, abrindo perspectivas para futuras aplicações terapêuticas.

Agradecimentos

Ao laboratório ICL e ao LACITEC. À PPGQ/UFPI.

Referências

- [1] Bartoccini, F. *et al.* (2022). Dithiol Based on L-Cysteine and Cysteamine as a Disulfide-Reducing Agent. *The Journal of Organic Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01050>.
- [2] Mironov, I. V and Kharlamova, V.Yu. (2023). On the Interaction of Gold(III) Complexes with Human Serum Albumin. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. <https://doi.org/10.1134/S003602362360185X>.
- [3] Hosseini, S.F. *et al.* (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031).
- [4] Solanki, R. *et al.* (2023). Synthesis, characterization, in-silico and in-vitro anticancer studies of Plumbagin encapsulated albumin nanoparticles for breast cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104501>.

[5] Carreón, Y.J.P. *et al.* (2025). Bovine serum albumin under the influence of alkali metal halides. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/d4ra04503c>.

[6] Makuch, E. *et al.* (2020). Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of eugenol by the esterification of eugenol to new derivatives. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01122-3>.

[7] Egil, A.C. *et al.* (2022). Self-assembled albumin nanoparticles for redox responsive release of curcumin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103831](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103831).

[8] Helburn, R. and Nolan, K. (2022). Characterizing biological macromolecules with attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy provides hands-on spectroscopy experiences for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.21619>.

[9] Mashhood Ahamed, F.M. *et al.* (2023). Synthesis and characterization of a novel Mannich base benzimidazole derivative to explore interaction with human serum albumin and antimicrobial property: experimental and theoretical approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2136757>.

[10] Kus-Liskiewicz, M. *et al.* (2021). Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>.

[11] El Yamani, N. *et al.* (2024). Hazard assessment of nanomaterials using in vitro toxicity assays: Guidance on potential assay interferences and mitigating actions to avoid biased results. *Nano Today*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nantod.2024.102215>.

[12] Rosa, M.A. *et al.* (2024). Magnetic carbon nanotubes modified with proteins and hydrophilic monomers: Cytocompatibility, in-vitro toxicity assays and permeation across biological interfaces. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131962>.

[13] Antoniou, M. *et al.* (2024). In Vitro Toxicological Insights from the Biomedical Applications of Iron Carbide Nanoparticles in Tumor Theranostics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nanomaterials*. <https://doi.org/10.3390/nano14090734>.

[14] van Meerloo, J. *et al.* (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (ed.Cree, I.A.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 237–245.

[15] Ciapetti, G. *et al.* (1993). In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90055-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90055-7).

[16] Plumb, J.A. (2004). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (ed.Langdon, S.P.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 165–169.

[17] Jiang, Y. *et al.* (2014). A Comparative Study on Root Canal Repair Materials: A Cytocompatibility Assessment in L929 and MG63 Cells. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/463826>.

[18] Jimenez-Bueno, I. *et al.* (2023). Cytotoxicity, Differentiation, and Biocompatibility of Root-End Filling: A Comprehensive Study. *Biomimetics*. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8070514>.

[19] Alamri, A. *et al.* (2023). Design, Physical Characterizations, and Biocompatibility of Cationic Solid Lipid Nanoparticles in HCT-116 and 16-HBE Cells: A Preliminary Study. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules28041711>.

[20] Cheng, F. *et al.* (2024). Generation of a photothermally responsive antimicrobial, bioadhesive gelatin methacryloyl (GelMA) based hydrogel through 3D printing for infectious wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129372>.

[21] Kanimozhi, K. *et al.* (2018). In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose – Nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells. *Applied Surface Science*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.197](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.197).

[22] de Lima Dias Boaventura Muniz, J. *et al.* (2024). Chitosan-based dressings containing eggshell calcium carbonate and collagen tripeptide emerge as promising platforms for skin regeneration. *Polymer Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05346-2>.

[23] Liu, K.-P. *et al.* (2025). Biocompatibility and corrosion resistance of drug coatings with different polymers for magnesium alloy cardiovascular stents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.114202>.

[24] Kim, J. *et al.* (2024). Effectiveness of Erythrocyte Morphology Observation as an Indicator for the Selection and Qualification of Blood in a Mechanically Induced Hemolysis Test. *Applied Sciences*. <https://doi.org/10.3390/app14114695>.

[25] Tazhbayev, Y. *et al.* (2020). Synthesis and Comparative Study of Nanoparticles Derived from Bovine and Human Serum Albumins. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym12061301>.

[26] Abolhassani, H. and Shojaosadati, S.A. (2019). A comparative and systematic approach to desolvation and self-assembly methods for synthesis of piperine-loaded human serum albumin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110534>.

[27] Tanjung, Y.P. *et al.* (2024). Factors Affecting the Synthesis of Bovine Serum Albumin Nanoparticles Using the Desolvation Method. *Nanotechnology, Science and Applications*. <https://doi.org/10.2147/NSA.S441324>.

[28] Hutapea, T.P.H. *et al.* (2023). Albumin: Source, preparation, determination, applications, and prospects. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2023.100549>.

[29] Tazhbayev, Y. *et al.* (2021). Isoniazid—Loaded Albumin Nanoparticles: Taguchi Optimization Method. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym13213808>.