

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO- OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BIANCA FERREIRA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO APOCININA**

Guarapuava

2021

BIANCA FERREIRA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO APOCININA**

Projeto de pesquisa apresentado para apreciação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná- UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini
Co-Orientador: Prof. Dr. Guilherme Barroso de Freitas

Guarapuava
2021

RESUMO

A apocinina é extraída a partir da raiz da planta medicinal *Picrohiza kurroa*, e apesar do seu amplo potencial, a apocinina apresenta limitações farmacocinéticas, tais como baixa biodisponibilidade oral e eliminação rápida, estreita relação dose-resposta, limitando assim sua aplicação clínica. Vários estudos têm estabelecido que as propriedades benéficas da apocinina estão relacionadas com a atividade antioxidante demonstrada, no entanto há limitações devido as suas propriedades farmacocinéticas. O emprego dos conhecimentos da nanotecnologia oferece oportunidades terapêuticas para agentes que são utilizados com pouca eficácia nas formulações orais, principalmente devido à baixa biodisponibilidade, como a apocinina. Nesse sentido, o presente trabalho propõe a realização de nanopartículas contendo este fármaco para maximizar sua utilização. Para sua realização, a metodologia utilizada foi de coacervação, para a produção das nanopartículas contendo apocinina, ainda foi realizado o revestimento das mesmas com polissorbatato 80 (0,75% p/v). A linearidade foi avaliada com auxílio do espectrofotômetro ultravioleta, onde obteve-se a formulação do gráfico, além da equação da reta. Para avaliar o diâmetro médio foi utilizada a técnica de espalhamento de luz. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio de 194 nm, eficiência de encapsulamento de 74% e um índice de polidispersão inferior a 0,3. A utilização do polisorbatato 80 (Tween 80) como revestimento mostrou-se adequada na formulação com 0,75% p/v, onde o diâmetro médio foi de 208,99 nm e índice de polidispersão de 0,108, no entanto, estatisticamente não houve diferença significativa. Para caracterização foram realizados DRX (Difratometria de Raio X) e FT-IR (Espectrômetro de Infravermelho), onde pode-se elucidar a presença dos insumos utilizados na preparação das nanopartículas. Pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível observar a morfologia e a presença das partículas formadas por albumina (BSA), apocinina (APO) e polisorbatato 80 (PS80). A análise antioxidante foi realizada a partir do teste DPPH. No ensaio DPPH foi observado que as nanopartículas produziram um percentual de inibição inferior ao ácido ascórbico. Com os dados obtidos neste experimento pode-se dizer que as nanopartículas foram obtidas com sucesso, dando como perspectiva futura testes em in vitro e in vivo para averiguar sua eficácia.

Palavras-chave: Nanopartícula. Apocinina. Albumina. Polisorbatato 80. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Apocynin is extracted from the root of the medicinal plant *Picrohiza kurroa*, and despite its wide potential, apocynin has pharmacokinetic limitations, such as low oral bioavailability and rapid elimination, close dose-response relationship, thus limiting its clinical application. Several studies have established that the beneficial properties of apocynin are related to the demonstrated antioxidant activity, however there are limitations due to its pharmacokinetic properties. The use of knowledge from nanotechnology offers therapeutic opportunities for agents that are used with little efficacy in oral formulations, mainly due to their low bioavailability, such as apocynin. In this sense, the present work proposes the realization of nanoparticles containing this drug to maximize its use. For its realization, the methodology used was coacervation, for the production of nanoparticles containing apocynin, they were still coated with polysorbate 80 (0.75% w/v). Linearity was evaluated with the aid of an ultraviolet spectrophotometer, where the graph formulation was obtained, in addition to the straight line equation. To assess the average diameter, the light scattering technique was used. The nanoparticles obtained had an average diameter of 194 nm, an encapsulation efficiency of 74% and a polydispersion index of less than 0.3. The use of polysorbate 80 (Tween 80) as a coating proved to be adequate in the formulation with 0.75% w/v, where the average diameter was 208,99 nm and polydispersion index of 0.108, however, statistically not there was a significant difference. For characterization, DRX (X-Ray Diffraction) and FT-IR (Infrared Spectrometer) were performed, where the presence of the inputs used in the preparation of the nanoparticles can be elucidated. By the Scanning Electron Microscopy technique it was possible to observe the morphology and the presence of particles formed by albumin (BSA), apocynin (APO) and polysorbate 80 (PS80). The antioxidant analysis was performed using the DPPH test. In the DPPH assay it was observed that the nanoparticles produced a lower percentage of inhibition than ascorbic acid. With the data obtained in this experiment, it can be said that the nanoparticles were successfully obtained, giving future in vitro and in vivo tests as a perspective to verify their effectiveness.

Key-words: Nanoparticle. Apocynin. Albumin. Polysorbate 80. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona)	6
Figura 2- <i>Picrorhiza kurroa</i>	6
Figura 3- Produção das nanopartículas por método de coacervação	15
Figura 4- Padrões DRX Apocinina (a), Albumina (b), Nanopartículas contendo Apocinina (c) e Sacarose (d)	24
Figura 5- Infravermelho Apocinina (a), Albumina bovina (BSA) (b), Nanopartículas de Apocinina (c), Nanopartículas de BSA/APO/PS80 com 0,75% p/v de revestimento (d)	27
Figura 6: Superfície da amostra de Apocinina, ampliação de 200 vezes	32
Figura 7- Superfície da amostra do composto APO+ BSA, ampliação de 400 vezes	32
Figura 8: Superfície da amostra do composto BSA+ APO + PS80 0,75%, ampliação de (a) 300 e (b) 1000 vezes, respectivamente.	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Curva analítica da apocinina em concentrações variadas.....	19
Gráfico 2- Perfil de estabilidade das amostras armazenadas em 3 ambientes diferentes ao longo de 60 dias quanto ao diâmetro médio das nanopartículas.....	23
Gráfico 3- Perfil de estabilidade das amostras armazenadas em 3 ambientes diferentes ao longo de 60 dias quanto ao índice de polidispersão	24
Gráfico 4- Comparativo do efeito antioxidante das NP's de Apocinina e Ácido Ascórbico.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Artigos que demonstram eficácia da Apocinina em estudos pré-clínicos....	9
Tabela 2- Diferença entre Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão entre nanopartículas com 0,50% p/v e 0,75% p/v de revestimento com PS 80.	21
Tabela 3- Análise do Potencial Zeta das Nanopartículas de Apocinina e Nanopartículas com Revestimento.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

%EE	Eficiência de Encapsulação
APO	Apocinina
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAT	Catalase
DRX	Difratometria de Raio X
FTIR	Espectrômetro de Infra Vermelho
GPx	Glutathiona Peroxidase
HSA	Albumina de Soro Humano
IP	Índice de Polidispersão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfatase
NOX	NADPH oxidase
NP's	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACA	Poli (alquilcianoacrilato)
PBCA	Poli (butilcianoacrilato)
PGA	Ácido poliglicólico
PI	Ponto Isoelétrico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PZ	Potencial Zeta
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultravioleta
PS80	Polisorbato 80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Radicais Livres	2
2.2 Antioxidantes	3
2.3 Plantas Medicinais	4
2.4.1 Mecanismos de Ação da Apocinina	6
2.4.2 Características Farmacocinéticas e Físico-químicas da Apocinina	7
2.4.3 Aplicações da Apocinina	7
2.5 Nanotecnologia	11
2.5.1 Nanotecnologia Farmacêutica	11
2.6 Albumina	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 METODOLOGIA	14
4.1 Reagentes	14
4.2 Método de coacervação para obtenção de nanopartículas de albumina contendo apocinina	14
4.2.1 Etapa de revestimento das nanopartículas de albumina	15
4.2.2 Método analítico para quantificação da apocinina.....	15
4.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação (%EE)	15
4.2.4 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão	16
4.2.5 Potencial Zeta	16
4.2.6 Estabilidade das nanopartículas.....	16
4.2.7 Difrátômetro de Raio X.....	17
4.2.8 Espectrômetro de Infravermelho (FTIR)	17
4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	18
4.2.10 DPPH	18
4.2.11 Análise estatística	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Linearidade	19
5.2 Eficiência de encapsulação (%EE)	20

5.2 Diâmetro médio das nanopartículas e índice de polidispersão (IP)	20
5.3 Potencial Zeta	22
5.4 Estabilidade das Nanopartículas	23
5.6 Infravermelho.....	27
5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
5.8 DPPH	33
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Apocinina (Apo), conhecida também como acetovanilona, é um composto orgânico natural, podendo ser extraído de uma variedade de plantas. Ela tem sido muito estudada devido suas propriedades farmacológicas. Dentre eles, o fato de ser um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase, dado que a produção excessiva de espécies oxidantes reativas via NADPH oxidase estão atrelados na progressão de diversos processos patológicos, como hipertensão, aterosclerose, artrite reumatoide, isquemia tecidual, doenças renais e câncer. (DE SOUZA; MORGON, 2016; PETRONIO *et al*, 2013; KANEGAE, 2009).

Entre as aplicações, pode-se mencionar a utilização da apocinina no tratamento de arteriosclerose, uma vez que age no bloqueio da produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) (PETERS; HILTERMANN; STOLK, 2001). Abdelrahman (2018), em seu trabalho, confirmou o efeito protetor da apocinina sobre nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos. Já Rivera *et al* (2018), testaram em modelos de ratos com nefrectomia, e os resultados sugerem que a apocinina auxilia na modulação da pressão arterial.

Apesar do seu amplo potencial, a apocinina apresenta limitações farmacocinéticas, tais como baixa biodisponibilidade oral e eliminação rápida, estreita relação dose-resposta, limitando assim, sua aplicação clínica (OLIVEIRA *et al*, 2017). Uma alternativa para solucionar as adversidades farmacológicas da apocinina são os sistemas nanoparticulados, visto que apresentam algumas vantagens como aumento da biodisponibilidade, proteção do medicamento contra degradação e liberação controlada da droga (MENDES, 2016).

O uso de nanopartículas tem sido considerado um método com grande potencial de entrega de medicamentos. O termo nanopartículas se refere a partículas bem definidas que variam em tamanho de aproximadamente de 10 a 1000 nm. Os compostos ativos podem estar associados as nanopartículas (NP's) de diferentes maneiras, como por exemplo dissolvidos no interior da partícula e/ou adsorvidos ou ligados à sua superfície. Diferentes tipos de polímeros são utilizados como a quitosana, poli (alquilcianoacrilato) (PACA), ácido poliglicólico (PGA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e o poli (butilcianoacrilato) PBCA. A utilização de revestimentos poliméricos mostra em diversos estudos a redução da captação

hepática de nanopartículas (NP), aumento simultaneamente na circulação periférica (BLASI, 2007).

Os requisitos para projetar sistemas nanoparticulados incluem controlar o tamanho das partículas, as características da superfície, a permeação, solubilidade e liberação dos agentes ativos. A maioria das nanopartículas com surfactantes oferece estabilidade para o fármaco e a forma de liberação modelada e inteligente para o alvo. As partículas poliméricas provaram sua eficácia na estabilização das moléculas, evitando degradação por meio dos riscos ambientais. Portanto, esses polímeros oferecem uma alternativa potencial para modulação das características intrínsecas de fármacos que apresentam limitações para aplicação clínica (BENNET, KIM, 2014).

NP's poliméricas apresentam diversas vantagens em face de outros tipos de nanopartículas, tais como maior estabilidade, menor citotoxicidade, permitem a liberação controlada do fármaco e tem um custo de produção relativamente baixo. Possuem ainda, elevada estabilidade em fluidos biológicos se comparadas à nano partículas de natureza lipídica. O tamanho reduzido permite se deslocarem com facilidade por meio de superfícies epiteliais (GOMES, 2016; ARAUJO, 2018).

Sendo assim, vários estudos têm estabelecido que as propriedades benéficas da apocinina estão relacionadas à atividade antioxidante demonstrada, no entanto, há limitações devido às suas propriedades farmacocinéticas. O emprego dos conhecimentos da nanotecnologia oferece oportunidades terapêuticas para agentes que são utilizados com pouca eficácia nas formulações orais, principalmente devido à baixa biodisponibilidade, como a apocinina. Dessa forma, as nanopartículas, devido ao seu tamanho de partícula reduzido podem proporcionar um aumento da biodisponibilidade da apocinina e transpor as suas dificuldades farmacocinéticas que limitam seu uso (OLIVEIRA, 2017). Nesse sentido, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de nanopartículas contendo este fármaco para maximizar sua utilização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais Livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos que possuem elétrons não apreados, são liberadas pelo metabolismo e possuem elétrons instáveis e reativos.

Podem ser gerados nas mitocôndrias, citoplasma ou na membrana, o seu alvo celular (DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos) está relacionado com seu sítio de formação (CUNHA *et al*, 2016).

A produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais. Para contrabalancear a produção e seus potenciais efeitos negativos, o organismo dispõe de um sistema antioxidante. Nas situações em que surge um desequilíbrio entre sistemas pró e antioxidante, com predomínio dos pró-oxidantes, ocorre o estresse oxidativo (YAO *et al*, 2008).

O radical superóxido (O_2^-) é formado quando sofre uma redução univalente. Esse radical é considerado pouco reativo, conseguinte, não é altamente citotóxico. Contudo, seus efeitos deletérios são provenientes da habilidade desse gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical OH. O radical hidroperóxil (HO_2) é a forma protonada do radical superóxido, possui próton hidrogênio, comprova-se ainda, que a hidroperoxila é mais reativa que o superóxido por ter maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas. Os compostos não radicalares, como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e HOCL (ácido hipocloroso), não possuem elétrons livres, sendo assim, menos instáveis que os radicais livres, mas também, podem reagir com outras moléculas próximas (MARTELLI, NUNES, 2014; DE VASCONCELOS, 2014; DE CAMPOS; YOSHIDA, 2004)

Muitos fatores estão associados ao aumento do estresse oxidativo, como por exemplo: consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional. Há alterações que são associadas a patologias crônicas (hipertensão arterial, câncer, diabetes mellitus, entre outras) e degenerativas (Doença de Alzheimer ou Parkinson) associadas ao estresse oxidativo, conhecido como estresse redox (FRIES; PEREIRA, 2011).

O oxigênio é o principal fornecedor de radicais livres, outros exemplos de radicais livres são: o superóxido, os radicais hidroxila, do óxido nítrico e do ácido hipoclorito. São principalmente produzidos por eosinófilos, neutrófilos e células endoteliais (DE VASCONCELOS *et al*, 2015).

2.2 Antioxidantes

Os antioxidantes têm como função reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres. Mecanismos antioxidantes podem agir impedindo a

formação de radicais livres, impedindo a ação desses ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas danificadas, usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático (BARBOSA, 2010).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas atuam suprimindo ou impedindo a formação de radicais livres ou espécies reativas nas células. Eles neutralizam moléculas com o potencial de se transformar em radical livre com a capacidade de induzir a produção de outros radicais (IGHODARO, AKINLOYE, 2018).

O sistema de defesa não-enzimático inclui compostos antioxidantes de origem dietética, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Existem muitos antioxidantes sintéticos amplamente empregados nas indústrias, contudo, essas indústrias têm grande interesse e administrar antioxidantes naturais, visto que as plantas podem conter uma variedade de compostos com propriedades antioxidantes. Desta forma, pesquisas relacionadas a esses compostos provenientes de fontes naturais têm se tornado frequentes (BARBOSA, 2010; HACKE, 2017).

2.3 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos está em expansão no Brasil e no mundo, fato este que tem impulsionado as empresas de medicamentos a investir em pesquisa de novos fármacos. Na atualidade, mais de 45% dos produtos farmacêuticos provém de produtos naturais. Extratos provenientes de fontes naturais oriundos das plantas são ricos em moléculas bioativas, que podem ser utilizadas no tratamento ou prevenção de diversas patologias (HACKE, 2017; NUNES *et al* 2017).

O uso das plantas com fim medicinal possui registro em diferentes épocas da humanidade, sendo utilizadas de forma empírica pelas mais diversas populações. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional como recurso para atender suas necessidades básicas (NABREGA *et al*, 2017).

Plantas medicinais apresentam grupos de compostos que são farmacologicamente ativos, no entanto, o emprego dessas plantas exige

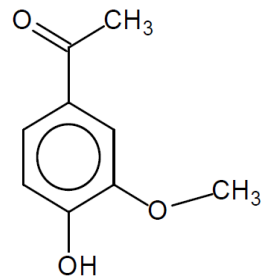
conhecimento prévio dos compostos para avaliação terapêutica e caracterização toxicológica (HACKE, 2017; NUNES *et al* 2017).

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, Fig. 1) pertence à classe dos metóxi-catecóis. Em 1971, ela foi isolada das raízes da planta nativa do Himalaia, *Picrorhiza kurrooa*, muito utilizada na medicina tradicional indiana (PEREIRA, 2014). Sua estrutura química simples permite que sejam utilizadas como moléculas protótipo para o planejamento e obtenção de compostos bioativos novos. (PEREIRA, 2014). Possui peso molecular de 166,17 g, pKa= 8,17, um ponto de fusão de 115 C°, têm leve odor de baunilha, ligeiramente solúvel em água fria, mas muito solúvel em água quente, álcool, benzeno, clorofórmio e éter (PETRÔNIO *et al*, 2013; SAVLA, 2021).

A apocinina é uma das mais promissoras drogas experimentais contra inflamação, por se caracterizar como um eficiente inibidor do complexo nicotinamida adenina dinucleótido fosfatase (NADPH). Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da agregação dos componentes enzimáticos e à oxidação catalisada por peroxidase, apresenta atividade neuroprotetora e aceptora de radicais (KANEAGAE; PEREIRA, 2014).

Devido à atuação positiva da apocinina sobre os fatores de estresse oxidativo, e a forma com que ela está associada às diversas alterações, essa substância tem tido grande visibilidade como possível fármaco para combater ou prevenir patologias associadas ao dano celular por estresse oxidativo, por exemplo, doenças neurodegenerativas (SIMÕES, SCHENKEL, 2002; BARBIERI *et al*, 2004; RONIK *et al*, 2014; BONOMO, 2015; CASTOR, 2013). No entanto sua eficácia terapêutica exibe algumas limitações farmacocinéticas potenciais, maior taxa de degradação, baixa biodisponibilidade e problemas de baixa solubilidade, restringindo sua eficácia (SINGH, 2021). A biodisponibilidade por via oral absoluta da apocinina ainda está longe da ideal, apresentando curta meia vida e com recuperação de apenas 2,8% da dose administrada (WANG *et al.*, 2013). Esse perfil foi justificado por Wang *et al* (2013) graças à solubilidade e capacidade de permeação na membrana pela apocinina, parâmetros estes que são os principais determinantes da biodisponibilidade por via oral de um determinado composto.

Figura 1- Estrutura molecular da apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona)



Fonte: Autor, 2020

Figura 2- *Picrorhiza kurroa*



Fonte: <https://www.herbal-supplement-resource.com/picrorhiza-kurroa-root.html>

2.4.1 Mecanismos de Ação da Apocinina

A NOX (NADPH oxidase) é uma família de enzimas cuja função exclusiva é produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). A apocinina tem sido usada como um eficiente e não tóxico inibidor do complexo NOX. Seu mecanismo de inibição envolve sua metabolização por meio da ação catalítica da mieloperoxidase, a consequente geração de um produto dimérico, o qual compromete a translocação do componente citosólico do complexo NADPH oxidase para a membrana (FERREIRA, 2013; HERNANDES et a, 2014).

2.4.2 Características Farmacocinéticas e Físico-químicas da Apocinina

A apocinina apresenta alguns inconvenientes quanto suas propriedades farmacocinéticas, tais como: baixa biodisponibilidade oral e eliminação rápida, e estreita relação dose-resposta, limitando assim sua aplicação clínica. O composto apresenta baixa solubilidade em água, mas é solúvel em álcoois e solventes orgânicos (OLIVEIRA *et al*, 2017).

Wang *et al* (2013) averiguaram que a apocinina possui eliminação rápida, meia-vida curta e baixa biodisponibilidade oral. Em outro estudo, utilizando ratos Wistar com uma dose de 5 mg/kg de apocinina, pode-se verificar que não houve efeito anti-inflamatório esperado, apenas quando a essa mesma dose foi quadruplicada (MISRA *et al*, 2018).

Simonyi *et al* (2012) demonstrou em seu estudo que a apocinina é rapidamente metabolizada em conjugado glicosídico. Aos 30 min e 1 h após a injeção (5 mg / kg de peso corporal, i.p.), aproximadamente 50% da apocinina foi convertida no seu derivado glicosado e foi distribuída no plasma, fígado e cérebro. A apocinina apareceu no plasma logo aos 30 min, atingiu o pico em 1 hora e declinou para níveis baixos após 2 horas. Com a administração intragástrica, a apocinina sofre uma rápida absorção e excreção; com excreção urinária contendo a forma inalterada, o glucuronídeo, a forma desmetilada, anel-hidroxilada, assim como outros derivados, e as recuperações fecais dos metabólitos eram pequenas.

2.4.3 Aplicações da Apocinina

Diversos estudos têm buscado demonstrar a eficácia da apocinina como antioxidante; em uma busca rápida pelo site orbit foram encontradas 25 patentes já depositadas com apocinina. Como Lima *et al* (2014), que utilizaram a apocinina em células epiteliais cervicais de macaco contaminadas com Papilomavírus Humano (HPV). As células foram cultivadas na presença de várias concentrações de apocinina (10, 50, 100, 250 e 500 μ M) durante 48 h e 72 h. Os resultados indicam que a apocinina inibiu significativamente o crescimento da linhagem celular de SiHa.

Já, em outro estudo, a apocinina inibiu significativamente a proliferação *in vitro* de células de câncer de próstata PLS10 na fase G1 do ciclo celular, sem afetar a produção de EROs, mas com inibição da fosforilação da Rac1. Em modelo *in vivo*,

observou-se a supressão do crescimento de tumores e metástases de modo dose-dependente, com a redução da proliferação celular e o número de vasos no tumor (SUZUKI *et al.*, 2013).

Stefanska *et al* (2010) investigaram o efeito da apocinina em 14 pacientes asmáticos não fumantes, os efeitos da apocinina nebulizada foram avaliados após 30, 60 e 120 minutos. Em comparação ao placebo a apocinina reduziu significativamente de NO (-2) e NO (-3).

Tabela 1- Artigos que demonstram eficácia da Apocinina em estudos pré-clínicos

Estudo	Modelo Experimental	Tempo de Administração (dias)	Dose	Conclusão
MATOS, 2018	Osteossarcoma humano imortalizadas (SaOS-2)	1	0,75 e 1,5 mM	Apocinina foi capaz de modular, de maneira dose-dependente, os processos de viabilidade celular.
RODRIGUES, 2018	Drosophila melanogaster	4	0,05; 0,1; 0,15 e 2,0 µM	A apocinina e seu dímero não possuem ligação no mesmo sítio de interação, mas sim em locais adjacentes. Sugere-se que estas moléculas possam, de maneira simultânea, atuar no mesmo alvo terapêutico.
GRATON, 2017	Ratos Wistar	42	30 mg/Kg v.o	O tratamento crônico com apocinina reduz o efeito vasoconstritor da Ang II em artérias de resistência de SHR, a expressão de NOX2 e p47phox e a atividade NOX, aumenta a concentração de NO e a expressão de receptores AT2 em aortas de SHR.
LEE et al, 2018	Ratos Sprague-Dawley	30	25 mg/Kg i.p	Em ratos tratados com apocinina por 4 semanas após convulsões, a morte neuronal foi reduzida e a taxa de sobrevivência de células proliferadas precocemente aumentou.
SANDRINI et al, 2017	Camundongos machos	5	15 mg / kg i.p	Apocinina restaura a megacariopoiese fisiológica e o

	FVB				comportamento plaquetário, impedindo o efeito prejudicial do estresse crônico na trombose, sugerindo seu potencial uso na ocorrência de trombose associada à ECS (estresse crônico ambiental)
OLUKMAN et al, 2018	Ratos Wistar	30	30 mg / kg i.g		O tratamento com apocinina atenua a dor neuropática desacelerando o aumento da patogênese mediada pelo estresse oxidativo em ratos diabéticos

v.o- via oral

i.g- via intragástrica

i.p-intraperitoneal

2.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência cujo objetivo é controlar individualmente moléculas e átomos para criar estruturas com diâmetros na faixa nanométrica e, modulando muitas vezes, as características individuais dos átomos ou nanopolímeros. Recentes avanços no ramo da nanotecnologia têm auxiliado a vida em todos os aspectos, uma das áreas mais promissoras é a da nanomedicina, a qual utiliza, por exemplo, nanocarreadores e nanomarcadores. (SOUTO FILHO, 2012; THORLEY, TERLEY, 2013).

2.5.1 Nanotecnologia Farmacêutica

Nanocarreadores conseguem direcionar os fármacos até as biomacromoléculas-alvo de maneira direta (e.g. utilizando anticorpos nas superfícies) ou indireta por tropismo pelo tecido alvo ou por fluxo de massa. Além disso, eles permitem uma liberação constante dos fármacos e melhora da farmacocinética, com aumento do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (CANCINO *et al*, 2014; DONIDA, 2010).

Existem diversas formas de administração dos medicamentos, sendo a via oral a mais conveniente e econômica. No entanto, possui algumas desvantagens, como efeito de primeira passagem, que limita a biodisponibilidade. O aumento da biodisponibilidade, proteção do medicamento contra a hidrólise, e liberação controlada da droga são algumas das vantagens quando o fármaco é nanoparticulado (MENDES, 2016). O método de preparação das nanopartículas deve ser controlado de acordo com o seu objetivo (BENNET, KIM, 2014).

No final dos anos 70, o trabalho pioneiro de Patrick Couvreur, intitulado “Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties”, deu origem às primeiras nanopartículas poliméricas, que eram compostas por um polímero sintético biodegradável. As nanopartículas compostas de poli (alquilcianoacrilato) foram as primeiras a carrear fármacos nanoparticulados (VAUTHIER, 2019).

Nanopartículas poliméricas são dispersões coloidais aquosas que têm sido expansivamente estudadas como carreadores de fármacos para diversos sistemas do organismo (BHASKAR *et al.*, 2010). Os fármacos carreados por nanopartículas

(NP's) podem ser incorporados na forma de solução ou dispersos no núcleo lipídico da partícula ou ainda, estar adsorvido ou quimicamente ligado à parede polimérica (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

NP's poliméricas apresentam diversas vantagens em face de outros tipos de nanopartículas, tais como, maior estabilidade e capacidade de incorporar fármacos lipofílicos, menor citotoxicidade, permitem a liberação controlada do fármaco e tem um custo de produção relativamente baixo, a biocompatibilidade com tecidos. Possuem ainda, elevada estabilidade em fluidos biológicos se comparadas a nanopartículas de natureza lipídica. O tamanho reduzido permite deslocarem-se com facilidade através de superfícies epiteliais (GOMES, 2016; ARAUJO, 2018).

2.6 Albumina

Nanopartículas podem ser compostas de polímeros naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais mais utilizados se originam de proteínas como albumina, gelatina e colágeno (OLIVEIRA *et al*, 2017). Essas moléculas biológicas têm atraído grande interesse para a aplicação na nanomedicina por sua biocompatibilidade e solubilidade em água (AHMAD *et al*, 2014). A albumina é uma proteína extensivamente utilizada na área farmacêutica como transportadora de fármacos, pois apresentam excelentes propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade, a BSA (Albumina de Soro Bovino) é a proteína mais abundante no sangue bovino e possui estrutura similar à da HSA (Albumina de Soro Humano). (RAVAL, PATEL & PATEL, 2010; OLIVEIRA, 2017). A apocinina se liga à albumina e não provoca alterações nas estruturas secundárias e terciárias, representando assim, um caminho para sua distribuição (PETRÔNIO *et al.*, 2013).

Albumina de soro bovino possui baixo peso molecular e ponto isoelétrico (PI) de 4,7 em água (25 °C). Ela é amplamente utilizada para liberação de fármacos devido a sua facilidade de purificação, baixo custo e ampla aceitação na indústria farmacêutica. Nanopartículas de albumina oferecem várias vantagens específicas, pois são biodegradáveis, fáceis de preparar e reproduzíveis (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Sarmiento (1992) utilizou a albumina como marcador para estudar a permeabilidade da amitriplina na barreira hematoencefálica (BHE). Já Appolinário *et al* (2011) utilizaram a albumina para incorporar ácido docosahexaenoico através da BHE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo apocinina e utilizar uma metodologia para criar um revestimento com polisorbato 80. Avaliá-las quanto seu potencial antioxidante.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas de apocinina
- Revesti-las utilizando polisorbato 80;
- Caracterizar as nanopartículas de apocinina, avaliando seu diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação (EE%);
- Avaliar a estabilidade da nanopartículas (índice de polidispersão e diâmetro médio) em função do tempo;
- Avaliar a atividade antioxidante da nanopartícula de apocinina.

:

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho não passaram por nenhum tratamento prévio: Água ultrapura, Albumina de Soro Bovino (Tedia Brazil©), Apocinina (Acetovanilona 98%) (Sigma-aldrich©), Etanol (95%), Glutaraldeído (8%), Polissorbato 80 (Tween 80) (Dinâmica©).

4.2 Método de coacervação para obtenção de nanopartículas de albumina contendo apocinina

As nanopartículas foram formuladas pela técnica de coacervação por adição de não solvente (FREITAS, 2016). Nesta etapa testes preliminares sem alteração do pH (pH 7,0, Lote 1), e com pH modificado para 9,0 foram realizados. As concentrações de albumina bovina, apocinina e glutaraldeído 8% utilizados são mantidas constantes.

Inicialmente, 100 mg de albumina foram dissolvidas em 2 mL de água destilada, em seguida, 30 mg de apocinina foram solubilizadas em 7 mL de etanol 98%. A dessolvatação foi feita por adição gota a gota (aproximadamente 1,5 mL por minuto) da solução etanólica de apocinina, até a solução se tornar opalescente, sob a agitação magnética (200 rpm/min). Em seguida, adicionou-se 40 µL do agente reticulante glutaraldeído 8%). Para a reticulação, a solução passou por agitação magnética por 24h (200 rpm/min à temperatura ambiente). Modificou-se o pH para cerca de 9,0 com a adição de 1000 µL de NaOH 0,1M.

Figura 3- Produção das nanopartículas por método de coacervação



Fonte: Autor, 2020

4.2.1 Etapa de revestimento das nanopartículas de albumina

O método de coacervação foi realizado ($n=3$) e em seguida as NP foram centrifugadas ($14.000 \times g$, 30 min, 4°C), e separados o sobrenadante do precipitado. Esse foi ressuspenso com $1000 \mu\text{L}$ de água destilada e, em seguida, foi adicionado o polissorbato 80 para revestimento ($0,75 \% \text{ p/v}$ e $0,50\% \text{ p/v}$), sob agitação constante (200 rpm/min) durante 30 minutos (JENITA *et al*, 2014).

4.2.2 Método analítico para quantificação da apocinina

Para a quantificação da apocinina nas nanopartículas utilizou-se a espectrofotometria de absorção ultravioleta. Para determinar a linearidade e a faixa de trabalho de trabalho foram preparadas soluções em diferentes concentrações (i.e. $1,56$; $3,125$; $6,25$; $12,5$; 25 e $50 \mu\text{g/mL}$) de apocinina e avaliado os valores de absorbância no comprimento de onda 276 nm . Um coeficiente de correlação maior do que $0,99$ é considerado adequado.

4.2.3 Determinação de eficiência de encapsulação (%EE)

Para determinar a quantidade de droga encapsulada foi utilizado o método de ultracentrifugação, desse modo, a quantidade de apocinina incorporada as nanopartículas é mensurada por análise indireta. Para isso, inicialmente, as

alíquotas foram centrifugadas (14.000 × g, 30 min, 4°C) para separação da apocinina encapsulada da apocinina livre. O sobrenadante foi separado e reservado. Feito isso, foi verificado qual seria o volume de sobrenadante total com auxílio de uma proveta e feita leitura no espectro. A concentração de apocinina foi calculada a partir da equação da reta da curva analítica determinada previamente. Já a eficiência de encapsulação foi determinada a partir da seguinte equação:

$$EE\% = \frac{\textit{Quantidade encapsulada}}{\textit{Quantidade total}} \times 100$$

4.2.4 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

As medidas foram feitas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. De cada lote de nanopartícula desenvolvido, foi retirada uma alíquota de 10 µL e adicionados mais 2 mL de água destilada para preenchimento da cubeta e posterior leitura (NOBBMANN, MORFESIS, 2009).

4.2.5 Potencial Zeta

O potencial zeta avalia as dispersões coloidais em suspensão seguindo o preceito de que os valores de potencial zeta maiores do que ±30 mV indicam partículas altamente carregadas (negativa ou positivamente), proporcionando dispersões estáveis devido à repulsão eletrostática imposta pelas cargas (MEHNERT; MÄDER, 2012). Foi utilizado o equipamento Zeta Sizer, disponibilizado no Centro de Ciências moleculares e Nanotecnologia, CCMN, do Campus Cedeg.

4.2.6 Estabilidade das nanopartículas

As nanopartículas brancas e com apocinina foram avaliadas durante 60 dias, por três amostras distintas (nanopartículas congeladas a aproximadamente -4 °C, refrigeradas a 5 °C e sujeitas às mudanças de temperatura do ambiente). Os parâmetros analisados foram diâmetro médio e índice de polidispersão. As análises de diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) foram realizadas através da técnica de espalhamento de luz (FREITAS, 2016).

4.2.7 Difratorômetro de Raio X

A técnica de difratometria de raio X tem por objetivo identificar os estados nos materiais sólidos. O princípio da técnica consiste em incidir um feixe de raios x em um cristal, que possui átomos ordenados em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de ondas dos raios x, ocasionando uma interação atômica originando o fenômeno de difração (RONIK, 2014; BEYERLEIN *et al.*, 2010).

A composição de fases cristalinas das amostras foi verificada pela técnica de difratometria de raios X (DRX) em Difratorômetro ULTIMA IV/Rigaku, disponível no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), com fonte de radiação Cu K α ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) gerada a 40 kV/30 mA. A varredura contínua foi realizada no intervalo entre 3° e 100° com ângulo de 2 θ , com passo de 0,02° e velocidade de escaneamento de 2° min⁻¹. As fendas de divergência e espalhamento estavam configuradas em 1,0° e a fenda de recepção foi de 0,30 mm

4.2.8 Espectrômetro de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho (IV) fornece evidências de grupos funcionais dos compostos a serem analisados, auxiliando na caracterização dos compostos presentes nas nanopartículas, como o fármaco e polímero (KOVALCZUK, 2014; MAINARDES, 2009).

Os espectros vibracionais das amostras na região do IV foram registrados em um Espectrofotômetro IR Prestige-21 com acessório de refletância difusa DRS-8000/Shimadzu com transformada de Fourier e calibração interna disponível no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr (0,01 g de amostra para 0,1 g de KBr) e os espectros foram obtidos fazendo-se a varredura de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram liofilizadas em equipamento da marca LIOTOP – modelo L108, para análise de DRX, IR e MEV. As morfologias das amostras foram avaliadas utilizando-se o equipamento da marca Hitachi – modelo TM3000 Tabletop.

4.2.10 DPPH

A capacidade antioxidante das nanopartículas de Apocinina foi avaliada pelo método da captura do radical difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com o método descrito por Kamdem *et al* (2013). As nanopartículas de apocinina ou nanopartículas brancas foram testadas nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 500 e 1000 µg/mL, em placas de poliestireno de 96 poços. Ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Em cada poço, foram adicionados a amostra (nanopartícula com Apocinina, nanopartícula branca ou ácido ascórbico); em seguida, foi adicionado 30 µL de DPPH (1 mM) e etanol (totalizando 200 µL). O branco de cada amostra foi realizado adicionando o mesmo volume de cada reagente, mas sem o DPPH. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 15 min no escuro e a leitura foi realizada na absorbância de 517 nm em leitor de microplacas (Biotek®, Epoch).

4.2.11 Análise estatística

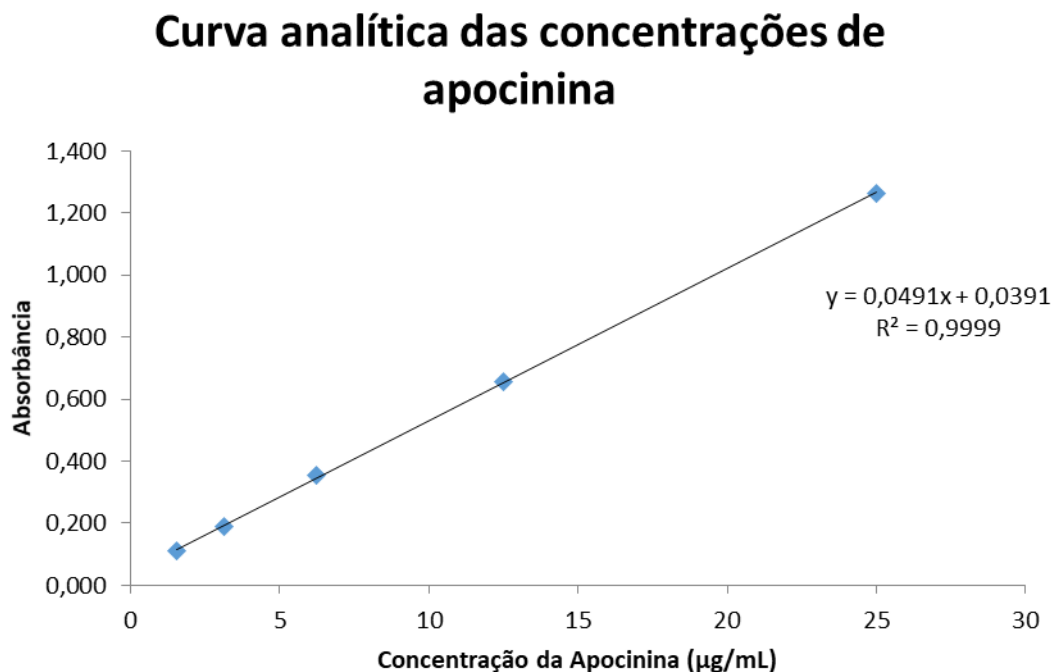
Inicialmente os dados tiveram sua normalidade testada através do teste de Shapiro Wilk. O teste t para amostras independentes foi utilizado para verificação de diferenças entre as médias do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas revestidas com 0,50% p/v e 0,75% p/v de PS80. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Os dados foram tratados no Software SPSS 20.04

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Linearidade

Ao analisar a curva analítica é possível observar a linearidade das concentrações, e afirmar que possuem coeficiente de correlação de 0,999, sendo satisfatório para o experimento (BRITO *et al*, 2003).

Gráfico 1- Curva analítica da apocinina em concentrações variadas.



A equação da reta obtida foi $y = 0,0491x + 0,0391$, onde y é a absorbância e x é a concentração ($\mu\text{g/mL}$). O valor do R^2 foi igual a 0,999, o que é considerada uma correlação fortíssima (BRITO *et al*, 2003). O resultado de correlação (R^2) é de suma importância para indicar a qualidade da curva analítica, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão e mais confiável é a determinação das concentrações (RIBANI *et al*, 2004).

5.2 Eficiência de encapsulação (%EE)

A eficiência de encapsulação é a porcentagem de fármaco que foi incorporado em relação à quantidade total colocada na formulação (CAMPOS *et al* 2012).

Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual é determinada a concentração de droga livre presente na suspensão (CASTANHEIRAS, 2012). Desse modo, a quantidade de apocinina incorporada às nanopartículas foi verificada por análises indiretas, analisando o sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação do preparo das amostras, método pelo qual se determina a concentração de droga não-encapsulada às nanopartículas. E a concentração de apocinina calculada a partir da equação da reta da curva analítica previamente determinada. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da equação (Tópico 4.2.3). Após o cálculo realizado, pode-se averiguar que houve uma encapsulação de 74% de apocinina.

A EE% é indispensável para determinar o quanto o fármaco pode ser carregado pelas nanopartículas e também o cálculo da dose (FREITAS, 2016). Os valores de EE% podem ser afetados pela natureza do material e pelos materiais utilizados na preparação (LIMA, ANDRADE, 2012); no trabalho realizado por Medeiros (2011) em que foram preparadas nanopartículas de quitosana, a eficiência de encapsulamento foi de 73%. O percentual de EE% de Jenita e colaboradores (2014) foi de 72%, já Ronik (2014) apresentou EE% inferior a 70%. Oliveira (2017) obteve resultados próximos a 90% com o método de coacervação.

5.2 Diâmetro médio das nanopartículas e índice de polidispersão (IP)

Nanopartículas preparadas por dessolvatação e posterior reticulação de albumina, geram promissores veículos para administração de fármacos. O tamanho das NP's é crucial para determinação do comportamento da mesma, sendo que, para que seja de um tamanho controlável, deve estar numa estreita faixa de 100 a 300 nm (LANGER, 2003). Após a análise pela técnica de espalhamento de luz, pode-se observar que o diâmetro médio das nanopartículas com pH básico (pH 9,0) foi de 194 nm ($\pm 7,848$) e o diâmetro médio das nanopartículas neutras foram maiores do que 1000 nm. Devido ao tamanho apresentado foi descartada a amostra

com pH neutro, pois a mesma não se apresentou adequada ao conceito de nanopartículas. O índice de polidispersão foi baixo (0,064). Índices de polidispersividade inferiores a 0,30 indicam homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas das amostras (TRIERWEILER, 2009).

Foram avaliadas também as amostras revestidas com polisorbato 80 com 0,75% p/v e 0,50% p/v. Sendo que as nanopartículas com revestimento de 0,75% p/v apresentaram tamanho de 208,9 nm e índice de polidispersão de 0,108. Já as nanopartículas com 0,50% p/v tiveram um diâmetro médio de 210,24 nm e índice de polidispersão de 0,131. Dessa maneira, devido ao diâmetro e IP aumentados na amostra com revestimento de 0,50% p/v foi descartada. Os valores do diâmetro das nanopartículas revestidas em comparação com as nanopartículas contendo apenas o fármaco evidenciam que o mesmo ocorreu.

Os dados estatísticos do diâmetro médio e índice de polidispersão estão descritos na tabela 2. O teste t independente não identificou nenhuma diferença para o índice de polidispersão entre os diferentes grupos ($t(16) = -0,84$; $p = 0,41$). Para diâmetro médio, o teste t independente mostrou que não houve diferença entre os grupos ($t(16) = -0,37$; $p = 0,71$).

Tabela 2- Diferença entre Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão entre nanopartículas com 0,50% p/v e 0,75% p/v de revestimento com PS 80.

	0,75% (n = 9)	0,50% (n = 9)	p
Índice de Polidispersão	0,108 ± 0,042	0,131 ± 0,072	0.41
Diâmetro (nm)	208,99 ± 8,26	210,24 ± 5,88	0.71

*Teste Shapiro Wilk e Teste T para amostras independentes

5.3 Potencial Zeta

A ligação das nanopartículas à membrana celular pode ser afetada pela carga superficial das partículas. A variação da carga da superfície da partícula auxilia no controle da ligação das NP's ao tecido e direcioná-las ao alvo (HONARY, 2013). Portanto, quanto maior for o potencial zeta em módulo, mais estável é considerada a suspensão, pois há repulsão das partículas entre si, superando a tendência de agregação (DA SILVEIRA GUIMARÃES *et al*, 2014)

A média do potencial zeta das NP's de albumina foi de 30,7 mV, semelhante aos resultados obtidos por Oliveira (2017). Esses valores são atribuídos ao valor do pH da suspensão de albumina, que têm influência sobre a carga superficial das partículas. Os valores de PZ acima de 30 mV proporcionam boa estabilidade, cargas positivas podem apresentar vantagens em administração de medicamentos, devido à superfície celular negativa. No entanto, muitas vezes exibem uma rápida depuração no sangue, juntamente com elevada acumulação no pulmão e no fígado, sendo que as NP's com característica negativa da superfície podem proporcionar maior tempo de permanência no sangue (LI; HUANG, 2008; OLIVERA, 2014; HONARY, 2013).

O potencial zeta das nanopartículas revestidas apresentou valor de - 20,7, sugere-se que esse resultado negativo pode ser atribuído a adsorção dos agrupamentos químicos do polisorbato 80, tornando a carga superficial mais negativa (PIRES, MOURA, 2017). Outros fatores podem afetar a estabilidade desses sistemas, como a estabilização estérica, consequência do uso de tensoativo não-iônico (polisorbato 80). Outros estudos como o de Rosa e colaboradores (2017) e outro feito por Schultze e colaboradores (2014) também apresentaram resultados negativos. Diversas pesquisas têm evidenciado que a utilização do polisorbato 80, presente nas nanopartículas facilita a interação das mesmas com receptores presentes nas células endoteliais do cérebro. Essa interação pode promover transcitose das nanopartículas pelas células endoteliais (ROSA *et al*, 2017; KREUTER, 2014).

Tabela 3- Análise do Potencial Zeta das Nanopartículas de Apocinina e Nanopartículas com Revestimento

Formulação	Potencial Zeta (mV)	Média	Desvio Padrão
Nanopartículas Apocinina	29	30.7	± 2.689
	29.3		
	33.8		
	-23.2		
Nanopartículas Revestidas (0,75% p/v)	-19.7	-20.7	± 2.146
	-19.3		

15.4 Estabilidade das Nanopartículas

ACRESCENTAR O PQ DO 15 FOI INFERIOR

Gráfico 2- Perfil de estabilidade das amostras armazenadas em 3 ambientes diferentes ao longo de 60 dias quanto ao diâmetro médio das nanopartículas

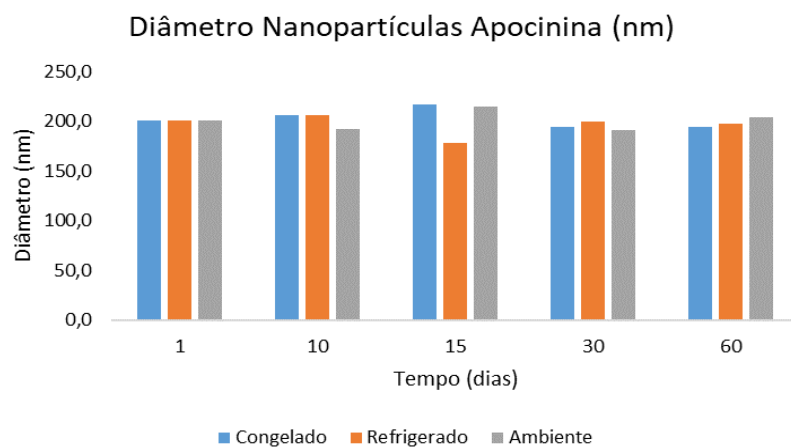
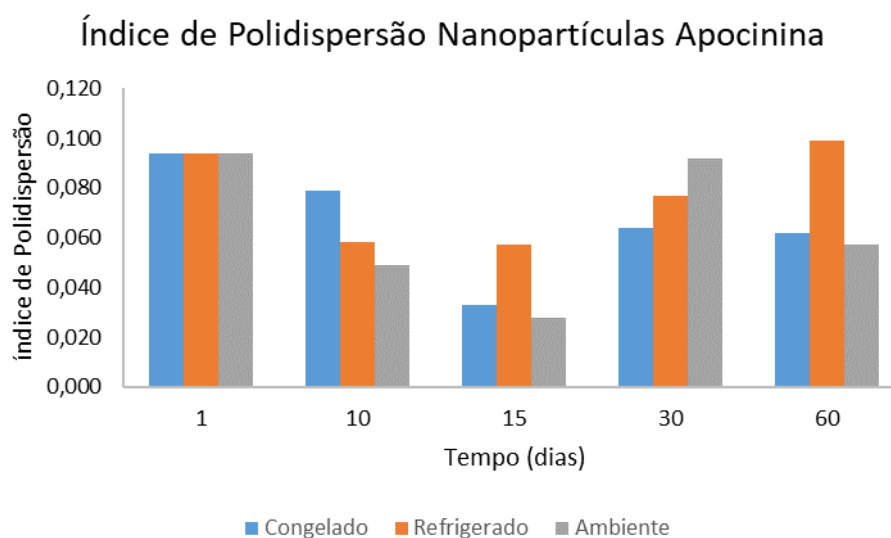


Gráfico 3- Perfil de estabilidade das amostras armazenadas em 3 ambientes diferentes ao longo de 60 dias quanto ao índice de polidispersão

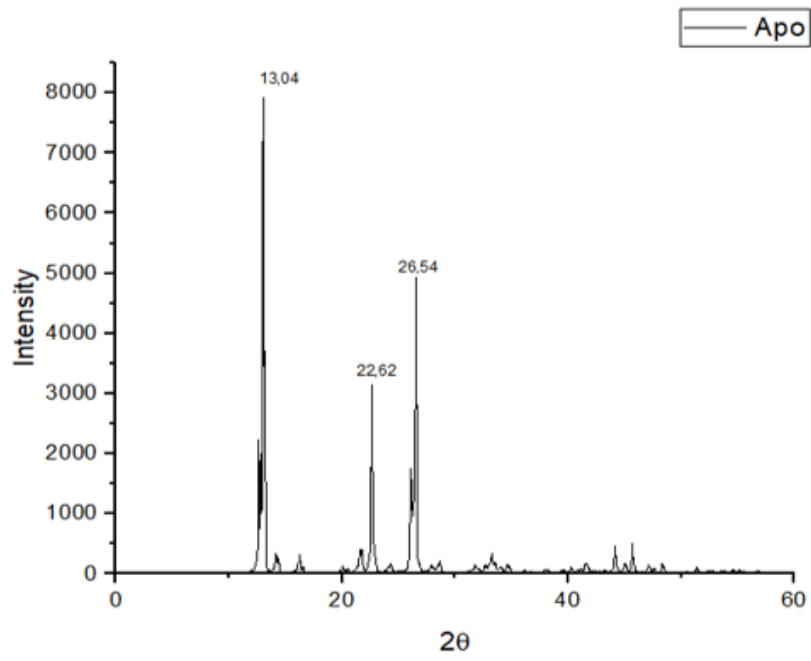


Tirar do dia 15. A avaliação da estabilidade das formulações é um fator crucial para determinar por quanto tempo o produto manterá a qualidade inicial e as alterações possíveis com o decorrer do tempo. Após a obtenção das nanopartículas elas foram divididas em 3 grupos, formulação congelada, refrigerada e temperatura ambiente, as quais foram conservadas, respectivamente às temperaturas de -4 °C, 5°C e de acordo com as condições climáticas. Para evitar mudanças bruscas no congelamento e descongelamento durante as avaliações foram construídos lotes para cada semana do experimento, os quais foram descartados após a finalização.

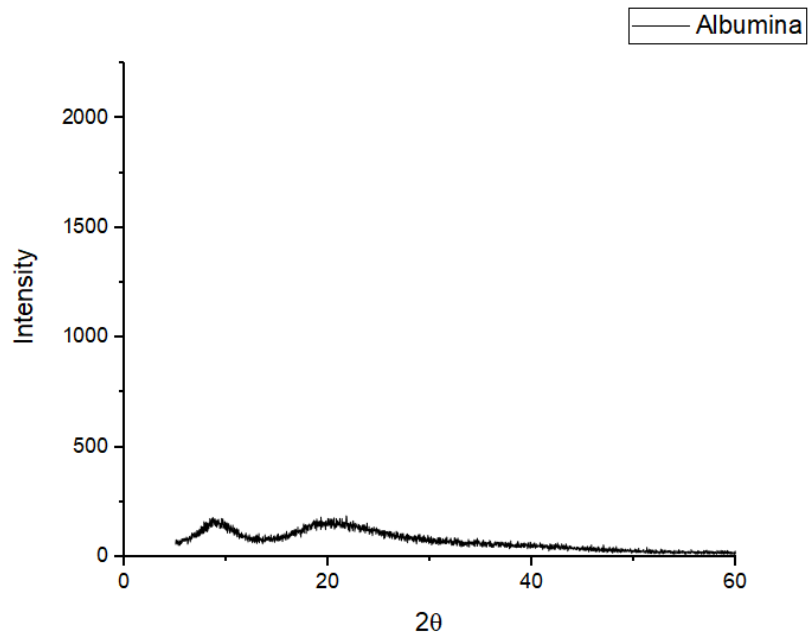
Os resultados (Gráfico 2) comprovam que não houve alteração significativa no diâmetro médio das nanopartículas durante as semanas de experimento. Pode-se notar um aumento no índice de polidispersão após 60 dias nas nanopartículas refrigeradas (Gráfico 3) com valor de 0,099 sendo considerado aceitável já que estava abaixo de 0,3.

5.5 Difractometria de raios X

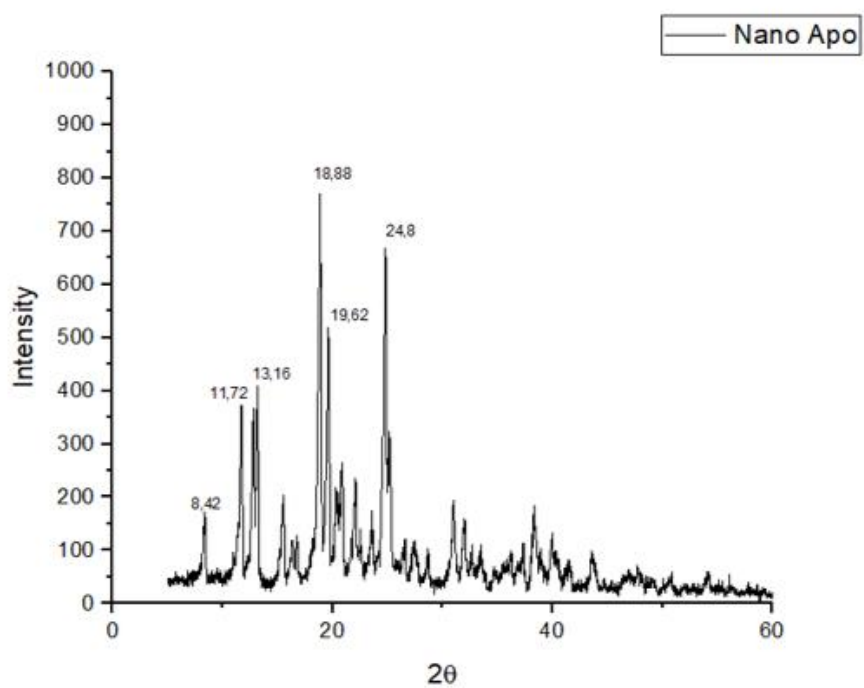
Figura 4- Padrões DRX Apocinina (a), Albumina (b), Nanopartículas contendo Apocinina (c) e Sacarose (d)



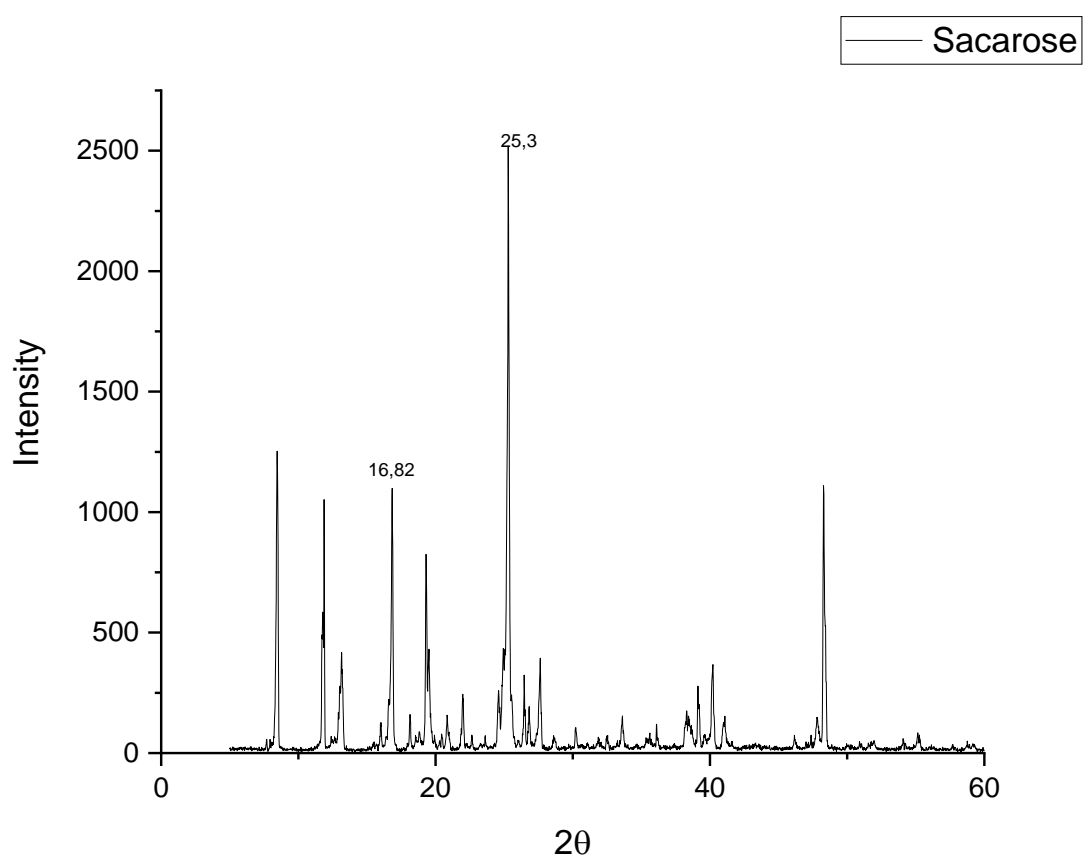
(a)



(b)



(c)



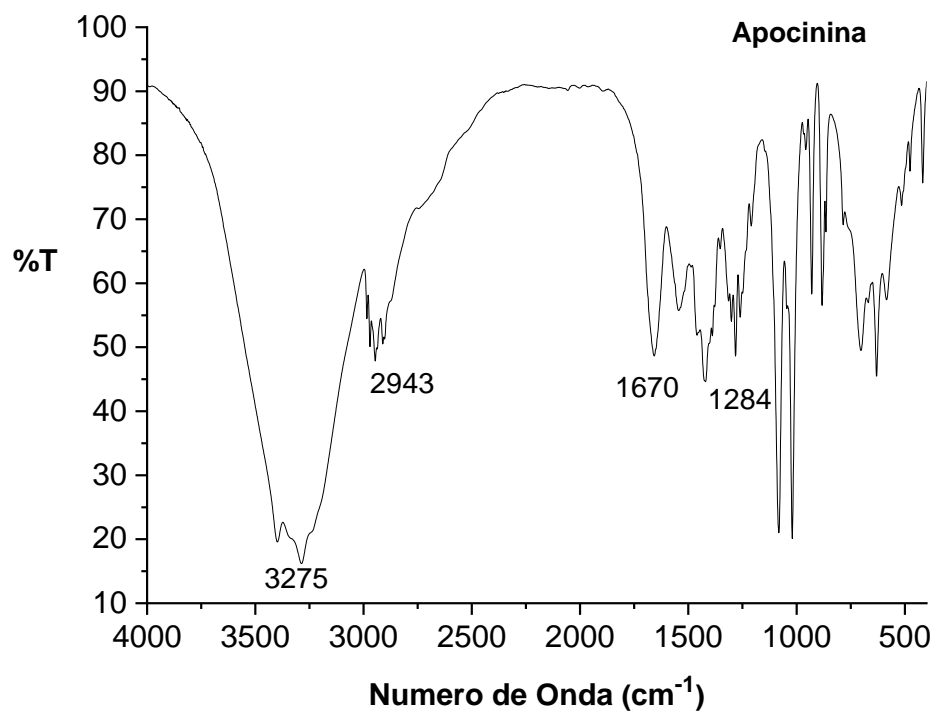
(d)

No DRX da albumina, devido a sua natureza amorfa não é possível observar picos. Mesmo resultado pode ser observado em Oliveira (2017). Já apocinina foi caracterizada com picos intensos, sendo que os principais aparecem em $2\theta = 13,04^\circ$; $22,62^\circ$ e $26,56^\circ$ se encontram no difratograma. Anter *et al* (2018) encontrou picos de difração em $2\theta = 13,21^\circ$; $21,78^\circ$; $22,67^\circ$; $26,18^\circ$. Oliveira *et al* tiveram os picos caracterizados em $2\theta = 12,9^\circ$ e $26,2^\circ$, ambos os estudos tiveram valores obtidos semelhantes a este, indicando um espectro característico da apocinina.

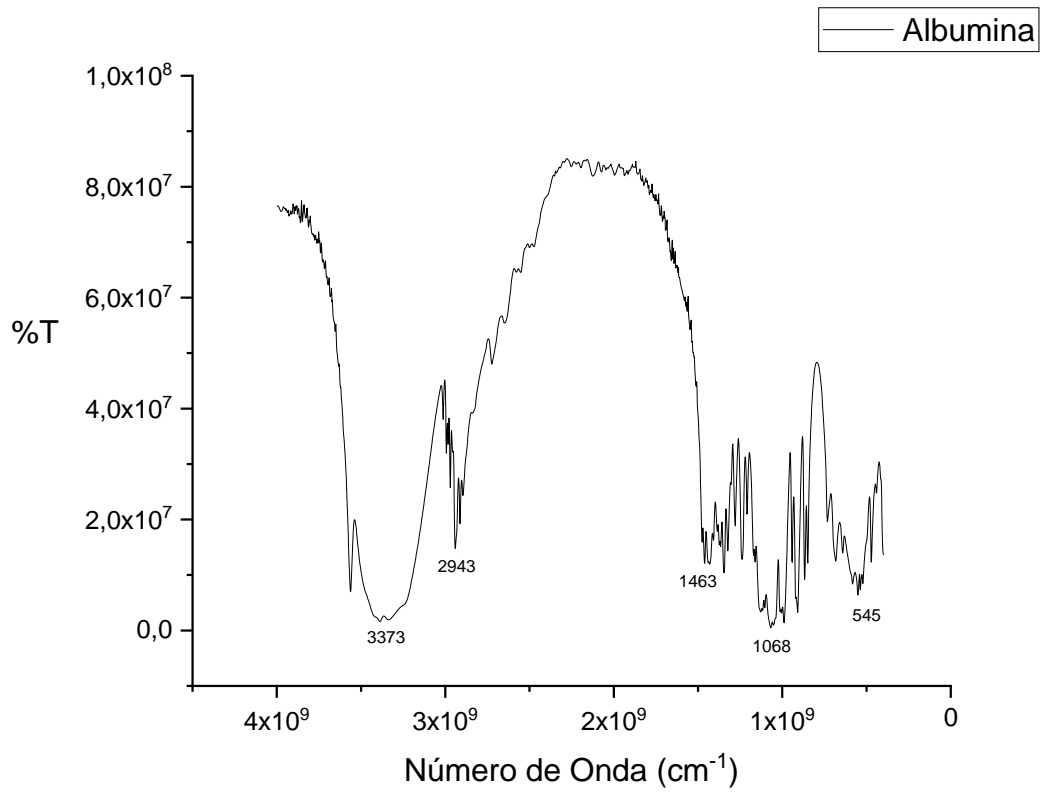
No difratograma das nanopartículas foi observado a presença de picos adicionais que podem ser da sacarose, utilizada como agente crioprotetor. Em um estudo realizado por Battaglini (2014) caracterizou picos de sacarose em aproximadamente $2\theta = 17,0^\circ$; 19° ,0 e $25,2^\circ$, as nanopartículas contendo apocinina apresentaram picos semelhantes em $2\theta = 19,62^\circ$ e $24,8^\circ$ indicando a interferência do crioprotetor na análise da amostra. Sólidos amorfos têm maior taxa de solubilidade em comparação à forma cristalina, por causa da baixa energia necessária para separá-los (OLIVEIRA, 2017). Os picos encontrados nas nanopartículas demonstram uma redução dos picos da apocinina, o que indica sua provável incorporação na nanopartícula. Os picos remanescentes são conseguintes da porção não encapsulada (26%).

5.6 Infravermelho

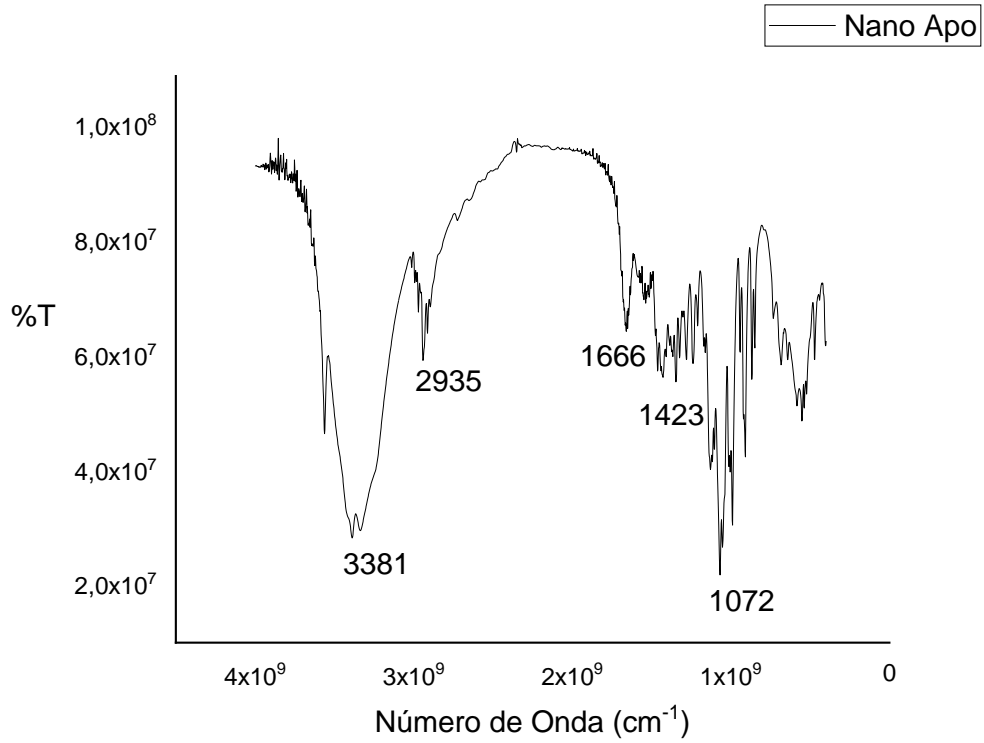
Figura 5- Infravermelho Apocinina (a), Albumina bovina (BSA) (b), Nanopartículas de Apocinina (c), Nanopartículas de BSA/APO/PS80 com 0,75% p/v de revestimento (d). Padronizar os termos das nanos apocinina e revestidas.



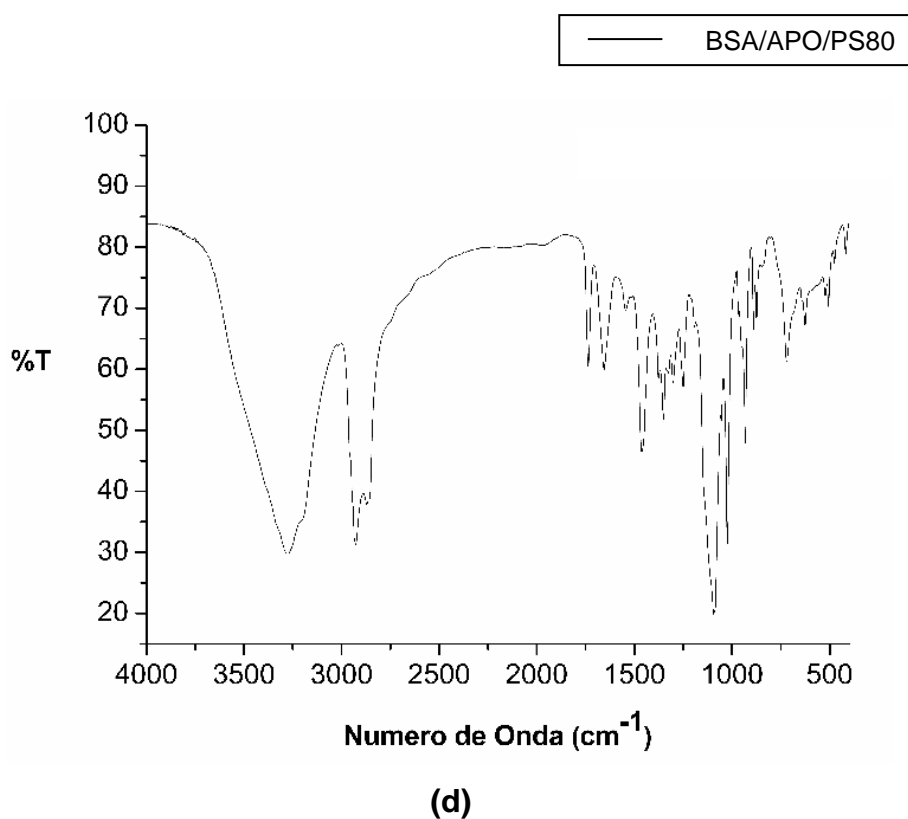
(a)



(b)



(c)



Os resultados do FT-IR são mostrados na Figura 5. O espectro da apocinina pura (fig. 5a) mostrou estiramento em 3275 cm^{-1} correspondente a grupos hidroxila, 2943 cm^{-1} correspondente a um alceno (C-H) e a banda em 1670 cm^{-1} atribuída a C=O referente a cetona conjugada. O pico em 1284 cm^{-1} corresponde a uma deformação angular para C-C (= O) -C.

O FT-IR espectro de albumina BSA (Fig. 5b) mostrou uma banda larga em 3373 cm^{-1} decorrentes de estiramento de grupos amina (N-H); um pico de ligação amida em 1463 cm^{-1} atribuído a vibração de alongamento C = O (banda de amida I).

O espectro de nanopartículas de albumina (BSA) contendo apocinina mostrou uma banda em 3381 cm^{-1} que pode ser atribuído as vibrações de N-H dos grupos amina da albumina e O-H da apocinina. As vibrações presentes em 2935 cm^{-1} correspondem ao alceno (C-H) presente no espectro da apocinina. Bem como o pico em 1423 cm^{-1} reflete a vibração de alongamento C = O presente no BSA. O pico em 1025 cm^{-1} corresponde a uma deformação axial simétrica para C-O de ligações éter da apocinina.

Resultados semelhantes foram obtidos por Anter *et al* (2018) utilizando onde o espectro de apocinina revelou bandas distintas em 3384 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} , 2843 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} . Oliveira *et al* (2017) mostraram resultados similares com bandas em 3317 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} e em 1526 cm^{-1} para apocinina.

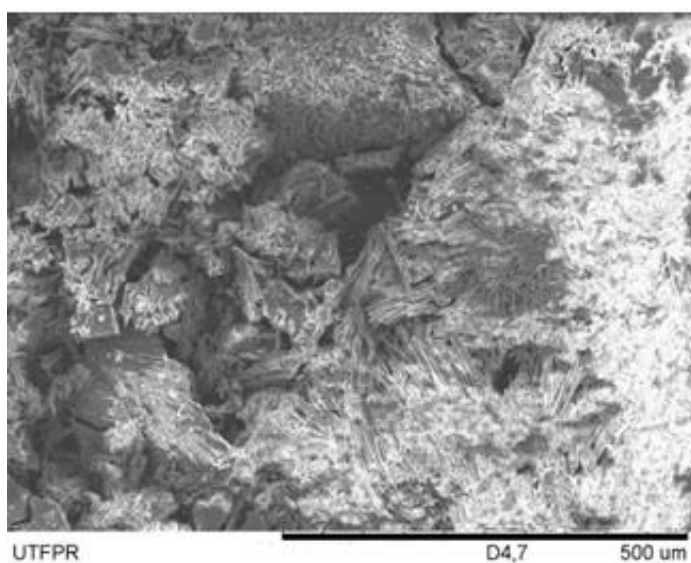
Nos espectros de FTIR das nanopartículas de BSA+APO+PS80 0,75% p/v foi possível observar bandas em 3290 e 3277 cm^{-1} , relativas ao estiramento O-H da apocinina, a estiramento N-H, de amida primária em ligação de hidrogênio da albumina e estiramento de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular do polissorbato. Em seguida, pode-se observar bandas na região de 2932 cm^{-1} que podem ser atribuídas às vibrações de deformação axial de C-H de hidrocarbonetos referente ao PS80. Já na região de 1650 cm^{-1} a banda referente a deformação axial de C=O associada a banda de amida da albumina e da deformação axial de C=O de cetona conjugada, em frequência mais baixa do que a observada para cetonas alifática, 1714 cm^{-1} , devido a conjugação com o grupo fenila da apocinina e banda de deformação axial de C=C do Polissorbato. Bandas na região de $1540 - 1550\text{ cm}^{-1}$ podem ser associadas à deformação angular de N-H de banda de amida da albumina. Em 1020 e 1090 cm^{-1} observa-se bandas relativas à deformação axial simétrica de ligação C-O referente à éter da apocinina e do PS 80.

Os resultados mostram a ausência de interação química entre BSA e apocinina, sugerindo que o processo de nano formulação não altera a estrutura química da droga.

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

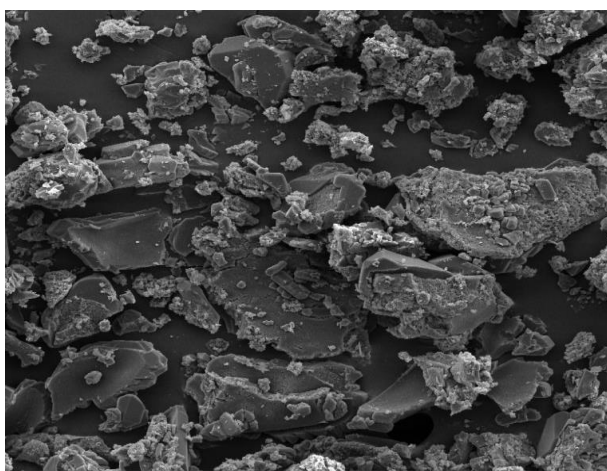
Pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível observar a presença das partículas formadas por albumina (BSA), apocinina (APO) e polissorbato 80 (PS80). Na Fig. 6 pode se observar que a superfície da amostra de apocinina se encontra na forma particulada de forma irregular.

Figura 6: Superfície da amostra de Apocinina, ampliação de 200 vezes.



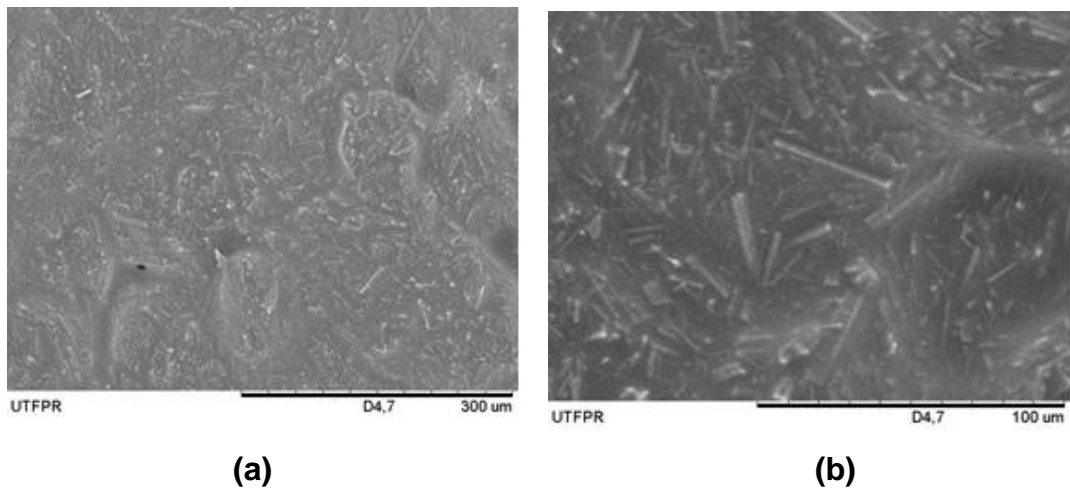
Para amostra do composto APO+BSA (Figura 7), pode-se observar um fundo irregular com a presença de pequenas esferas indicadas na ampliação de 400 vezes.

Figura 7- Superfície da amostra do composto APO+ BSA, ampliação de 400 vezes



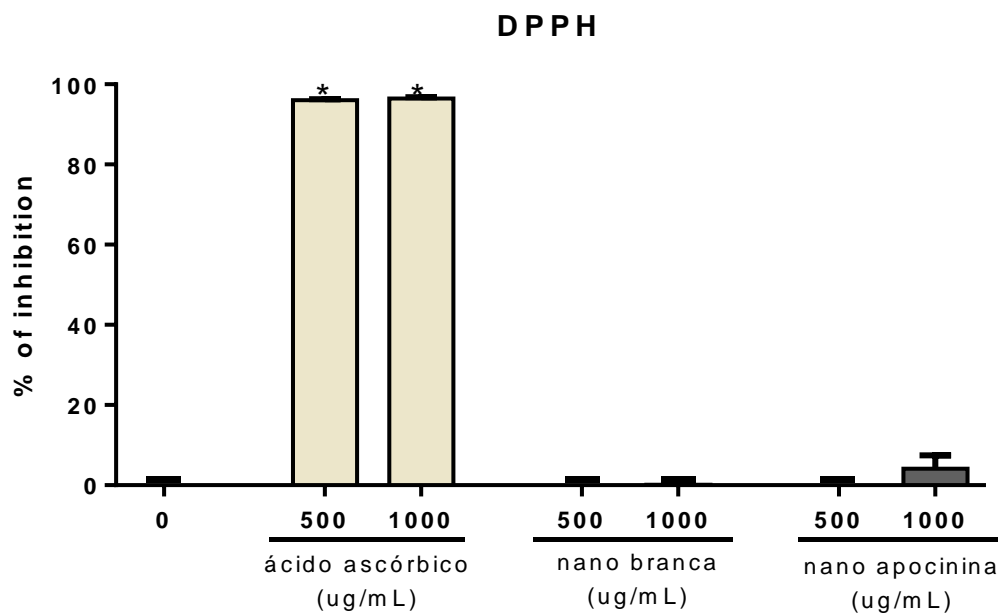
Para amostra do composto BSA + APO + PS 0,75% (Figura 8), pode-se observar uma superfície diferente da apocinina. A superfície se encontra de pequenas agulhas cristalizadas, como pode ser visto em ampliações de 300 e 1000 vezes. Procurar imagens sobre as nanos

Figura 8: Superfície da amostra do composto BSA+ APO + PS80 0,75%, ampliação de **(a)** 300 e **(b)** 1000 vezes, respectivamente.



5.8 DPPH

Gráfico 4- Comparativo do efeito antioxidante das NP's de Apocinina e Ácido Ascórbico



Os ensaios antioxidantes oferecem uma avaliação abrangente dos atributos antioxidantes das amostras testadas. A análise antioxidante foi realizada a partir do teste DPPH. No ensaio DPPH foi observado que as nanopartículas produziram um percentual de inibição inferior ao ácido ascórbico. Em um estudo realizado por Singh (2021), onde foi utilizado quitosana e apocinina para confecção das nanopartículas, encontraram uma eliminação maior em comparação a apocinina sozinha. Macías-Pérez (2013) mostrou que nem a apocinina, nem seus derivados apresentaram capacidade de redução do DPPH, mesmo em altas concentrações. Segundo esse estudo, embora a apocinina possua um grupo fenol semelhante aos flavonoides, ela não atua como um eliminador de radicais livres. Este comportamento pode ser explicado com base nos substituintes em seu anel aromático, a apocinina tem um doador de elétron (OCH_3) para o grupo hidroxila. Petrônio (2013) comparou a apocinina com ácido protocatecuico e concluiu que a apocinina foi ineficaz quando comparada ao ácido protocatecuico, destacando ainda a apocinina como um eliminador fraco de radicais livres. Por outro lado, neste mesmo estudo a apocinina mostrou-se um eficaz eliminador do ácido hipocloroso, e ainda reagiu com a espécie não radical H_2O_2 na presença de peroxidase, portanto a apocinina pode atuar como eliminador direto desse antioxidante endógeno apenas em células dotadas de peroxidases.

6 CONCLUSÃO

A obtenção das nanopartículas de apocinina pelo método de coacervação por adição de etanol apresentou tamanho, índice de polidispersão (IP) e eficiência de encapsulação (EE%) satisfatórios. Os resultados da caracterização (DRX e FT-IR) apresentaram resultados indicativos da presença da apocinina nas nanopartículas, comprovando sua formulação.

A utilização do polisorbato 80 (Tween 80) como revestimento mostrou-se adequada na formulação com 0,75% p/v, onde o IP e diâmetro médio foram aceitáveis, no entanto não houve diferença estatística significativa se comparado com o revestimento de 0,50% p/v.

As nanopartículas mostraram-se estáveis durante a análise de estabilidade com variação de temperatura durante os 60 dias.

A análise de DPPH mostrou que a apocinina possui um potencial antioxidante relativo se comparada com o ácido ascórbico.

Com os dados obtidos neste experimento pode-se dizer que as nanopartículas foram obtidas com sucesso, dando como perspectiva futura testes em in vitro e in vivo para averiguar sua eficácia.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, Rehab S. Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 37, n. 1, p. 27-37, 2018.
- ADORNE, Márcia Duarte et al. Avaliação físico-química de nanocápsulas poliméricas multiparedes estabilizadas por polissorbato 80/lecitina revestidas com diferentes concentrações de quitosana para futura funcionalização com espécies moleculares. In: **Congresso Brasileiro de Polímeros (12.: 2013 set. 22-26: Florianópolis, SC). [Anais][recurso eletrônico]. Florianópolis, SC: Associação Brasileira de Polímeros, 2013**
- AHMAD, Mahtab et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, 2014.
- APPOLINARIO, Patricia Postilione. **Avaliação do efeito do ácido docosaheptaenoico e de seus hidroperóxidos na oligomerização de SOD1 em um modelo da doença esclerose lateral amiotrófica**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARAÚJO, João Bernardo Gurito Ferreira. Nanotecnologias Aplicadas ao Desenvolvimento de Medicamentos - Vantagens e Limitações qualidade de vida no trabalho. Orientador: Alexandra de Albuquerque Sousa Veiga Dias. 2018. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; Plural e Farmácia Bº S. Miguel, Coimbra, 2018.
- BAM, N. B.; CLELAND, J. L.; YANG, J.; MANNING, M. C.; CARPENTER, J. F. Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.87, n.12, p.1554-1559, 1998.
- BARBIERI, Silvia Stella *et al.* Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Journal of Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 37, ed. 2, p. 154-165, 15 jul. 2004.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição: Brazilian Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 23, ed. 4, p. 629-643, Agosto 2010.
- BATTAGLINI, Ana Paula Pavão. **Difratometria de raios X como ferramenta na detecção de fraudes em leite**. 2014. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa

de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000214982>. Acesso em: 22 jul. 2021.

BENNET, Devasier; KIM, Sanghyo. Application of Nanotechnology in Drug Delivery. *In: APPLICATION of Nanotechnology in Drug Delivery*. 9. ed. Croácia: Intech DTP team, 2014. cap. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery, p. 257-308. ISBN 978-953-51-1628-8.

BHASKAR, Sonu et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1-25, 2010.

BLASI, Paolo; GIOVAGNOLI, Stefano; SCHOUBBEN, Aurélie; RICCI, Maurizio; ROSSI, Carlo. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Perugia, Italy, v. 59, ed. 6, p. 454-477, 10 jul. 2007.

BONOMO, Camila. Efeito da inibição da NADPH oxidase sobre o estresse oxidativo e o fenótipo muscular esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica. 2015. 59 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/139356>>.

BRENZA, Timothy M. *et al.* Biodegradable polyanhydride-based nanomedicines for blood to brain drug delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 11, p. 2881-2890, 2018.

CAMPOS, Eloísa Bueno Pires; YOSHIDA, Winston Bonetti. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro: Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular**, [s. l.], v. 3, ed. 4, p. 357-366, 5 out. 2004.

CAMPOS, Izabella Maria Ferreira. **Preparo e caracterização de nanopartículas de PLGA para liberação de acetato de dexametasona**. Orientador: Katia Cecilia de Souza Figueiredo. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2012.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 521-526, June 2014.

CARREÑO, Fernando. **Pharmacokinetic investigation of nanocapsulated quetiapine: a model to study drug delivery to the brain by polymeric nanocarriers**. Orientador: Dalila Costa. 2015. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia, [S. l.], 2015.

CASTANHEIRAS, Raquel Gomes. Nanopartículas bioadesivas para administração intramamária: Desenvolvimento, caracterização físico-química, cinética de liberação e avaliação biológica ex vivo. 2012. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012

CASTOR, Lidyane Regina Gomes. **Propriedades químicas e farmacológica da apocinina, vanilina e ácido vanílico**. 2013. 131 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/102430>>.

CHEN, Yan; LIU, Lihong. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Australia, v. 64, ed. 7, p. 640-665, 15 maio 2012.

COUVREUR, Patrick *et al.* Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 331-332, 1979.

CUNHA, Amanda Lima *et al.* Fundamentos químicos da ação dos radicais no organismo. **Diversitas Journal**, [s. l.], v. 1, ed. 1, p. 08-13, 1 jan. 2016.

DA SILVEIRA GUIMARÃES, Bruna *et al.* Síntese de nanoprata via química verde e caracterização por potencial zeta. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, 2014.

DA SILVEIRA PEREIRA, Alex Geovane *et al.* Estudos de Docking Molecular para Compreensão do Mecanismo de Ação Antiparkinson da Apocinina e Diapocinina. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 4, 2018.

DE SOUZA, Aguinaldo R; MORGON, Nelson H. Interação entre o Dímero de Apocinina e Ciclodextrina. **Revista Virtual de Química: Especial em Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular**, [s. l.], v. 8, ed. 2, p. 417-424, 18 abr. 2016. DOI 10.5935/1984-6835.20160031. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1615/756>. Acesso em: 13 jul. 2020.

DE VASCONCELOS, Thiago Brasileiro; CARDOSO, Ana Richelly Nunes Rocha; JOSINO, Jeanne Batista; MACENA, Raimunda Hermelinda; BASTOS, Vasco Pinheiro Diógenes. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of**

Health Sciences, [s. l.], v. 16, ed. 3, p. 213-219, 2 jul. 2015. DOI <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n3p%25p>. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/449>. Acesso em: 5 abr. 2020.

DONIDA, Bruna. **Síntese de polímeros glicosilados e aplicação como componentes de nanopartículas para vetorização de fármacos**. Orientador: Adriana Raffin Pohlmann. 2010. 55 f. Dissertação (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Curso de Farmácia., Porto Alegre, 2010.

ELZOGHBY, Ahmed OElgindy; SAMY, Wael M.; ELGINDY, Nazik A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Egypt, v. 157, ed. 2, p. 168-182, 30 jan. 2012.

FERREIRA, Ana Paula Oliveira *et al.* The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 6, p. 583-593, 2013.

FREITAS, Guilherme Barroso Langoni de. **Desenvolvimento de capsaicina nanoencapsulada com albumina e avaliação sobre o potencial terapêutico antitumoral**. Orientador: Iara José de Messias Reason. 2016. 139 p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Curitiba, 2016.

FRIES, Aline Taís; PEREIRA, Daniela Cristina. Teorias do envelhecimento humano. **Revista Contexto & Saúde**, v. 11, n. 20, p. 507-514, 2011. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2011.20.507-514>.

GOMES, Andreia Filipa Moreira. **Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos para o sistema nervoso central**. Orientador: Carla Sofia Pinheiro Vitorino. 2016. 34 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

GRATON, Murilo Eduardo. **Efeitos do tratamento crônico com apocinina sobre a resposta vasoconstritora da angiotensina II em ratos espontaneamente hipertensos**. Orientador: Cristina Antoniali Silva. 2017. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, [S. l.], 2017.

HERNANDES, Marina S. *et al.* The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 36, 2014.

HONARY, Soheyly; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

IGHODARO, Osasenaga Macdonald; AKINLOYE, Oluyemi . First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JENITA, Josephine Leno; VIJAYA, Chocalingam; BARNABAS, Wilson."Nanopartículas de albumina revestidas com polissorbato 80 como um novo portador de drogas para a entrega de drogas anti-retrovirais-Efavirenz". **International Journal of Pharmaceutical Investigation** 4.3 (2014): 142-148. *PMC*.

KAMDEM, Jean Paul et al. In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 3, p. 371-382, 2012.

KANEGAE, Marília Pyles Patto. Apocinina e metóxi-catecóis correlatos: relação entre estrutura molecular e inibição da ativação do complexo NADPH oxidase. 2009. 78 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100717>>.

KREUTER, Jörg. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know?. **Advanced drug delivery reviews**, v. 71, p. 2-14, 2014.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KURIAKOSE, M. et al. Synergistic Role of Oxidative Stress and Blood-Brain Barrier Permeability as Injury Mechanisms in the Acute Pathophysiology of Blast-induced Neurotrauma. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

LEE, S. H. et al. Inhibition of NADPH Oxidase Activation by Apocynin Rescues Seizure-Induced Reduction of Adult Hippocampal Neurogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.

LI, S-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 496-504, 2008.

LIMA, Natalia Alves de *et al.* Atividade Citotóxica de Apocinina, Diapocinina e Cape em Células Epiteliais Cervicais Infectadas por HPV. In: **V Simpósio de Biociências**

Aplicadas à Farmácia I Encontro Internacional de Biociências e Fisiopatologia. p. 47, 2014.

LOHCHAROENKAL, W. *et al.* Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. **Biomed Research International**, v. 1, 2014.

MA, Merry W. *et al.* NADPH oxidases em traumatismo cranioencefálico - alvos terapêuticos promissores? **Redox Biology**, v. 16, p. 285-293, 2018.

MACÍAS-PÉREZ, Martha Edith *et al.* Ethers and esters derived from apocynin avoid the interaction between p47 phox and p22 phox subunits of NADPH oxidase: evaluation in vitro and in silico. 2013.

MAINARDES, M, R.; GREMIAO, M. P. D.; BRUNETTI, I. L.; FONSECA, L. M. KHALIL, N. M. Ziduvudine-Loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer typr on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Pharmaceutical nanotechnology**. v.98, p.257-267, 2009.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, 2006.

MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 54-57, Sept. 2014. Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017&lng=en&nrm=iso>. Access on 15 June 2021. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-6725201400030001>.

MATOS, Adriana Arruda. **Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano.** 2018. Tese (Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, University of São Paulo, Bauru, 2018. Doi: 10.11606/T.25.2018.tde-24052018-175418. Acesso em: 2020-03-31.

MAYER, P. G. K. *et al.* Regulation of Plasma Membrane Localization of the Na⁺-Taurocholate Co-Transporting Polypeptide by Glycochenodeoxycholate and Tauroursodeoxycholate. **International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 52, p. 1427–1445, 2019.

MEHNERT, Wolfgang; MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MENDES, Maria Manuel Feliciano da Costa. **Lipid nanoparticles as a versatile system for drug administration**. Orientador: Carla Sofia Pinheiro Vitorino. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

MENG, Fanfei *et al.* Design and evaluation of lipoprotein resembling curcumin-encapsulated protein-free nanostructured lipid carrier for brain targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 506, n. 1-2, p. 46-56, 2016.

MISRA, A.; GANESH, S.; SHAHIWALA, A.; SHAH, S. Drug delivery to the central nervous system: a review. **Journal Pharmaceut Science**. v.6, p.252-273, 2003.

MONTES-RIVERA, J. *et al.* Apocynin combined with drugs as coadjuvant could be employed to prevent and/or treat the chronic kidney disease. **Renal failure**, v. 40, p. 92–98, 2018.

NETO, Ney Brasil Lemos *et al.* Efeito da Apocinina no Déficit Neuromotor Induzido pelo Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico em Ratos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.

NOBBMANN, Ulf; MORFESIS, Ana. Light scattering and nanoparticles. **Materials Today**, v. 12, n. 5, p. 52-54, 2009.

NÓBREGA, Jackson Silva *et al.* Avaliação do conhecimento etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 07-13, 2017.

NUNES, Josefina Dorotéa; MACIEL, Michelline V. A importância da informação do profissional de enfermagem sobre o cuidado no uso das plantas medicinais: uma revisão de literatura. *Revista Fitos*, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 518-525, maio 2017.

OLIVEIRA, Juliana Kovalczuk de *et al.* A stability-indicating high performance liquid chromatography method to determine apocynin in nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 7, ed. 2, p. 129-133, 04/2017 2017.

OLUKMAN, Murat *et al.* Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 9, p. 1657, 2018.

PARACATU, Luana Chiquetto. **Estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de inibidores de NADPH Oxidase em leucócitos: relevância da oxidabilidade e hidrofobicidade**. [S.l.] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2016.

PARDRIDGE, William M. Drug transport across the blood–brain barrier. **Journal of cerebral blood flow & metabolism**, v. 32, n. 11, p. 1959-1972, 2012.

PEREIRA, Danillo Baptista; PAULA, Fávero Reisdorfer. **ESTUDO, ANÁLISE E COMPARAÇÃO DA TOXICIDADE IN SILICO DE CHALCONAS DERIVADAS DA APOCININA E DA DIAPOCININA**. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 6, n. 2, 2014.

PETERS, Elisabeth A.; HILTERMANN, Jeroen T.N.; STOLK, Jan. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 31, ed. 11, p. 1442-1447, 1 dez. 2001.

PETRÔNIO, Maicon S. *et al.* Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. **Molecules**, [s. l.], v. 18, ed. 3, p. 2821-2839, 2013. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules18032821>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/18/3/2821/htm>. Acesso em: 2 abr. 2020.

PIRES, Viviane GA; MOURA, Márcia R. de. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Química Nova**, v. 40, p. 1-5, 2017.

RAVAL, JIGNYASHA A.; PATEL, JAYVADAN K.; PATEL, MADHABHAI M. Formulation and in vitro characterization of spray-dried microspheres of amoxicillin. **Acta Pharmaceutica**, [s. l.], v. 60, ed. 4, p. 455-465, 2010. DOI <https://doi.org/10.2478/v10007-010-0034-7>. Disponível em: https://hrcak.srce.hr/index.php?id_clanak_jezik=89462&show=clanak. Acesso em: 16 dez. 2019.

RODRIGUES, Camila Coelho. **Estudo da apocinina, diapocinina e derivados: síntese, modelagem molecular, avaliação da atividade aceptora de radicais e neuroprotetora frente a sintomas da doença de Parkinson**. 83 p. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana, Uruguaiiana, 2018.

RONIK, Débora Fernanda Veres *et al.* **Nanopartículas de Albumina Humana Contendo Apocinina Obtidas por Nano Spray Dryer para Direcionamento Cerebral: Avaliação da Atividade Antioxidante**. Orientador: Najeh Maissar Khalil. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Centro Oeste, [S. l.], 2014.

ROSA, Carolina Pires. **Nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo vimocetina: desenvolvimento e avaliação da atividade anticonvulsivante**.

Orientador: Scheila Rezende Schaffazick. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, 2017.

SANDRINI, Leonardo *et al.* Apocynin Prevents Abnormal Megakaryopoiesis and Platelet Activation Induced by Chronic Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, 2017.

SARAIVA, Cláudia *et al.* Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 34-47, 2016.

SARMENTO, Antonio Carlos Megre Eugénio. **Modulação da Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica por Mecanismos Adrenérgicos Centrais**. 1992. 123 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina do Porto, Porto, 1992.

SCHULTZE, Eduarda *et al.* Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 55-63, 2014.

SAVLA, Shreya R.; LADDHA, Ankit P.; KULKARNI, Yogesh A. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. **Drug Metabolism Reviews**, p. 1-21, 2021.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, p. 546, 1962.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira.; SCHENKEL, Eloir Paulo. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMONYI, Agnes *et al.* The neuroprotective effects of apocynin. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 2183, 2012.

SINGH, Manisha *et al.* Neuroprotective Ability of Apocynin Loaded Nanoparticles (APO-NPs) as NADPH Oxidase (NOX) -Mediated ROS Modulator for Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Neuronal Injuries. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5011, 2021.

SOUTO FILHO, Sebastião Nilce. **Nanopartículas, morfologia da nanoestrutura e espectrometria de massa como indicadores da recuperação de um latossolo vermelho**. Orientador: Marlene Cristina Alves. 2016. 52 f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, [S. l.], 2016.

STEFANSKA, J. *et al.* Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate

concentrations in exhaled breath in healthy subjects. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 48–54, 2010.

SUZUKI, Shugo *et al.* Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 1035–1041, 2013.

THORLEY, Andrew J.; TETLEY, Teresa D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 140, n. 2, p. 176-185, 2013.

TOSI, Giovanni *et al.* Polymeric nanoparticles for the drug delivery to the central nervous system. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5, n. 2, p. 155-174, 2008.

UPADHYAY, Ravi Kant. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

VAUTHIER, Christine. A journey through the emergence of nanomedicines with poly (alkylcyanoacrylate) based nanoparticles. **Journal of drug targeting**, p. 1-23, 2019.

VERGONI, Anna Valeria *et al.* Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 369-377, 2009.

WANG, Kaiyu *et al.* Improvement of pharmacokinetics behavior of apocynin by nitronone derivatization: comparative pharmacokinetics of nitronone-apocynin and its parent apocynin in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70189, 2013.

WANG, Kaiyu; LI, Linlin; SONG, Yan; YE, Xiaocui; FU, Shaolian; JIANG, Jie; LI, Sha. Improvement of Pharmacokinetics Behavior of Apocynin by Nitronone Derivatization: Comparative Pharmacokinetics of Nitronone-Apocynin and its Parent Apocynin in Rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, ed. 7, p. 1-6. 21 set. 2021.

WONG, Ho Lun; WU, Xiao Yu; BENDAYAN, Reina. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 7, p. 686-700, 2012.

YAO, Hongwei *et al.* A ablação genética da NADPH oxidase aumenta a suscetibilidade à inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro e enfisema em camundongos. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 5, p. 1222-1237, 2008.

